

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Mestrado em Ciências da Saúde

MARCELA COUTO BRIGAGÃO CAMPOS

**TERAPIA COM G-HESPERIDINA E EXERCÍCIO FÍSICO NA
COMPOSIÇÃO CORPORAL, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
FUNÇÃO VASCULAR EM RATOS OBESOS**

Bragança Paulista/SP

2016

MARCELA COUTO BRIGAGÃO CAMPOS

**TERAPIA COM G-HESPERIDINA E EXERCÍCIO FÍSICO NA
COMPOSIÇÃO CORPORAL, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
FUNÇÃO VASCULAR EM RATOS OBESOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Ciências da Saúde da Universidade
São Francisco para obtenção do título
de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda
Bruschi Marinho Priviero

Bragança Paulista/SP

2016

QV 325 Campos, Marcela Couto Brigagão.

C214t Terapia com G-hesperidina e exercício físico na composição corporal, parâmetros bioquímicos e função vascular em ratos obesos / Marcela Couto Brigagão Campos. – Bragança Paulista, 2016.
98 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.



CAMPOS, B. C., Marcela, “Terapia com G-Hesperidina e Exercício Físico na Composição Corporal, Parâmetros Bioquímicos e Função Vascular em Ratos Obesos”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 29 de Agosto de 2016 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof.ª. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero
Universidade São Francisco

Prof.ª. Dra. Gislaine Vieira Damiani
Instituto Federal do Paraná

Prof. Dr. Mário Angelo Claudino
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambuí
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente em minha vida. “Sou em Ti, És em mim, minha alma diz meu Deus como És lindo (...)”.

À minha família, que investiu e acreditou em mim, e que renunciou a muitas coisas para me oferecer a melhor educação possível.

Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro de todas as horas. Pelo carinho, compreensão, amor e solidariedade inefável.

A minha orientadora, Prof. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero, pelo voto de confiança em me orientar, por sua generosidade, paciência, disponibilidade e contribuição profissional.

Aos Profs Dr. Mario Angelo Claudino e Patrícia de Oliveira Carvalho, pelas produtivas observações e contribuições.

Aos membros das bancas examinadoras, por suas considerações que enriqueceram este trabalho.

Aos meus colegas Tiago Tomazini, Carolina Lazáro; Fernanda Mateo; Maria Thereza Barsotti, já que sem a ajuda e disponibilidade deles, muitos experimentos não teriam acontecido.

A todos os colegas da pós-graduação, pela amizade, companheirismo, incentivo e toda ajuda dispensável ao longo desse período em que estivemos juntos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos auxílios financeiros concedidos.

Aos demais professores que estiveram presentes, sempre passando seus conhecimentos e ajudando em momentos oportunos.

Sem vocês este trabalho não seria possível. Muito obrigada!

RESUMO

A obesidade é um problema mundial de saúde pública e seu tratamento inclui dieta pobre em gorduras saturadas e atividade física. A obesidade pode ser acompanhada por alterações metabólicas e pode causar diversas disfunções orgânicas, entre elas, a disfunção vascular devido à reduzida disponibilidade de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico (NO). Há evidências de que a redução de substâncias vasodilatadoras como o NO esteja associada ao aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), que gera estresse oxidativo. Adicionalmente, o uso de flavonóides antioxidantes tem sido vastamente proposto como terapia para os distúrbios metabólicos e cardiovasculares. Assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a composição corporal, parâmetros bioquímicos e função vascular em ratos obesos tratados cronicamente com G-hesperidina em associação com um programa de exercícios físicos. Para isso, a obesidade foi induzida por dieta hiperlipídica e frutose em ratos wistar machos com 4 semanas de vida, durante 12 semanas. O treinamento físico e/ou tratamento com antioxidantes foi iniciado a partir da 8ª semana de dieta, por mais 8 semanas. O sangue foi coletado para avaliação do perfil lipídico e estado oxidativo e a artéria mesentérica foi removida para avaliação funcional. Após 12 semanas de dieta hiperlipídica, os animais apresentaram maior ganho de peso e acúmulo de gordura corporal quando comparado aos animais alimentados com dieta padrão. O tratamento com hesperidina não modificou o ganho de peso e gordura corporal. Apenas o treinamento físico foi capaz de reduzir o ganho de peso e gordura corporal. Além disto, o treinamento físico modulou o estado oxidativo, aumentando a atividade da SOD, a capacidade antioxidante e reduzindo a peroxidação lipídica. O tratamento somente com G-hesperidina não afetou o estado oxidativo e, quando associado ao exercício físico, diminuiu as respostas produzidas pelo treinamento. A dieta hiperlipídica produziu disfunção endotelial, uma vez que a potência da acetilcolina foi reduzida em todos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica. O tratamento com G-hesperidina ou treinamento físico não alteraram a potência da acetilcolina. A potência de relaxamento para o nitroprussiato de sódio não foi modificada pelo tratamento com dieta hiperlipídica, mas foi potencializada pelo treinamento físico. Nossos achados demonstram que, em modelo experimental de obesidade, o exercício físico é capaz de modificar a composição corporal e parâmetros bioquímicos, além de melhorar o estado oxidativo geral de animais alimentados com dieta hiperlipídica. O tratamento com o flavonoide antioxidante G-hesperidina inibiu os benefícios promovidos pelo exercício físico.

Palavras-chave: hesperidina. dieta hiperlipídica. exercício físico. estado oxidativo.

ABSTRACT

Obesity is a worldwide public health problem and its treatment includes limited dietary intake of saturated fats and physical activity. Obesity may be accompanied by metabolic changes and may cause several organic dysfunctions such as vascular dysfunctions due to reduced bioavailability of vasodilatory substances such as nitric oxide (NO). There are evidences that the reduced vasodilatory substances are related to increased reactive oxygen species (ROS), which leads to an oxidative stress. Additionally, the intake of antioxidant flavonoids has been largely proposed as a therapy for metabolic and cardiovascular disorders. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effects of G- hesperidin, an antioxidant flavonoid associated with physical exercise, on the lipidic metabolism, oxidative status and on the vascular function of obese rats. Obesity was induced by a hyperlipidic diet plus fructose given to 4 weeks-old male Wistar rats, lasting 12 weeks. Physical training and/or antioxidant treatment started along with the 8th week of diet and lasted 8 weeks further. It was evaluated the lipid profile, oxidative status and mesenteric artery was removed for functional evaluation. After 12 weeks of hyperlipidic diet, rats presented higher body weight gain and body fat accumulation when compared to rats fed with standard chow. Treatment with G-hesperidin did not change body weight gain and fat depot. Only physical training was able to reduce the body weight gain and fat accumulation. Furthermore, physical training modulated the oxidative status by increasing SOD activity, total antioxidant capacity and reducing lipid peroxidation. Treatment with G-hesperidin did not affect oxidative status and when associated to physical training, decreased changes elicited by physical training. Hyperlipidic diet caused endothelial dysfunction, since the potency of acetylcholine was reduced in all groups fed with hyperlipidic diet. Treatment with G-hesperidin and physical exercise did not alter the potency of acetylcholine. Potency of sodium nitroprusside was not changed by hyperlipidic diet whereas it was potentiated by physical training. Our results show that, in experimental model of obesity, physical exercise is able to modify body composition and biochemical parameters, improve general oxidative status of rats fed with hyperlipidic diet. Treatment with antioxidant flavonoid G-hesperidin inhibited the benefit promoted by physical exercise.

Keywords: hesperidin. high fat diet. physical exercise. oxidative status

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh: Acetilcolina

Bnos: Óxido nítrico sintase cerebral (do inglês: brain nitric oxide synthase)

Ca²⁺: Cálcio

CAT: Catalase

cNOS: Óxido nítrico sintase constitutiva (do inglês: constitutive nitric oxide synthase)

DAC: Doença Arterial Coronariana

DH + GH: Dieta hiperlipídica associada à G-hesperidina

DH: Dieta Hiperlipídica

EC-NOS: Óxido nítrico sintase endotelial constitutiva (do inglês: endothelial constitutive NO synthase)

EDRF: Fator de relaxamento do endotélio (do inglês: Endothelium derived relaxing factor)

eNOS : Óxido nítrico sintase endotelial (do inglês: endotelial nitric oxide synthase)

EROs: Espécies reativas de oxigênio

ET1: Endotelina 1

GH: G-hesperidina

GPx: Glutathione Peroxidase

GTP: guanosina trifosfato

HD: Hesperidina

IDF: Federação internacional de diabetes (do inglês: International Diabetes Federation)

IMC: Índice de Massa Corporal

L-ARG: L- arginina

MacNOS: Óxido nítrico sintase de macrófagos (do inglês: macrophage NO synthase)

MDA: Malondialdeído

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal (do inglês: neuronal NO synthase)

NO: Óxido nítrico (do inglês: nitric oxide)

NOS: Óxido nítrico sintase (do inglês: nitric oxide synthase)

OMS: Organização Mundial da Saúde

POF: Pesquisa de Orçamento Familiar

RCQ: Risco Circunferência Quadril

SNP: Nitroprussiato de sódio (do inglês: sodium nitroprusside)

SOD: Superóxido dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: thiobarbituric acid reactive substances)

tPA: Plasminogênio tecidual

TR: treinamento

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Balanço da homeostase energética.....	15
FIGURA 2. Relação entre a predisposição genética e o ambiente no desenvolvimento da obesidade e algumas de suas consequências.....	16
FIGURA 3. Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.....	30
FIGURA 4. Esquema da absorção intestinal da arginina.....	31
FIGURA 5. Isoformas da NO Sintase	32
FIGURA 6. Interação da Camodulina-Cálcio e Inos.....	33
FIGURA 7. Representação esquemática do relaxamento via NO-GMPc.....	34
FIGURA 8. Esquema das principais fontes que levam a formação de espécies reativas e mecanismo de defesa	39
FIGURA 9. Estrutura básica de um flavonoide	45
FIGURA 10. Estrutura química da G-Hesperidina, hesperidina e hesperitina	49
FIGURA 11. Esquema geral da absorção e metabolismo da hesperidina	50
FIGURA 12. Organograma da divisão dos animais nos grupos experimentais.....	59
FIGURA 13. Peso corporal inicial e final de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados com G-hesperidina (GH), submetidos ou não ao treinamento físico (TR).....	67
FIGURA 14. Acúmulo de gordura epididimal e retroperitoneal de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo.....	68
FIGURA 15. Glicemia de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo.....	69
FIGURA 16. Níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo.....	70
FIGURA 17. Níveis séricos de albumina e proteínas totais de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo.....	71

FIGURA 18. Níveis plasmáticos de ureia de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo.....	72
FIGURA 19. Atividade plasmática das enzimas antioxidantes SOD e catalase de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo.....	73
FIGURA 20. Capacidade antioxidante total plasmática e concentração plasmática de MDA de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo.....	74
FIGURA 21. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio em artéria mesentérica desprovida de endotélio, de ratos controle e alimentados com dieta hiperlipídica (Dieta), suplementados com G-Hesperidina (GH) e submetidos a treinamento físico (TR).....	77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação do peso pelo IMC e os riscos de comorbidades.....	16
TABELA 2. Circunferência abdominal e risco de complicações metabólicas associadas com obesidade em homens e mulheres.....	18
TABELA 3. Referência do Ponto de corte da circunferência de cintura.....	19
TABELA 4. Combinação das medidas de circunferência abdominal e IMC para avaliar a obesidade e doença cardiovascular.....	20
TABELA 5. Classificação dos flavonoides e fontes alimentares.....	46
TABELA 6. Efeitos da biodisponibilidade do óxido nítrico mediada pelo exercício agudo.....	55
TABELA 7. Efeitos do aumento de biodisponibilidade do óxido nítrico em função do treinamento físico.	56
TABELA 8. Composição da dieta hiperlipídica.....	61
TABELA 9. Suplementação e dieta dos animais.....	62
TABELA 10. PD ₂ da acetilcolina na artéria mesentérica de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, e tratados com Hesperidina ou G-Hesperidina, associadas ou não com exercício físico.....	75
TABELA 11. E _{MAX} da acetilcolina na artéria mesentérica de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, e tratados com Hesperidina ou G-Hesperidina, associadas ou não com exercício físico.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Conceituação e Classificação da Obesidade.....	15
1.1.2 Transição Nutricional e a Epidemia da Obesidade.....	20
1.1.3 Etiologia.....	22
1.1.4 Tratamento Não Farmacológico.....	23
1.2 Disfunção Cardiovascular e Obesidade.....	24
1.2.1 Tecido Adiposo.....	24
1.2.2 Endotélio e disfunção endotelial.....	25
1.3 Óxido Nítrico.....	29
1.3.1 Características, Síntese e Metabolismo do Óxido Nítrico.....	29
1.3.2 Sintases do NO e resposta vasculares mediadas pelo NO.....	31
1.4 Estresse Oxidativo.....	35
1.4.1 Estresse Oxidativo, Inflamação E Disfunção Endotelial.....	35
1.4.2 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres.....	36
1.4.3 Obesidade e Estresse Oxidativo.....	40
1.5 Antioxidantes.....	41
1.6 Compostos Bioativos	44
1.6.1 Ação Antioxidante dos Flavonoides	46
1.7 Hesperidina, Hesperitina E Glicosil- Hesperidina.....	47
1.8 Treinamento Físico	51
1.8.1 Sinalizadores energéticos metabólicos.....	52

1.8.2	Vias metabólicas envolvidas na produção de ATP.....	53
1.8.3	Óxido nítrico e exercício físico.....	54
2	OBJETIVO.....	58
3	MÉTODO.....	59
3.1	Animais.....	59
3.2	Manutenção dos animais.....	60
3.3	Dietas.....	60
3.3.1	Dieta controle.....	60
3.3.2	Dieta experimental.....	60
3.4	Determinação da evolução de peso.....	61
3.5	Determinação do consumo de dietas.....	61
3.6	Preparo das soluções	62
3.7	Treinamento com a G-hesperidina.....	62
3.8	Programa de treinamento físico: corrida em esteira	63
3.9	Eutanásia dos animais e obtenção dos tecidos.....	63
3.10	Avaliação funcional da artéria mesentérica.....	64
3.11	Avaliação do estresse oxidativo.....	65
3.12	Avaliação da função renal e hepática.....	65
3.13	Perfil lipídico.....	66
4	RESULTADOS.....	67
5	DISCUSSÃO.....	78
6	CONCLUSÃO.....	83

REFERENCIAS84

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

1.1.1 CONCEITUAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA OBESIDADE

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura resultando no desequilíbrio entre o total de calorias consumidas e calorias gastas (FIGURA 1), levando a consequências graves à saúde (WHO, 2006).

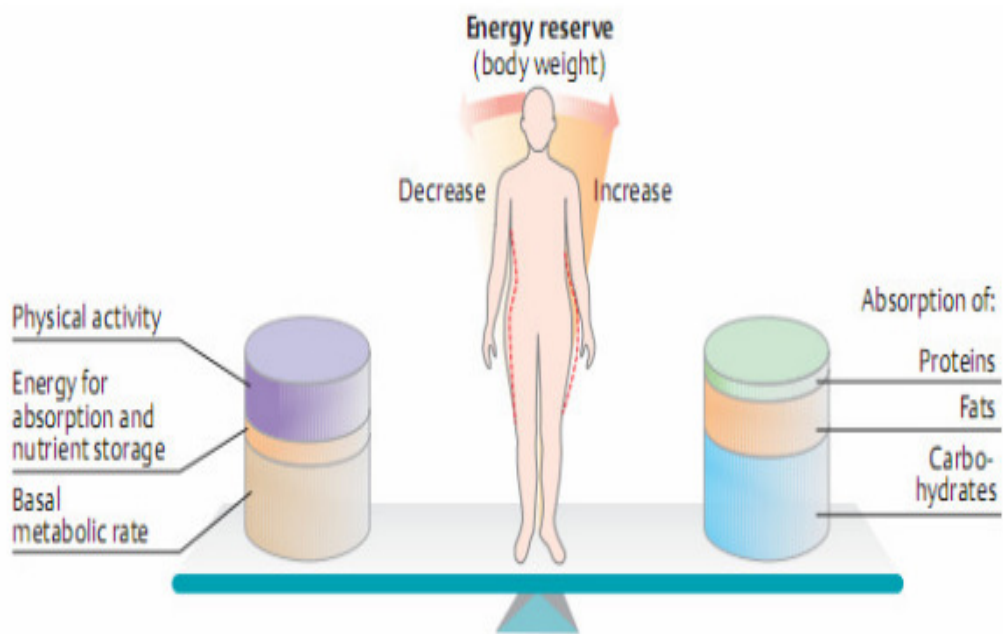


FIGURA 1. Balanço da homeostase energética (WHO, 2000)

Considerada como uma doença crônica, a obesidade apresenta etiologia multifatorial, mostrando que o excesso de adiposidade pode estar relacionado a predisposição genética, fatores ambientais, estilo de vida e também fatores emocionais. No sistema aferente, a leptina e outros sinalizadores da saciedade e do apetite estão incluídos entre os sistemas neuroendócrinos envolvido na obesidade. (DESPRÉS et al., 2008)

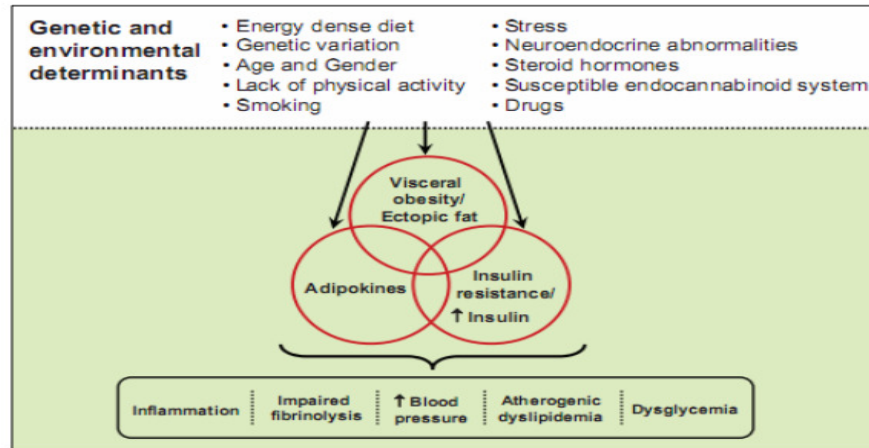


FIGURA 2. Relação entre a predisposição genética e o ambiente no desenvolvimento de obesidade e alguns das suas conseqüências (DESRPÉS et al., 2008).

Uma das formas de se classificar a obesidade é através da associação entre índice de massa corpórea (IMC) e doença crônica ou mortalidade, conforme a classificação adaptada pela OMS, baseada em padrões internacionais desenvolvidos para pessoas adultas descendentes de europeus (CALLE, 1999) (TABELA 1).

TABELA 1 - Classificação do peso pelo IMC e os riscos de comorbidades (Adaptado de WHO, 2000).

Classificação	IMC kg/m ²	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo
Peso normal	18,5 – 24,9	Médio
Sobrepeso	> 25,0	-
Pré-obeso	25,0 – 29,9	Aumentado
Obeso I	30,0 – 34,9	Moderado
Obeso II	35,0 – 39,9	Grave
Obeso III	> 40,0	Muito grave

O IMC é amplamente utilizado, apesar das inúmeras restrições de uso, como o de não ser capaz de fornecer informações sobre a composição corporal e distribuição da gordura corporal

(YAO et al., 2002). Porém, antropometria é considerada o método mais útil para classificar a obesidade, por apresentar baixo custo, não invasiva, universalmente aplicável e com uma boa aceitação. Segundo Witt e Bush, para avaliação da obesidade, acredita-se que alguns fatores contribuam para limitação do IMC, como as diferenças sexuais, étnicas e dos níveis de atividade física e adiposidade (WITT; BUSH, 2005).

Para o diagnóstico da obesidade, existem outras formas de avaliação além do IMC. De forma geral, não é difícil reconhecê-la, porém, para um diagnóstico que se identifiquem os níveis de risco, são necessárias algumas formas de quantificação.

A pesagem hidrostática ou submersa era considerada como a técnica padrão-ouro para avaliação do peso corporal. Recentemente, as técnicas de imagem, tais como ressonância magnética (ROSS et al., 1992), tomografia computadorizada (THAETE et al., 1995) e absorciometria com raios-x de dupla energia (dexa); (ERSELCAN et al., 2000) têm sido alternativas de maior precisão. Porém, o custo e os equipamentos necessários dificultam o uso na prática clínica. Segundo Peterson, Carpenter e Brock (2003), como alternativas relativamente mais acessíveis, encontram-se disponíveis a medida da prega cutânea, ultrassonografia (STOLK, et al., 2001), análise de bioimpedância (KUSHNER et al., 1990) e ainda espectroscopia por raios infravermelho (THOMAS et al., 1997) todas com o mesmo objetivo, avaliar o peso para se chegar a um diagnóstico.

Na prática clínica, a combinação de massa corporal e distribuição de gordura seria a melhor opção para preencher a necessidade de avaliação clínica (MOLARIUS et al., 1999). Deve-se atentar que não há avaliação perfeita para o diagnóstico do sobrepeso e/ou obesidade. Recentemente, tem-se notado que a distribuição de gordura é um fator de maior importância para melhor condição de saúde (RANKINEN et al., 1999).

A avaliação da distribuição de gordura corpórea pode ser feita pela relação cintura-quadril (RCQ), considerada pela OMS como um dos critérios para caracterizar a síndrome metabólica e também está associada ao risco de comorbidades. A RCQ é obtida pela divisão dos perímetros da cintura (cm) e do quadril (cm) para obesidade central, apresentando valores de corte de 0,90 para homens e 0,85 para mulheres (PEREIRA; MARINS; SICHIERI, 1996). Entretanto, a medida da

circunferência abdominal consegue refletir melhor o conteúdo de gordura visceral que a RCQ e também se associa muito à gordura corporal total (POULIOT et al., 1994).

A TABELA 2 apresenta o ponto de corte para risco cardiovascular aumentado, que corresponde à medida de circunferência abdominal igual ou superior a 94 cm em homens e 80 cm em mulheres caucasianos (WHO, 2006).

TABELA 2 - Circunferência abdominal e risco de complicações metabólicas associadas com obesidade em homens e mulheres.

Circunferência abdominal		
Risco de complicações	Homem	Mulher
Aumentado	> 94	>80
Aumentado substancialmente	>102	>88

Além disso, a relação entre circunferência abdominal e gordura corporal também se difere segundo a idade e grupos étnicos (DEURENBERG et al., 1999). Deste modo, a Internacional Diabetes Federation (IDF) sugeriu um novo ponto de corte que difere entre etnias, de acordo com a TABELA 3 (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2006).

TABELA 3 - Referência do Ponto de corte da circunferência de cintura (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2006).

Grupo étnico	Sexo	Circunferência de cintura (cm)
Europeus	Homem	>94
	Mulher	>80
Sul-asiáticos	Homem	>90
	Mulher	>80
Chineses	Homem	>90
	Mulher	>80
Japoneses	Homem	>85
	Mulher	>90

Sugere-se que a associação entre a medida da circunferência abdominal com o IMC pode proporcionar uma forma combinada de avaliação de risco e ajudar a diminuir os obstáculos de cada uma das avaliações isoladas (MOLARIUS et al., 1999). Em resumo, a avaliação de risco com a associação destas medidas está apresentada na TABELA 4.

TABELA 4. Combinação das medidas de circunferência abdominal e IMC para avaliar a obesidade e doença cardiovascular (REXRODE et al., 1998).

Risco de complicações metabólicas	IMC kg/m²	Circunferência abdominal (cm)	
		Homem 94-102	102+
		Mulher 80 - 88	88+
Baixo peso	< 18,5	-	-
Peso saudável	18,5 – 24,9	-	Aumentado
Sobrepeso	25,0 – 29,9	Aumentado	Alto
Obesidade	>30,0	Aumentado	Muito Alto

1.1.2 TRANSIÇÃO NUTRICIONAL E A EPIDEMIA DA OBESIDADE

Considerada como uma alteração na estrutura populacional associada ao desenvolvimento socioeconômico, a transição demográfica é acompanhada pela transição epidemiológica, sendo caracterizada em função do maior envelhecimento e por alterações no padrão de doenças. Para caracterizar as alterações nos padrões dietéticos e no estado nutricional que se associam às doenças crônicas, como diabetes e doenças cardiovasculares, o termo transição nutricional tem sido utilizado (AMUNA; ZOTOR, 2008).

Ainda não completamente compreendido, a epidemia da obesidade está relacionada com alterações comportamentais e ambientais, especialmente de hábitos alimentares e de atividade física dos indivíduos. Com a globalização, os alimentos industrializados ricos em açúcar e gordura tem tomado cada vez mais o espaço da alimentação tradicional. Consequentemente, a obesidade mostra taxas continuamente crescentes (POPKIN, 2006).

Estudos demonstraram que a obesidade afeta 641 milhões de adultos ou 13% da população mundial adulta e pode chegar a até 20% em 2025. O número de obesos mais do que duplicou desde 1975. Atualmente, um em cada oito adultos é obeso e estima-se que até 2025 este

número deve aumentar para um em cada cinco. Em homens, a obesidade triplicou de 3,2% da população em 1975 para 10,8% em 2014 (cerca de 266 milhões de pessoas). E nas mulheres, cresceu de 6,4% em 1975 para 14,9% em 2014 (cerca de 375 milhões) (N. C. D. RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

Em 2014, as pessoas mais gordas do mundo viviam nos países da Polinésia e Micronésia, onde 38% dos homens e mais de metade das mulheres eram obesos. Cerca de 118 milhões dos obesos do mundo vivem nos Estados Unidos, no Reino Unido, na Irlanda, Austrália, no Canadá e na Nova Zelândia (N. C. D. RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 82 milhões de pessoas apresentaram o IMC igual ou maior do que 25, ou seja, são considerados com sobrepeso ou obesidade, chegando a aproximadamente 60% da população. Os dados mostraram ainda que, existe uma prevalência maior de excesso de peso no sexo feminino chegando a 58,2 % e 55,6 % no sexo masculino (IBGE, 2015).

De acordo com o levantamento realizado pelo IBGE, o excesso de peso aumenta com a idade, mostrando ser mais rápido para os homens, chegando a 50,4 % na faixa de 25 a 29 anos. Contudo, para mulheres, a partir da faixa etária de 35 a 44 anos a prevalência do excesso de peso (63,6%) ultrapassa a dos homens (62,3%), chegando a mais de 70,0% na faixa de 55 a 64 anos (IBGE, 2015).

Os dados mostraram ainda que a obesidade acomete um em cada cinco brasileiros maiores de 18 anos em 2013 (20,8%), sendo que o percentual é mais alto entre as mulheres (24,4% contra 16,8% dos homens). Em dez anos, a obesidade entre mulheres de 20 anos ou mais passou de 14,0% em 2003, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), para 25,2% em 2013, de acordo com a PNS, pesquisa nacional de saúde. Entre os homens, o crescimento foi menor, de 9,3% para 17,5% (IBGE, 2015).

O acúmulo de gordura abdominal também foi mais frequente no sexo feminino, atingindo 52,1% das mulheres e 21,8% dos homens. Enquanto 52,1% das mulheres tinham uma circunferência da cintura maior ou igual a 88 cm, o que caracteriza obesidade abdominal, 21,8% dos homens media 102 cm ou mais nessa parte do corpo (IBGE, 2015). O excesso de gordura

abdominal está associado ao risco de doenças cardiometabólicas, como obesidade, diabetes e hipertensão arterial (MARIATH, 2007).

1.1.3 ETIOLOGIA

A etiologia da obesidade é considerada multifatorial, derivando da influência mútua de genes, ambiente, estilos de vida e fatores emocionais. Na maioria dos casos, ocorre devido alteração do balanço energético, favorecido pelo aumento do consumo calórico, pela diminuição do gasto energético ou por ambos (SWINBURN; RAVUSSIN, 1994).

Para definir o gasto energético diário utiliza-se a taxa metabólica basal (60% a 70%), o gasto de energia com atividade física que representa cerca de 20% a 30% do gasto energético total em adultos e o efeito térmico dos alimentos (10%) (SWINBURN; RAVUSSIN, 1994).

Na avaliação do consumo, o hábito alimentar é utilizado, muita das vezes, por meio de recordatórios, este método consiste em recordar, definir e quantificar sua ingestão alimentar do dia anterior. O recordatório de 24 horas não representa a ingestão habitual, é dependente da memória do entrevistado e necessita de um entrevistador treinado. Apresenta muitas vantagens: é rápido, relativamente barato e pode ser aplicado em analfabetos. (FISBERG; MARTINI; SLATER, 2005).

A hereditariedade pode influenciar um indivíduo a se tornar obeso. Estudos mostram que um mecanismo molecular para a obesidade pode explicar o porquê um dos gêmeos pode ser acima do peso, enquanto o outro pode ser magro. Alterações na microbiota intestinal, alterações epigenéticas, alterações na atividade do gene, que ocorrem quando as moléculas ligam-se ao DNA ou às proteínas que a envolvem, gerando conjuntos de genes em "on" ou "off" podem ser fatores que aumentam a propensão à obesidade (DALGAARD et al., 2016).

As modificações epigenéticas são desencadeada por fatores do meio ambiente que podem ser transmitidas de uma geração para a outra, sugerindo que fatores de risco como tabagismo e

hábitos alimentares das mães durante a gravidez tem impacto duradouro sobre o metabolismo de seus filhos. Entretanto, o porquê das alterações epigenéticas promoverem obesidade permanece ainda não esclarecido (DALGAARD et al., 2016).

Sabe-se que sintomas como a ansiedade, depressão, nervosismo e o hábito alimentar modificado por problemas emocionais são comuns em pacientes com sobrepeso ou obesidade, indicando uma relação entre estresse e obesidade (ROSMOND; BJORNTORP, 1998). O estresse pode ser considerado uma consequência da obesidade, quando relacionado a fatores sociais e à discriminação (GORTMAKER et al., 1993).

A obesidade ocorre em maiores taxas na população com maior grau de pobreza e menor nível educacional (MONTEIRO; CONDE; POKIN, 2001). Acredita-se que relacionado com a maior palatabilidade e baixo custo de alimentos de grande densidade energética, com altos teores de açúcar e gorduras (DREWNOWSKI, 1997).

A oscilação de peso mostra efeito na saúde a longo prazo, mostrando relação para a saúde cardiovascular, doenças crônicas e câncer (MAGALHÃES et al., 2014).

1.1.4 TRATAMENTO NÃO FARMACOLÓGICO

O tratamento da obesidade é complexo e multidisciplinar. Não existe nenhum tratamento farmacológico em longo prazo que não envolva mudança de estilo de vida. Há várias opções de tratamento para a obesidade e o sobrepeso. Quanto maior o grau de excesso de peso, maior a gravidade da doença (JEFFREYS et al., 2003).

Apesar da utilização de medicamentos, as dietas de baixo valor calórico e, às vezes, cirurgia e as mudanças de estilo de vida por meio de técnicas cognitivo comportamentais são ainda essenciais. Para a escolha do tratamento deve-se fundamentar a gravidade do problema e na presença de complicações associadas.

Para o tratamento da obesidade com a intervenção com medicamentos, estabeleceu-se alguns critérios como: IMC de 30 kg/m² ou 25 kg/m² associado a morbidades e falha na perda de peso com o tratamento não farmacológico (JEFFREYS et al., 2003).

Determinadas dietas com o objetivo de emagrecimento são nutricionalmente adequadas e com hábitos alimentares corretos. Algumas mostram-se como dietas milagrosas, que levam a práticas irracionais, que podem ser perigosas e são aderidas pela população, pela promoção da mídia, por meio das celebridades ou por serem consideradas novidade.

1.2 DISFUNÇÃO CARDIOVASCULAR E OBESIDADE

1.2.1 TECIDO ADIPOSEO

Anteriormente, o tecido adiposo era considerado apenas como um simples reservatório de energia. Entretanto, recentemente o tecido adiposo passou a ser visto como um complexo órgão com inúmeras funções, contribuindo para o sistema endócrino. Estudos demonstraram a existência de substâncias pró-inflamatórias geradas pelo tecido adiposo, as adipocinas. A função endotelial, aterogênese, sensibilidade à insulina e balanço energético mostraram sofrer a ação das adipocinas, que influenciam nos processos regulatórios. Dessa forma, doenças como diabetes, arteriosclerose, hipertensão arterial, as dislipidemias, a doença arterial coronariana tem o tecido adiposo como responsável por suas fisiopatogênias (GOMES et al., 2010).

A probabilidade de um indivíduo desenvolver eventos que possam afetar a saúde cardiovascular, é chamado de fator de risco cardiovascular (CHAVES et al., 2009). Entretanto, os indicadores de risco são classificados em modificáveis e não modificáveis. Quando são modulados através de hábitos de vida e/ou medicação são considerados modificáveis. Isto inclui tabagismo, alcoolismo, obesidade, sedentarismo e níveis plasmáticos de colesterol. Entre os não modificáveis, podemos considerar faixa etária, sexo, etnia e fatores hereditários. Estes

indicadores implicam no aumento da morbimortalidade cardiovascular, de acordo com o maior número de fatores de risco associado (MARTINS et al., 2011).

Todas as artérias são circundadas por uma quantidade significativa de tecido adiposo, apresentando ações parácrinas e endócrinas, especialmente sobre a função vascular, além das funções estruturais. Na obesidade, a ação de citocinas pró-inflamatórias é potencializada, tornando o tecido adiposo disfuncional e a produção de fatores protetores é inibida.

O tecido adiposo perivascular produz adiponectina, que possui ação de relaxamento dos vasos, igualmente o óxido nítrico. Em indivíduos obesos, a produção do tecido perivascular passa a ser a interleucina-6 e TNF α e outras diferentes substâncias atuantes sobre a tensão e função vascular. Estudos indicam que a produção acentuada de espécies reativas de oxigênio pelo tecido adiposo perivascular reduzem a biodisponibilidade do óxido nítrico. Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não são totalmente conhecidos (WAJCHENBERG, 2000). Assim, acredita-se que a disfunção do tecido adiposo perivascular tenha influência sobre as doenças metabólicas (SIPPEL et al., 2014).

1.2.2 ENDOTÉLIO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Os vasos sanguíneos possuem paredes formadas de camadas de músculo liso, tecido conjuntivo elástico e fibroso. O endotélio é o revestimento de todos os vasos sanguíneos e apresenta funções importantes para regulação de pressão arterial, absorção de materiais e crescimento de vasos sanguíneos (SILVERTHORN, 2003).

O endotélio é uma camada única e contínua de células em forma de fuso que faz a separação do interstício e a parede vascular. Com a força de cisalhamento do fluxo sanguíneo (“shear stress”), age sobre as células endoteliais conduzindo a produção de NO, pela enzima NO-sintase endotelial (eNOS) (BAHIA et al., 2006).

A célula endotelial em adultos tem período de vida esperado de cerca de 30 anos e após este período, tendem a morrer e serem substituídas. Entretanto, o endotélio regenerado não possui a mesma capacidade de liberação de fatores que inibem contração e também mostra diminuição de respostas de estímulos (BAHIA et al., 2006).

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória (BAHIA et al., 2006).

Como principais mediadores responsáveis pelo vasorelaxamento do músculo liso vascular liberados pelo endotélio temos a prostaciclina (PGI₂); (MONCADA et. al, 1976), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF); (FELETOU; VANHOUTTE, 1996), e o óxido nítrico (NO); (FURCHGOTT; ZAWADSKI, 1980). Já como vasoconstritores, são liberados pelo endotélio o ânion superóxido (VANHOUTTE; KATUSIC, 1988), a endotelina I (ET-1); (YANAGISAWA et. al., 1988), a angiotensina II (VELTMAR; GOHLKE; UNGER, 1991) e alguns metabólitos que são derivados do ácido araquidônico (AA), como exemplo o tromboxano (TXA₂); (MILLER; VANHOUTTE, 1985). Em condições fisiológicas, quando não há disfunção endotelial, ocorre um equilíbrio entre a liberação destas substâncias, entretanto com uma tendência à vasodilatação (BAHIA et al., 2006).

Na célula endotelial vascular, o NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina, catalisado pela enzima óxido-nítrico-sintase (NOS); (BEHRENDT; GANZ, 2002). Entre suas funções, destaca-se a ação vasodilatadora, inibição da adesão e agregação de plaquetas, inibição da proliferação de células do músculo liso vascular, limitação do recrutamento vascular de leucócitos e inibição da produção do fator tecidual, fator este determinante na geração de trombos. Em contrapartida de acordo com Kinlay, Libby e Ganz (2001) e com Yang (2012), a ET1 tem ação contrária ao NO, mostrando um efeito vasoconstritor, capacidade de aumentar atividade central e periférica do sistema nervoso simpático, ação natriurética, além de estimular o sistema renina-angiotensina-aldosterona (KINLAY; LIBBY; GANZ, 2001; YANG et al., 2012).

Furchgott e Zawadzki foram os primeiros autores que evidenciaram a função do endotélio, por meio da relação entre a acetilcolina e a vasodilatação *in vivo*. Analisaram que em anéis de aorta, a acetilcolina não produzia a vasodilatação esperada, e sim a vasoconstrição. Este fato ocorria devido a remoção involuntária do endotélio vascular durante a preparação do vaso. Quando se preservou a integridade do endotélio vascular, pôde-se observar uma resposta de relaxamento à acetilcolina. Esta resposta foi caracterizada como sendo mediada pelo fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), substância mais tarde sendo reconhecida molecularmente como sendo o NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

A célula endotelial também conta com o auxílio de mecanismos antioxidantes que auxiliam no controle da homeostasia, com destaque para a enzima superóxido dismutase (SOD), que neutraliza a ação do ânion superóxido que é liberado pelos sistemas aeróbios. Além disso, secreta ainda substâncias anti-inflamatórias, como prostaciclina, heparanas e peptídeos natriuréticos. Em conjunto, o equilíbrio fisiológico na liberação/produção destas substâncias impede a gênese e o desenvolvimento da aterosclerose, uma vez que conserva o padrão do fluxo sanguíneo laminar saudável (BAHIA et al., 2006).

Ações antitrombóticas também são percebidas no endotélio. A produção do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) consegue evitar a trombose local, pela secreção de heparanas e trombomodulinas, mantendo nas células musculares lisas, com baixa proliferação, migração e apoptose reservando a morfologia vascular normal (BAHIA et al., 2006).

No processo inflamatório, moléculas de adesão são expressas pelo endotélio. As selectinas e integrinas permitem a ativação, o rolamento e a adesão de leucócitos à sua superfície. A oxidação da molécula LDL (lipoproteína de baixa densidade) consegue ativar a proteína-quinase C e um fator de transcrição nuclear (NF- κ B), por conseguinte o aumento da transcrição de vários genes. Portanto, a produção excessiva da resposta inflamatória, pode induzir a disfunção endotelial, tendo como consequência o início da doença aterosclerótica por meio de eventos pró-coagulantes, diferenciação das células musculares lisas vasculares e macrófagos. Similarmente, a diminuição da atividade biológica do NO (designada como disfunção endotelial) pode desencadear a doença aterosclerótica vascular e sua avaliação pode ser considerada um marcador de risco de aterosclerose (BEHRENDT; GANZ, 2002).

A disfunção endotelial refere-se a uma alteração da vasodilatação dependente de endotélio e desregulação das interações endotélio-células sanguíneas, que acarretam uma inflamação localizada e posteriormente lesões vasculares e trombose. Em geral, ocorrem devido ao desequilíbrio entre a liberação de (ou respostas intracelulares à) substâncias contráteis e relaxantes, em favor de substâncias contráteis. Este desequilíbrio ocorre com frequência na presença de fatores de risco para doenças cardiovasculares. Sabe-se que os efeitos vasoconstritores se superpõem aos efeitos vasodilatadores, comumente como consequência da diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), com perda de sua ação vaso-protetora (BEHRENDT; GANZ, 2002).

Como causa de disfunção endotelial e maior incidência de doença aterosclerótica temos fatores como hipercolesterolemia, tabagismo, estados de resistência insulínica, diabetes mellitus, hipertensão arterial, hiper-homocisteinemia (MONTENEGRO NETO et al., 2008). As doenças cardiovasculares (DCVs) são as causas mais comuns de morbidade e principal motivo de mortalidade mundial (RIBEIRO; COTTA; RIBEIRO, 2012).

Os eventos mais comuns que ocorrem nas doenças cardiovasculares tem mecanismos fisiopatológicos de bloqueio do fluxo sanguíneo pela formação de placas ateroscleróticas nos vasos, que ocorre devido a produção desregulada de colesterol no organismo, denominada dislipidemia. É caracterizada por elevação dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol e redução de HDL-colesterol, sendo considerada como fator de risco clássico para doença arterial coronariana (DAC). (NELSON; COX, 2014).

De acordo com Singh e colaboradores (2010) e Mehta e Li (2001), dentre os fatores de risco, há mais de uma década foi evidenciado que a hipertensão e a hipercolesterolemia frequentemente apresentam-se associadas, estando intimamente relacionadas, sendo fatores de risco determinantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SINGH et al., 2010; MEHTA, 2001).

1.3 ÓXIDO NÍTRICO

1.3.1 CARACTERÍSTICAS, SÍNTESE E METABOLISMO DO NO

Habitualmente no ar atmosférico, o NO é encontrado em pequenas quantidades, sendo considerada uma molécula gasosa simples, altamente tóxica devido à existência de uma radical livre, tornando altamente reativo (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000), com meia vida curta de 3 a 60 segundos (KIECHLE; MALINSKI, 1993).

O NO era considerado apenas uma substância pertencente a classe de poluentes ambientais e potenciais carcinógenos. Atualmente, a comunidade científica já se aprofundou em pesquisas, adicionando conhecimentos sobre o NO, sendo ele considerado mensageiro (ou sinalizador inter e intracelular) e como toxina, agindo em inúmeros processos fisiológicos e patológicos (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

O processo de identificação da síntese endógena foi lento e se deu através de pesquisas realizadas na década de 80, que inicialmente demonstraram a produção de nitratos em camundongos, surgindo as primeiras evidências de óxidos de nitrogênio no metabolismo. Em 1985, foi evidenciada a produção de nitritos e nitratos através macrófagos ativados por lipopossacárides bacterianos (STUEHR; MARLETTA, 1985). Posteriormente, constatou-se que a L-arginina era o substrato e a L-citrulina era formada como co-produto. Além disso, Marletta identificou o NO como o produto da reação de oxiredução da L-arginina (MARLETTA et al., 1988).

Durante a mesma década, Furchgott investigava o fator de relaxamento derivado do endotélio vascular (endothelium-derived relaxing factor – EDRF), que, posteriormente, foi identificado como sendo o NO o responsável pela atividade biológica do EDRF (FURCHGOTT; ZAWADSKI, 1980).

Quando diluído, o NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. O NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica (SNYDER; BREDET, 1992).

A formação do NO ocorre através da reação química em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e Ca²⁺ sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO, indicada na FIGURA 3 (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

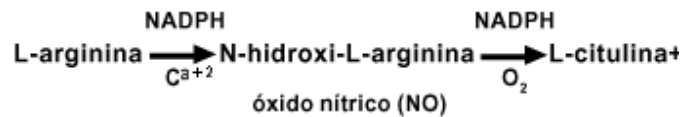


FIGURA 3 – Síntese do óxido nítrico a partir da l-arginina

Considerada como um aminoácido semi-essencial, a L-arginina é produzida no organismo, entretanto em quantidade insuficiente para todas necessidades. É utilizada também na síntese de creatinina e no fornecimento de ornitina, além da sua participação no ciclo da ureia (KONTUREK; KONTUREK, 1995).

A necessidade de L-arginina no metabolismo é contínua, sendo assim, nos túbulos proximais renais acontece a neo-síntese a partir da citrulina. As proteínas que são ingeridas são degradadas em arginina e podem ser absorvidas e utilizadas no ciclo da ureia ou transformadas em ornitina no epitélio intestinal e juntamente com a glutamina secretada como glutamato, são convertidas em citrulina. A citrulina é absorvida e transformada em arginina no ciclo renal, de acordo com a FIGURA 4. Do mesmo modo, a citrulina pode ser convertida de forma direta em L-arginina no citoplasma das células endoteliais e dos macrófagos (KONTUREK; KONTUREK, 1995).

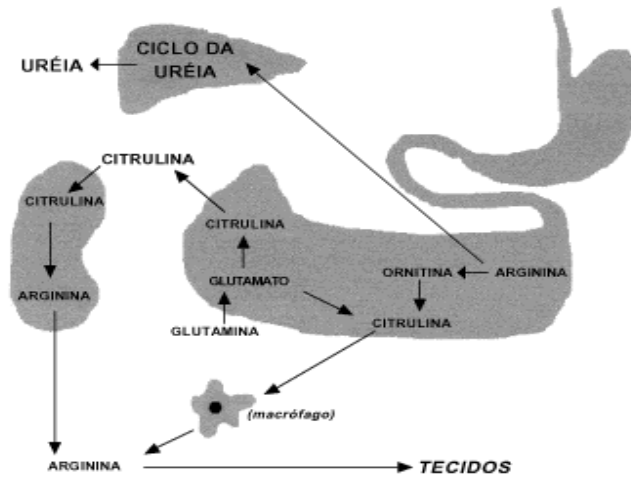


FIGURA 4 – Esquema de absorção intestinal da arginina (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000)

Análogos da L-arginina como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) e N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), conseguem inibir a síntese enzimática da citrulina (SNYDER; BREDET, 1992) e apresentam grande importância na pesquisa para os efeitos do NO nos tecidos, já que a substituição da L-arginina por análogos inibe a produção do NO e seus efeitos.

A demonstração direta da produção de NO não é fácil, sendo em geral realizada de maneira indireta. As pesquisas consideram a concentração de nitrito e nitrato como prova da produção do NO, devida a sua evanescência. E ainda, outro método para a demonstração do NO é por meio do bloqueio de sua síntese através da adição de um dos análogos mencionados acima (L-NNA ou L-NMMA ou L-NAME). Desta forma, a ausência do efeito estudado é atribuída pela não formação do NO, devido ao bloqueio da reação da L-arginina em L-citrulina (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

1.3.2 SINTASES DO NO E RESPOSTAS VASCULARES MEDIADAS PELO NO

Várias células podem sintetizar o NO por meio de hemoproteínas da família citocromo P450-like, denominadas de NO síntases (NOS); (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). As NOS são dependentes de NADPH, O₂, biopterinas e flavinas para cumprir sua atividade. Até então, foram isoladas e clonadas três

isoenzimas, duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas respectivas de cNOS e iNOS, como mostra a FIGURA 5 (MARLETTA, 1994).

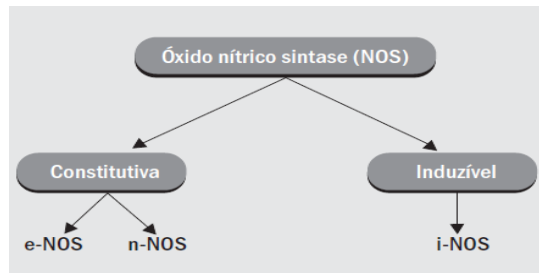


FIGURA 5 - Isoformas da NO Sintase (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A Isoforma I ou cNOS, existente no cérebro, foi inicialmente purificada no cerebelo de camundongo e porcos (SCHMIDT et al., 1991). Esta enzima pode ser chamada também de bNOS (brain NO synthase) ou nNOS (neuronal NO synthase). Esta proteína hoje em dia é clonada de cérebros humanos e conserva uma sequência de aminoácidos entre espécies, mostrando ter 93% de identidade entre humanos e camundongos (KONTUREK; KONTUREK, 1995).

Não presente de modo habitual, a iNOS ou Isoforma II, conhecida também como macNOS (macrophage NO synthase), esta isoforma não é expressa constitutivamente, sendo induzida nos macrófagos e outras células por lipopolisacárides bacterianos e/ou citocinas (STUEHR; MARLETTA, 1985). Vários estudos consideraram que qualquer célula tem a capacidade de produção da iNOS com estímulos adequados. Quando é induzida, a iNOS pode produzir NO por um longo tempo e isso mostra o envolvimento com alguns processos patológicos.

A eNOS ou Isoforma III é expressa constitutivamente nas células endoteliais, também podendo ser chamada cNOS ou EC-NOS (endothelial constitutive NO synthase).

Ainda podem ser caracterizadas como de baixo ou alto débito de acordo com a atividade da NOS. Consideradas de baixo débito, as isoformas I e III são relacionadas com processos homeostáticos como o controle imediato da pressão arterial, peristaltismo e neurotransmissão. Classificada de menor débito, a eNOS quando estimulada conserva-se em ação por horas em mecanismo sinérgico induzido pelo NO produzido (ZHANG et al., 1994).

Outra classificação das NOS é determinada pela sua dependência de cálcio para ativação. O Ca^{2+} é um importante sinalizador citoplasmático, atuando a partir de ligações com proteínas intracelulares receptoras específicas. Uma destas proteínas citoplasmáticas (Ca^{2+} -receptoras) é a calmodulina, encontrada em praticamente todas células (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Quando ocorre a ligação do Ca^{2+} à calmodulina forma-se um complexo Ca^{2+} /calmodulina. Em concentrações intracelulares baixas de Ca^{2+} , o complexo se desfaz e a atividade enzimática é desativada. Este mecanismo Ca^{2+} /calmodulina é responsável por ativar as isoformas de NOS constitutivas. O mecanismo de ação da iNOS depende da concentração intracelular de Ca^{2+} somente para ativação e a queda do Ca^{2+} intracelular não inibe a atividade da iNOS. De tal modo, classificam-se as NOS como cálcio-dependentes, as isoformas I e III e cálcio-independentes a isoforma II, conforme a FIGURA 6 (NATHAN; XIE, 1994).

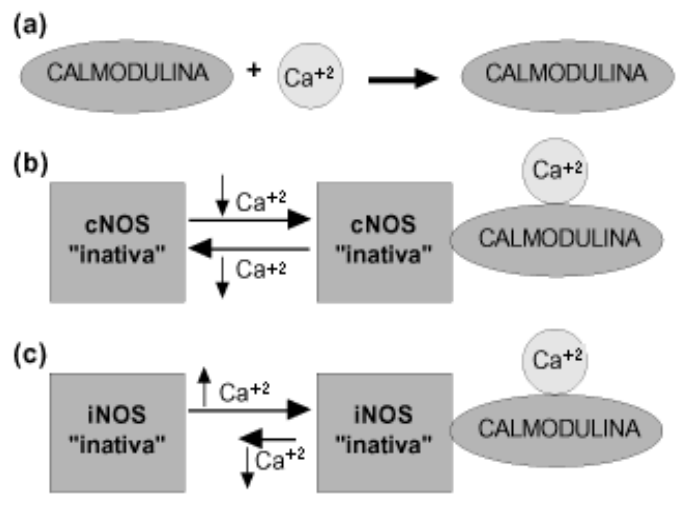


FIGURA 6 – Interação da Calmodulina-Cálcio e iNOS (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

A acetilcolina (ACh) produz a vasodilatação através da estimulação de receptores muscarínicos do subtipo M3, situado nas células endoteliais vasculares. Estes receptores quando ocupados por agonistas, levam ao aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} pela ativação da via fosfolipase C-inositol 1,4,5 -trifosfato (PLC-IP₃), que assim se liga à calmodulina (CaM), formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} /CaM). Este complexo consegue assim ativar a

eNOS que é capaz de produzir NO através do aminoácido L-arginina (L-Arg.). Quando formado, o NO difunde-se pela musculatura lisa, onde ocorre a ligação com o ferro prostético heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que catalisa a síntese de guanosina monofostato cíclica (GMPc) a partir da guanosina trifostato (GTP) (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002) (FIGURA 7).

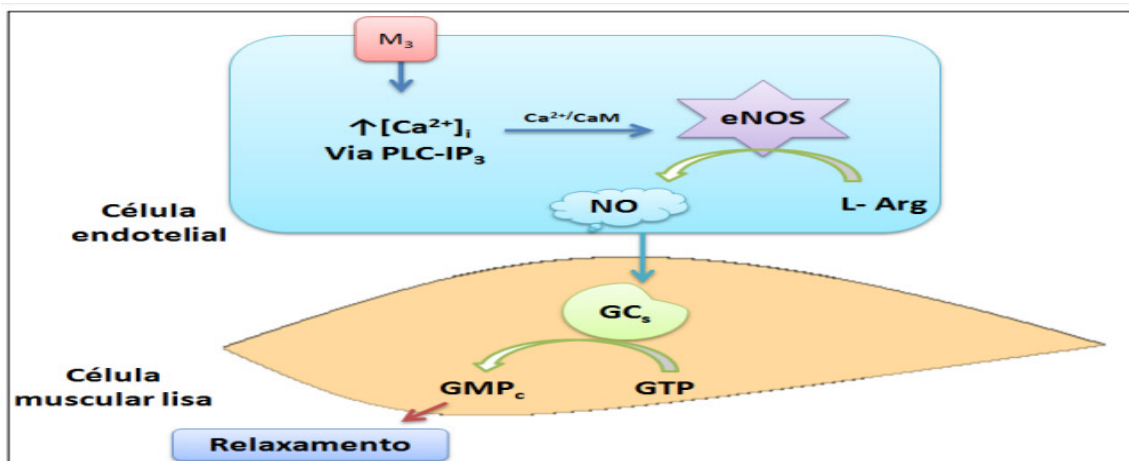


FIGURA 7 – Representação esquemática do relaxamento via NO-GMPc (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

O relaxamento do músculo liso e, portanto, o aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos e redução da pressão arterial, ocorrem em resposta ao aumento da concentração intracelular do segundo mensageiro GMPc (MONCADA et al., 1976). Estudos propõem vários mecanismos para esclarecer a atividade de relaxamento decorrente do aumento dos níveis de GMPc induzido pelo NO, incluindo a inibição da geração de IP₃, o aumento do sequestro e redução do influxo de Ca^{2+} citossólico, a desfosforilação da cadeia leve de miosina, ativação de proteínas quinases e também a estimulação de Ca^{2+} -ATPase da membrana e abertura de canais para K^+ (LUCAS et al., 2000). Além disto, estudos tem demonstrado que o NO pode agir por uma via independente de GMPc que ocorre pela ativação direta de canais de K^+ dependente de cálcio (BOLOTINA et al., 1994).

O NO é considerado um mensageiro intracelular de destaque nos mamíferos superiores. Por sua alta difusibilidade, a sinalização do NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos e, por este motivo, é utilizado em funções fisiológicas que necessitam de uma resposta rápida (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

A liberação contínua do NO no endotélio vascular atribui a este um importante papel na manutenção do fluxo sanguíneo e controle do extravasamento tecidual. O NO produzido no endotélio tem ação vasodilatadora no organismo. Durante o exercício físico ocorre aumento do débito cardíaco e redistribuição do fluxo sanguíneo para musculatura esquelética e circulação coronariana, aumentando a liberação de NO nestes tecidos. Este mecanismo é mediado pela ativação da cNOS (eNOS ou isoforma III) e a prática regular de atividade física pode potencializar a expressão desta enzima (SHEN et al., 1995).

O NO também controla a adesão de elementos sanguíneos (leucócitos e plaquetas) ao endotélio, desta forma, diminuindo a permeabilidade vascular (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991).

1.4 . ESTRESSE OXIDATIVO

1.4. 1 ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A produção exacerbada de radicais livre que ocorre durante quadros de fatores de risco cardiovascular tem papel importante na lesão celular devido ao estresse oxidativo . Desta forma, moléculas ativas designadas espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) são formadas e estas reagem com o NO, inativando-o. A produção de EROs é resultado de um processo fisiológico do metabolismo aeróbio celular. Entretanto, níveis anormais acontecem em condições patológicas. Um dos principais EROs é o radical superóxido, que reage de forma rápida e favorável com o NO, resultando na inibição de sua bioatividade e gerando espécies reativas oxidantes secundárias, como o peroxinitrito (ONOO-), que é capaz de oxidar moléculas de LDL, ocasionar disfunção vascular e nitrificar os resíduos de tirosina de proteínas (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003).

O equilíbrio entre estas moléculas é determinante da função celular, através da regulação de proteínas específicas e lipídeos. Deste modo, a disfunção endotelial resultante da ação dos

radicais livres pode ser descrita como uma disfunção da sinalização redox vascular, isto é, uma transdução de sinais celulares mediada por reações de transferência de elétrons, que envolve radicais livres que apresentam um elétron desemparelhado na última camada (BAHIA et al, 2006).

A produção exacerbada de EROs ou a redução das defesas antioxidantes acarretam a toxicidade celular de duas formas: através do desequilíbrio na sinalização das células vasculares com as EROs atuando como segundo mensageiro; e pela toxicidade direta das EROs através da alta reatividade destas espécies contra os componentes químicos celulares que podem danificar o DNA e levar à apoptose (TANIYAMA; GRIENDLING, 2003).

Como uma das vias finais predominantes do estresse oxidativo verificamos a perda da bioatividade do NO, com consecutiva redução da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio, sendo este considerado um dos vários processos do complexo desequilíbrio redox e dos múltiplos déficits funcionais relacionados a disfunção endotelial (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986).

O endotélio demonstra função essencial no início e na perpetuação do processo inflamatório crônico vascular, especialmente por sua capacidade de secretar citocinas e moléculas de adesão. Em estado normal, o endotélio não permite a aderência de leucócitos, contudo em fases iniciais de aterosclerose, as moléculas de adesão são expressas nas células endoteliais. A perpetuação do processo inflamatório ocorre devido a liberação contínua de citocinas pelo endotélio, gerando assim o acúmulo de lipídios e a interferência na atividade das células musculares lisa (SZMITKO et al., 2003).

1.4.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E RADICAIS LIVRES

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas as principais causas de mortalidade nas populações de países desenvolvidos, sendo assim necessário o controle da proliferação dessas doenças para reduzir o número de mortes súbitas e os custos de intervenção (LABARTHE.;

DUNBAR, 2012). Os radicais livres (RL), os antioxidantes e os cofatores são áreas que podem contribuir para reduzir o impacto de doenças e do processo de envelhecimento. A compreensão desses eventos pode contribuir para prevenir ou reduzir a incidência dessas doenças e contribuir para qualidade de vida (RAHMAN, 2007).

Vários autores elucidaram o termo “radical livre” e muitos adotaram a definição que determina como uma “espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada mais externa” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Dentro desta definição, estão englobados o átomo de hidrogênio, oxigênio molecular e a maioria de íons de metais de transição. A nomenclatura Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) compreende as espécies radicais livres e outras que não possuam elétrons desemparelhados, mas que são muito reativas em virtude de sua instabilidade (RIBEIRO-FILHO et al., 2005).

No sistema biológico, os radicais livres são provenientes de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Essas moléculas são partes ou grupos de moléculas designadas espécies reativas de oxigênio EROs (ROS – reactive oxygen species), espécies reativas de nitrogênio (RNS – reactive nitrogen species) e espécies reativas de enxofre (RSS – reactive sulphur species) (RAHMAN, 2007). As principais EROs dividem-se em dois grupos: os não radiculares (oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso) e os radiculares (hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$). Dentre os RSS, podem ser citados o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Dentre todas estas espécies, algumas podem ser altamente reativas para o organismo atacando apenas lipídios, enquanto outras são reativas com esses e com proteínas e DNA (ANDRADE JÚNIOR, 2005).

Por diferentes mecanismos de ação, os radicais livres podem reagir com moléculas circundantes pela adoção de elétrons de radicais, recepção de elétrons e oxidação de radicais, através das seguintes reações de abstração de hidrogênio, reação de adição, reação de auto aniquilação e através de dismutação (ANDRADE JÚNIOR, 2005).

Estudos corroboram que a produção de ROS, RNS e RSS estão relacionadas a doenças como câncer, doença cardiovascular, incluindo aterosclerose e derrame, doenças neurológicas, doenças renais e hepáticas, hipertensão, artrite reumatoide, síndrome da angustia respiratória do adulto, doença autoimune, inflamação, doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento, diabetes *mellitus* e suas complicações, autismo, doença de Alzheimer e Parkinson (RAHMAN, 2007).

Em condições fisiológicas, o organismo é capaz de se defender dos danos causados pelas EROs por meio do uso de enzimas que mantem a homeostase de EROs em baixos níveis. Porém, em situações de disfunção celular e estresse, os níveis de EROs podem se elevar drasticamente e gerar dano celular expressivo. Deste modo, o estresse oxidativo coopera significativamente para a patogênese de doenças inflamatórias (LUI; HOTCHKISS, 1995).

Com o intuito de reduzir ou prevenir o dano oxidativo causado pelas EROs, o organismo possui um sistema de defesa antioxidante por ação enzimática. Adicionalmente, a ingestão de antioxidantes dietéticos pode contribuir na manutenção de um estado ideal de antioxidantes no organismo (COROCHO; FERREIRA, 2012).

No organismo, os radicais livres são gerados de processos inflamatórios, como fagócitos, isquemia e exercício físico. De outro modo, fatores extremos que podem acarretar a produção de radicais livres são o tabagismo, poluentes ambientais, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e ozônio (SINGH et al., 2010). A FIGURA 8 demonstra fontes endógenas e exógenas de EROs e mecanismos de defesa.

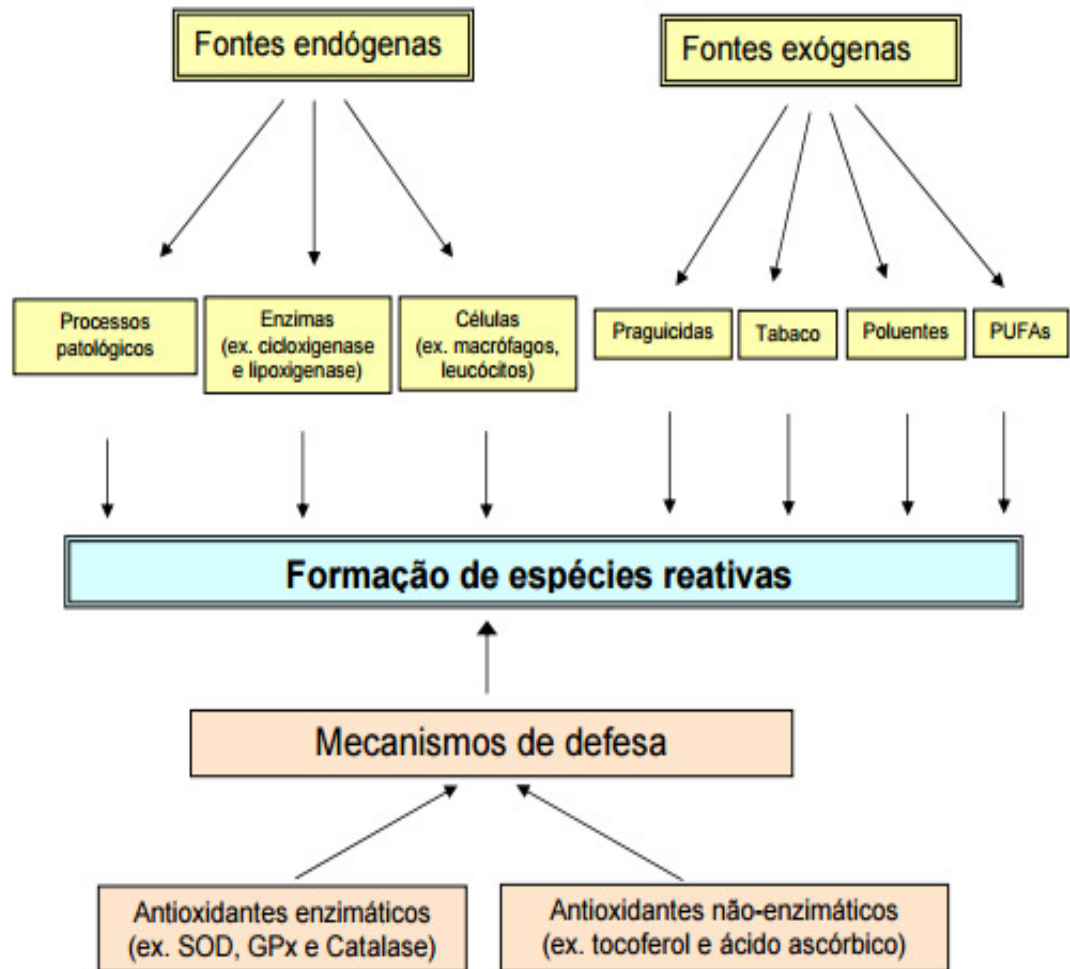


FIGURA 8. Esquema das principais fontes que levam a formação de espécies reativas e mecanismo de defesa (BIANCHI; ANTUNES, 1998).

O processo de estresse oxidativo ocorre por meio de um desequilíbrio entre compostos antioxidantes e oxidantes, sendo a formação de radicais livres excessiva ou por velocidade de remoção reduzida que levam a oxidação de moléculas e assim perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático (ANDRADE-WARTHA, 2007).

A peroxidação lipídica pode ser definida como reação em cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, dando origem a radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das membranas. (STAHL et al., 2006). Estudos relatam que

danos celulares podem ser encontrados em maior incidência em indivíduos obesos com comorbidades como, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, eventos tromboembólicos, diabetes *mellitus* e neoplasias (ZHANG et al., 2011).

Na década passada, os antioxidantes eram definidos como compostos presentes em pequenas concentrações que são capazes de reduzir ou inibir a oxidação de outras substâncias que retardam, previnem ou promovem o dano oxidativo de uma determinada molécula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Em contrapartida, definiu-se antioxidantes como qualquer substância que é capaz de “varrer” as espécies reativas de oxigênio EROs, ou inibir a produção de EROs ou ainda agir para regular a defesa antioxidante. Além disso, outra propriedade apresentada nestes compostos para de fato serem considerados antioxidantes, é possuir a habilidade de formar um novo radical estável na presença de hidrogênio, evitando assim que ocorra mais oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

1.4.3 OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO

A obesidade é capaz de produzir peroxidação lipídica através de três principais mecanismos (OLUSI, 2002). O indivíduo quando considerado obeso apresenta um maior consumo de oxigênio devido à necessidade metabólica aumentada do miocárdio. Assim, a produção de EROs apresentam-se aumentadas, pelo fato de uma maior respiração mitocondrial. Deste modo, se a produção de EROs ultrapassar a capacidade antioxidante, pode ocorrer o estresse oxidativo e conseqüentemente a peroxidação lipídica (JORDÃO et al., 1998).

Outra forma da qual a obesidade pode aumentar a peroxidação lipídica é por meio da lesão celular que ocorre de forma cumulativa e progressiva pela grande pressão da massa corporal em excesso. Este dano celular libera citocinas, como o fator de necrose tumoral, que gera EROs (JORDÃO et al., 1998).

Como último mecanismo, temos a dieta rica em ácidos graxos, que acarreta alteração no metabolismo do oxigênio devido as moléculas de ácidos graxos possuírem ligações vulneráveis e reações oxidativas que, por conseguinte, levam à peroxidação lipídica (NEVES, 2012).

Intervenções distintas como farmacológicas e cirúrgicas, prática de atividade física para redução de peso corporal, restrição de calorias, mudanças comportamentais vêm sendo recomendadas para tratar a obesidade e conseqüentemente reduzir o estresse oxidativo. As terapias com uso de antioxidantes em doses e no período adequado, parece ser uma boa opção. As medidas que favorecem a perda de peso que se associam à diminuição da redução de oxidantes e melhora da capacidade antioxidante favorecem uma redução dos fatores de risco (HOWARD et al., 2006).

1.5. ANTIOXIDANTES

No momento atual, existe grande interesse em estudos que envolvem antioxidantes, especialmente pelo fato das descobertas sobre as EROs e seus efeitos no organismo. A produção de EROs ocorre de forma natural ou quando ocorre alguma disfunção biológica, assim sendo considerada a oxidação parte primordial no metabolismo aeróbico e do nosso metabolismo. (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Diante do desequilíbrio entre as EROs e os mecanismos de defesa antioxidantes leva-se à instalação do estresse oxidativo. Nesta situação, a utilização de produtos naturais que apresentam potenciais antioxidantes são perspectivas para prevenir danos oxidativos causados pelas EROs. Naturais ou sintéticos, os antioxidantes apresentam elevada estabilidade oxidativa por sua estrutura molecular e assim desempenham ação fundamental para prevenir a oxidação promovida pelos radicais livres (BARBOSA et al., 2008).

A defesa do sistema antioxidante inibe e/ou reduz danos ocasionados pela ação prejudicial dos radicais livres ou EROs. Estas ações ocorrem através de mecanismos que impedem a formação dos radicais livres ou das espécies não radicais, considerada um sistema de prevenção; também por meio de um sistema de varredor que é capaz de impedir a ação ou ainda

proporcionando reparo e reconstituição de estruturas biológicas que foram lesadas, conceituadas como um sistema de reparo (KOURY; DONANGELO, 2003).

Considerado com maior potencial reativo e com extrema instabilidade, o radical (OH^{\bullet}) apresenta maior capacidade de danos oxidativos. Além disso, é o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, que conseqüentemente leva a alterações da função biológica das membranas celulares. Esse radical é capaz de alterar proteínas em relação à sua estrutura e/ou função biológica, sendo que o ataque ao DNA possibilita a ocorrência de mutações (WELCH et al., 2002).

A atividade das enzimas muitas vezes depende da participação de cofatores enzimáticos, em especial os antioxidantes de origem dietética. Estes cofatores se diferenciam de acordo com os compartimentos celulares de ação das enzimas. A SOD pode ser encontradas de duas maneiras, no citoplasma dependente de zinco (SOD-Cu/Zn), e na mitocôndria com a necessidade de manganês (SOD-Mn) (FERREIRA; OLIVEIRA; FRANÇA, 2007).

O sistema antioxidante é dividido em dois mecanismos: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. No sistema não-enzimático de defesa compreendem compostos antioxidantes de origem dietética, destacando as vitaminas, minerais e compostos fenólicos (BIANCHI; ANTUNES, 1998); Já os enzimáticos são subdivididos em defesas primárias e secundárias. A defesa primária é formada por três enzimas de importância que agem prevenindo a formação dos radicais livres ou neutralizando sua ação. A glutathione peroxidase doa elétrons para reduzir a peroxidase. A catalase que faz a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e uma molécula de oxigênio. E a superóxido dismutase converte ânions superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio, como substrato para a catalase (RAHMAN, 2007).

Embora o sistema antioxidante endógeno seja eficaz, não é suficiente e o organismo depende de outros tipos de antioxidantes, presentes na alimentação que são capazes de manter os radicais livres em baixas concentrações (PIETTA, 2000).

Considerando os antioxidantes não enzimáticos, podemos mencionar a vitamina A ou retinol que apresenta atividade enzimática por meio da combinação com radical peroxil (LOOH), antes de iniciar a peroxidação lipídica (PENTEADO, 2003).

A vitamina C ou ácido ascórbico, possui compostos que apresentam ação antioxidantes como ácido L-ascórbico e ácido L-dehidroascórbico, nos quais são importantes na varredura do anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH), oxigênio singlet (O_2), e óxido de nitrogênio reativo (NEDEL, 2005).

A vitamina E é composta de oito isoformas e quatro tocoferóis, sendo o α -tocoferol considerada a forma mais eficaz e abundante no sistema biológico. Além disso, a vitamina E é capaz de interromper a peroxidação lipídica, doando hidrogênio para o radical peroxil (LOOH), formando um radical, que apesar de ser um radical, não é reativo e incapaz de continuar a cadeia de oxidação (BURTON, 2011). Ainda entre as vitaminas, pertencente a um grupo de compostos lipossolúveis, a vitamina K, apresenta em sua estrutura uma capacidade antioxidante protetora (VERVOOT; RONDEN; THIJSEEN, 1997).

Os carotenoides incluídos no grupo dos pigmentos naturais, são sintetizados por plantas e microrganismos, mas não por animais. São divididos em dois grupos conhecidos como caroteno (carotenoide hidroxicarbono, que engloba o licopeno e β -caroteno) e os carotenoides oxigenados (que são as xantofilas, como a zeaxantina e luteína). A função fundamental antioxidante é neutralizar a ação do oxigênio singlet. Os carotenoides mostram-se de baixa reatividade, porém podem decompor-se e dar origem a compostos não radicais (PAIVA; RUSSEL; DUTTA, 1999).

Mínerais são encontrados em pequenas quantidades nos tecidos animais e compõem uma pequena porção dos antioxidantes dietéticos, contudo, apresentam importante papel no seu metabolismo. No que diz respeito à atividade antioxidante, os minerais considerados mais ativos são o selênio e o zinco. O selênio pode ser visto na forma orgânica e inorgânica nos tecidos humanos. Não tem ação direta nos radicais livres, entretanto é uma parte imprescindível para muitas enzimas antioxidantes (metaloenzimas, glutadiona peroxidase, tioredoxina redutase), as quais não teriam ação sem esse mineral (TABASSUM; BRISTOW; VENKATESWARAN,

2010). Além disso, o zinco é um inibidor do NADPH oxidase, que catalisa a produção do radical oxigênio singlet (O_2) desde o oxigênio, usando o NADPH como um doador de elétrons (PRASAD et al., 2011)

Os flavonoides classificados como antioxidantes naturais que são encontrados nos alimentos, são capazes de agir como agentes redutores, doadores de hidrogênio, varredor de radical superóxido e até mesmo como agente quelante dos metais, devido ao grupo hidroxil unido a estrutura do anel fenólico. Além disso, os flavonoides também reduzem os radicais α -tocoferol, ativam enzimas antioxidantes, atenuam o estresse de nitrosaminas, inibem as oxidases (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

1.6. COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos estão presentes em todos os vegetais são classificados como substâncias não nutricionais, mas essenciais para saúde humana. Em estudos com diversos compostos bioativos foram verificadas ações antioxidante, anti-inflamatório e anticancerígeno (PATIL et al., 2009). Dentre os compostos bioativos, os flavonoides criam interesse por sua ação antioxidantes (ROSS; KASUM, 2002).

Em 1936, os pesquisadores russos Rusnyak e Gyorgyi inicialmente identificaram como pigmentos de vegetais em porções de pimenta vermelha e suco de limão, que aumentavam a resistência dos capilares. Estes pesquisadores descreveram que os flavonoides apresentavam propriedades vitamínicas e denominaram de vitamina P, nome que foi posteriormente descartado. Essas descobertas estimularam novos interesses na identificação de mais flavonoides nos alimentos (PATIL et al., 2009).

Os compostos polifenólicos são um dos mais numerosos grupos de substâncias do reino vegetal. São produzidos como resultado do metabolismo secundário das plantas e frequentemente

encontrados unidos a glicosídeos, sendo considerado como hidrossolúveis (BRAVO, 1998). Na natureza são encontrados mais de 8000 polifenóis e a característica comum desses compostos é a presença do anel aromático ligado a uma componente hidroxila, conforme a FIGURA 9 (CROFT, 1998). Por sua vez, os polifenóis são divididos em 10 diferentes classes, baseado na estrutura química (BRAVO, 1998). Dentre essas classes, os flavonoides são a maior classe dos polifenóis com uma estrutura comum de difenilpropano ($C_{6}O_3C_6$), consistindo em dois anéis aromáticos unidos por três carbonos (CROFT, 1998).

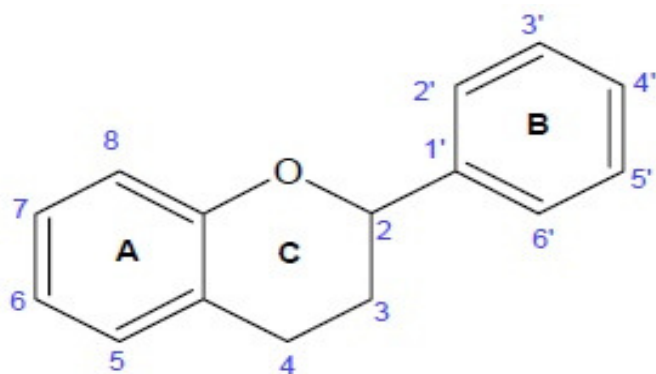


FIGURA 9 - Estrutura básica de um flavonoide (ROSS, 2002).

Baseado na variação do anel heterocíclico C, os flavonoides podem ser subdivididos em seis subclasses: flavonóis, flavanonas, flavonas, antocianidinas, catequinas e isoflavonas, conforme a TABELA 5. São comumente verificados em alimentos e bebidas de origem vegetal, como em frutas, chás, vegetais e vinho principalmente (HERTOG, 1993).

TABELA 5 - Classificação dos flavonoides e fontes alimentares (HERTOG, 1993).

Flavonoide	Sub-classe	Alimentos
Flavonona	apigenin, luteolina, diosmetin	Salsinha, aipo, pimentão vermelho, tomilho
Flavonol	quercitina, miricetina, kaempferol	Cebola, brócolis, maçã, cereja, chás, couve, radite
Flavanonas	narigenina, nesperidina	Frutas cítricas, ameixa vermelha
Catequinas	epicatequina, galactocatequina	Chás (<i>Camellia sinensis</i>), maçã, cacau
Antocianidina	pelargonidina, malvidina, cianidina	Cerejas, uvas
Isoflavonas	genisteína, daidzeína	Soja, leguminosas

Existem dificuldades em se determinar recomendações sobre a ingestão de flavonoides, pelo fato da complexidade em estimular um método de análise para os diferentes tipos de polifenóis (HERTOG, 1993). Vários fatores como a características genéticas da planta, luminosidade, germinação, condições ambientais, grau de maturação, armazenamento, variação das espécies e também o processamento influenciam a formação dos flavonoides nas plantas (BRAVO, 1998).

1.6. 1. AÇÃO ANTIOXIDANTE DOS FLAVONOIDES

O consumo de alimentos como frutas e vegetais em grande quantidade fornecem ao organismo características protetoras contra várias patologias, para doenças como câncer e doenças cardiovasculares (KNEKT et al., 2004). Os antioxidantes e fibras dietéticas são apontados como principais agentes de efeitos protetores (HALLIWELL, 2005).

Alguns flavonoides quando associados com antioxidantes como as vitaminas C e E estão relacionados com capacidade de inibir a peroxidação lipídica ocasionada pelas EROs. Localizados entre a bicamada fosfolipídica e a fase aquosa, pelo fato de sua propriedade hidrofílica, os flavonoides podem bloquear mecanismos de iniciação de radicais livres e assim

prevenindo a lipoperoxidação (HERTOG et al., 1993). Contudo, tentar controlar o estresse oxidativo por meio de suplementação de vitaminas antioxidantes C e E mostraram resultados controversos (WATKINS et al., 2000).

Ainda que os flavonoides mostrem grande capacidade antioxidante *in vitro*, a competência *in vivo* é limitada por alguns fatores. A absorção dos flavonoides é baixa quando comparada com as vitaminas C e E (MANACH; MORAND; CRESPIY, 1998). Atravessar a parede celular do intestino é uma capacidade somente das agliconas. Grande parte dos flavonoides são encontradas como β -glicosídeos e verifica-se redução na absorção quando esta ligação com β -glicosídeos é rompida, por meio da hidrólise dos flavonoides por microrganismos intestinais. Por este fato, a biodisponibilidade de muitos flavonoides dietéticos é limitada (ERLUND, 2004). Ainda, a meia vida dos flavonoides no sangue é pequena e em poucas horas expira-se, limitando a capacidade antioxidante dos flavonoides dietéticos no plasma, especialmente quando são comparados com antioxidantes já presentes no plasma, prontos para serem utilizados (STOCKER; BOWRY; FREI, 1991).

É sabido que os flavonoides têm uma contribuição significativa nas defesas antioxidantes do organismo. Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer de forma mais clara suas ações no organismo. Possivelmente a ingestão de vegetais e frutas em sua integridade seja mais relevante para se alcançar os benefícios antioxidantes do que apenas a ingestão do constituinte vegetal.

1.7 HESPERIDINA, HESPERITINA E GLICOSIL HESPERIDINA

São considerados como alimentos funcionais aqueles que contém compostos bioativos e que quando consumidos em uma dieta usual, cooperam com os nutrientes e conferem efeitos adicionais que protegem contra doenças (SILALAH, 2002).

A Hesperidina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo) é um flavonóide cítrico, considerado como uma flavanona glicosídica e sua estrutura química é

constituída pela hesperitina (forma aglicona) e ligada aos açúcares glicose e a ramnose na posição 7 (YAMADA et al., 2006). Está presente naturalmente em frutas cítricas, principalmente no suco de laranja e suas quantidades podem variar de acordo com o solo, clima, variedade da fruta e tipo de suco (MANTHEY; GUTHRIE; GROHMANN, 2001). Frequentemente tem sido conferido propriedades hipolipemiantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e antivirais. (BENAVENTE-GARCIA; CASTILLO, 2008).

Embora apresente relevância biológica, ainda não há recomendações para a ingestão dos flavonoides cítricos (KNEKT et al., 2004). Estima-se que nos EUA, o consumo individual médio de frutas cítricas fique em torno de 68 gramas por dia, sendo que 59 g são consumidos na forma de suco de laranja. No Brasil, não existem informações disponíveis sobre a ingestão dos flavonoides cítricos (ERLUND, 2004).

Apesar de apresentar muitos benefícios, verifica-se na hesperidina uma baixa solubilidade em água do produto natural (<0,01%), o que a torna pouco biodisponível para o organismo. Assim, em 1991, Hijiya et al., desenvolveram uma forma sintética da hesperidina, denominada glicosil hesperidina (G-hesperidina), através da transglicosilação com ciclodextrina glicoranotransferase da bactéria *Bacillus stearothermophilus*. Por consequência, a G-hesperidina se torna mais solúvel (10.000 vezes) que a hesperidina. Além disto, é verificado que as atividades biológicas da G-hesperidina são iguais ou melhores do que a da hesperidina (YAMADA et al., 2006). Na FIGURA 10, destaca-se A estrutura química da hesperidina, G-hesperidina e hesperitina.

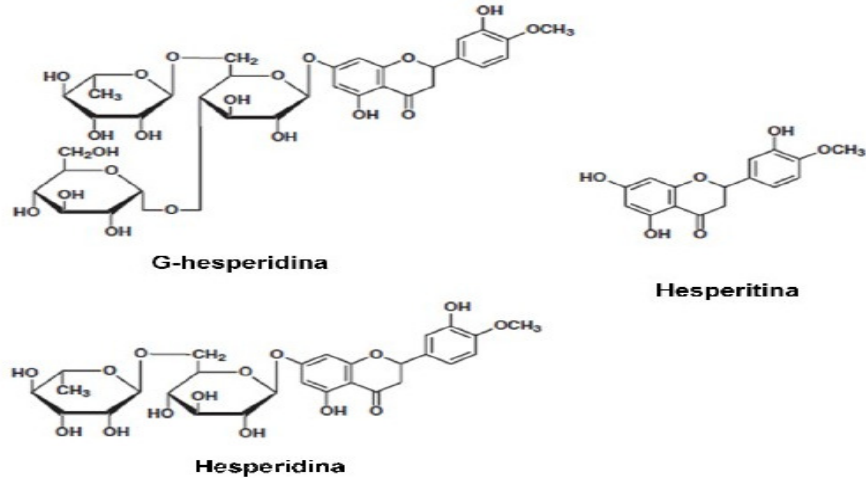


FIGURA 10 - Estrutura química da G-Hesperidina, hesperidina e hesperitina (YAMADA et al., 2006).

Estudos demonstraram que a hesperidina foi capaz de proteger as células neuronais do estresse oxidativo, agindo como um potente *scavenger* de radicais livres na doença de Huntington e Alzheimer (HUANG et al., 2011). Ainda, este flavonoide apresentou propriedades antidepressivas, por meio da modulação de receptores kappa opióide e 5-HT1A serotoninérgicos em camundongos (CARLOS FILHO et al., 2013).

A absorção, metabolismo e ação dos flavonoides cítricos não estão ainda totalmente esclarecidos. De forma geral, estudos demonstram que no intestino delgado a absorção dos flavonoides ocorre através da especificidade das enzimas intestinais pela molécula de açúcar ligada ao composto e envolve transportadores de glicose dependentes de sódio 1 (SGLT 1) (YAMADA et al., 2006).

A hesperidina, após a sua ingestão ela é hidrolisada pela microflora intestinal e posteriormente absorvida no colon em sua forma aglicona, hesperitina. E as enzimas envolvidas que destacam-se na hidrólise são as hidrolases (floridina hidrolase lactase (LPH) e glicosidases (α -glicosidases, glicosidase citosólica (CBG) (ERLUND, 2004). Em seguida, na parede intestinal, a hesperitina sofre reações de conjugação, como glicuronidação e metilação (MANACH; MORAND; CRESPIY, 1998), sendo conduzida pelo sistema porta-hepático dos

enterócitos ao fígado, onde sofrerá reações como metilação, sulfatação e glicuronidação, gerando vários metabólitos (SCALBERT et al., 2002).

Destaca-se que uma parte da hesperidina absorvida é convertida em hesperitina, contudo outra parte da hesperidina que não passa por desglicosilação é parcialmente conjugada e liberada da circulação sendo excretada como metabólitos na urina sem a reabsorção renal tubular (YAMADA et al., 2006). Os metabólitos gerados, (hesperitina-glicuronídeos e sulfoglicuronídeos) são excretados pela bile ou conduzidos aos tecidos periféricos pelo sistema sanguíneo, onde desempenham as atividades funcionais no organismo (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBIYA, 2002). A FIGURA 11 mostra o esquema da absorção e metabolismo da hesperidina.

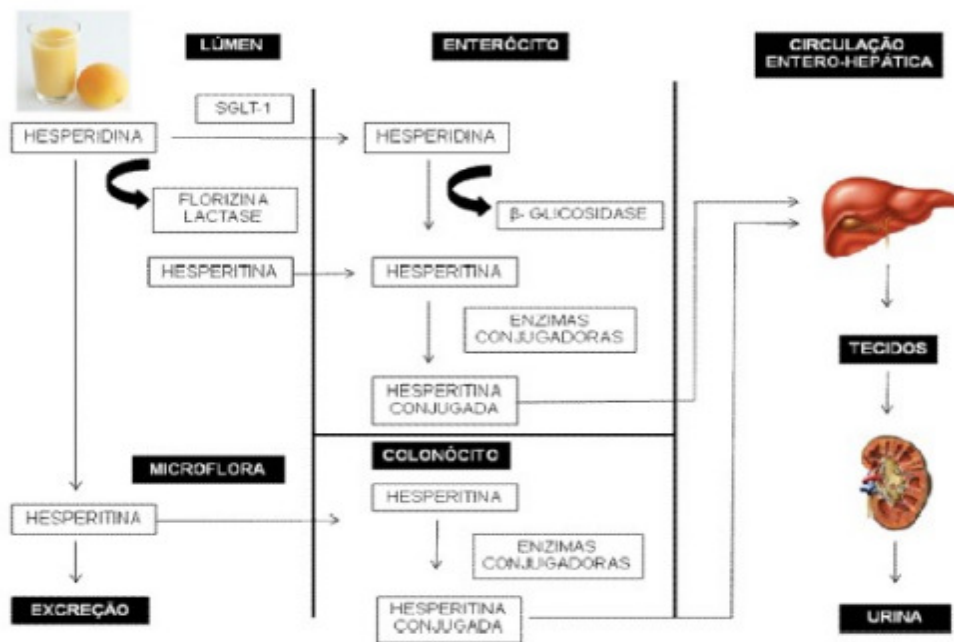


FIGURA 11. Esquema geral da absorção e metabolismo da hesperidina. Adaptado de Nielsen et al. (2006).

Estudos compararam a absorção e a excreção urinária da G-hesperidina em relação à hesperidina em ratos e verificaram que a G-hesperidina apresenta o mesmo perfil de metabólitos excretados na urina que a hesperidina, e que a G-hesperidina é mais eficientemente

absorvida, devido à sua alta solubilidade. Quando administrada por via oral, a G-hesperidina é hidrolisada pelas enzimas β -glicosidases no intestino delgado onde ocorre a liberação da hesperidina e subsequentemente é hidrolisada a hesperitina pelas β -glicosidases e por bactérias intestinais (YAMADA et al., 2006).

1.8 TREINAMENTO FISICO

Em consequência da realização de exercícios durante tempo determinado, durante dias, semanas ou meses, ocorrem adaptações bioquímicas e fisiológicas que consequentemente levam a melhora no desempenho da realização da atividade específica. As respostas de adaptação ao exercício dependem da duração e intensidade, frequência da repetição, do nível anterior de atividade do indivíduo, limitação genética e do tipo de treinamento. Estas adaptações ao treinamento são totalmente reversíveis, sendo alguns dias apenas de interrupção o bastante para a redução da capacidade metabólica (WILMORE, 2003).

As adaptações metabólicas e fisiológicas ao treino vão depender da origem da sobrecarga, o treinamento de resistência ou endurance produz alterações diferentes das geradas pelo treinamento de velocidade e força. No endurance, os principais efeitos estão relacionados a capacidade oxidativa (WILMORE; COSTIL, 2001). Mostra-se imprescindível a programação do tempo de recuperação regenerativo dentro de um programa de treinamento para que estas adaptações ocorram. As adaptações permitem que alterações na morfologia e funcionalidade do tecido muscular (HAWLEY, 2008). O mecanismo pelo qual a atividade física age induzindo adaptações funcionais e estruturais aprimorando o desempenho físico e levando a resultados desejáveis para a manutenção de bons níveis aptidão física relacionada à saúde tem sido cada vez mais investigado (MIYASAKA et al., 2001).

Inúmeros estudos utilizando o treinamento físico em ratos são encontrados na literatura como caminhadas e corridas em esteira, natação em piscina funda com ou sem uso de sobrecarga, protocolos de levantamento de peso com estimulação elétrica, realização de exercícios em

ambiente de confinamento mais amplo ou rodas ara caminhada voluntaria ou métodos de estimulação elétrica da contração estimulando o exercício (CARVALHO; MASUDA; POMPEU, 2005).

1.8.1 SINALIZADORES ENERGÉTICOS METABÓLICOS

A ação muscular é definida na literatura resultante de uma série complexa de eventos fisiológicos e a incapacidade de manutenção do maquinário contrátil durante uma determinada tarefa é definida como exaustão (GIBSON; LAMBERT; NOAKES, 2001). Em testes de esforço máximo, em seus estágios finais de testes progressivos realizados em esteira, é observado uma maior transporte, captação e utilização de O_2 pelo organismo, denominado como consumo máximo de oxigênio ou VO_2 max (BASSETT JUNIOR; HOWLEY, 1997). O acréscimo na captação tem como finalidade suprir o aumento da demanda energética atribuída ao exercício físico durante testes, enquanto a redução desta oferta leva a anaerobiose que influencia na redução da tensão que é gerada pelos músculos (HARMS, 2000). Foi demonstrado este comportamento atribuindo um aumento inferior a $2,1 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ captação de O_2 com o incremento de carga, estabelecendo então a presença do fenômeno designado de platô (TAYLOR; BUSKIRK; HENSCHERL, 1955).

A presença deste efeito tem sido relacionada ao aumento da contribuição do sistema glicolítico, que promove a exaustão pela depleção dos substratos energéticos ou pela elevação da concentração dos íons de hidrogênio (H^+), provenientes do ácido láctico (HARMS, 2000). A participação de cada substrato para manter a demanda energética durante a realização do exercício é determinada pela duração e intensidade do esforço, como em um estímulo agudo ou crônico ao treinamento e também pela dieta (GOEDECKE et al., 2000).

Em fases iniciais do exercício de intensidade progressiva, aproximadamente 45% do VO_2 max, a demanda energética é suprida por mecanismos oxidativos (ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa) por meio da degradação referencial dos ácidos graxos. Contudo, a produção de energia através destes mecanismos é dependente da conversão contínua de

glicogênio a oxalacetato a acetil-CoA formando citrato, já que esta controla a oxidação do acetil-CoA proveniente tanto do piruvato de fontes de carboidratos como de ácidos graxos (ODLAND; HEIGENHAUSER; SPRIET, 2000).

Em intensidade do exercício aumentada, em 45% a 70% do VO₂ max aproximadamente, a oxidação dos ácidos graxos em relação a oxidação de glicogênio diminui gradativamente, inibido o maior fluxo de substratos por meio da via glicogenolítica/glicolítica e pelo aumento da atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) (ODLAND; HEIGENHAUSER; SPRIET, 2000). Posteriormente, a alteração do exercício para moderado-intenso, ficando em torno de 75% do VO₂max, leva a demanda energética a ser suprida predominantemente pela glicogenólise e pela glicólise hepática e muscular com seguinte acúmulo sanguíneo de lactato e íons H⁺ (GOEDECKE et al., 2000).

1.8.2 VIAS METABÓLICAS ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE ATP

Durante o exercício físico, a energia consumida é gerada por vias metabólicas distintas, tornando este fato como um dos principais fatores limitantes da atividade física. Portanto, otimizar o sistema onde acarreta a melhora da capacidade de realização do exercício físico (PILIS et al., 1993).

A produção e a oxidação da glicose estão relacionadas a redução de NAD⁺. O NAD⁺ está presente nas células em concentrações limitantes, a manutenção do funcionamento da glicólise depende da reoxidação do NADH. A disponibilidade de NAD⁺ acontece por meio de dois processos distintos de acordo com a disponibilidade de oxigênio. Em anaerobiose, o piruvato é produzido por meio da glicólise servindo comoceptor dos elétrons do NADH, sendo reduzido a lactato. Já em aerobiose é utilizado o oxigênio para oxidação do NADH (PILEGAARD et al., 2005).

Dessa maneira, quanto menor a ativação da via anaeróbia, maior é a otimização de energia. A proporção de ativação da via metabólica responsável pela geração de energia está diretamente relacionada à intensidade do exercício. De maneira geral, exercícios físicos realizados em

intensidades baixas utilizam predominantemente energia produzida pela via aeróbia, ativando o ciclo de Krebs na produção de NADH e utilizando oxigênio como aceptor final de elétrons na regeneração do NAD⁺ (SVEDAHL; MACINTOSH, 2003).

Através da via aeróbica a produção de ATP mostra ser mais eficiente quando comparada a via anaeróbica pelo fato da via aeróbica ser capaz de gerar um maior número de ATPs por molécula de glicose degradada. Assim, quanto mais ativada a via anaeróbica, maior a otimização de energia. A ativação da via metabólica responsável pela geração de energia é relacionada a intensidade do exercício (SVEDAHL; MACINTOSH, 2003).

Em maior intensidade do exercício físico, ocorre uma maior demanda de oxigênio, contudo, existe uma intensidade ideal onde a captação e utilização de oxigênio pela musculatura esquelética atinge um patamar, ou ativação ótima. Deste ponto a diante, o oxigênio torna-se um elemento limitante na produção de energia através via aeróbia. Portanto, a ativação da via metabólica anaeróbia age com o intuito de compensar a ineficiência da via aeróbia em regenerar NAD⁺, pois a constância na regeneração de NAD⁺ em NADH é essencial na manutenção da oferta energética (GOEDECKE et al., 2000).

1.8.3 ÓXIDO NÍTRICO E EXERCÍCIO FÍSICO

A liberação contínua do óxido nítrico no endotélio vascular, é responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo tecidual e controle do extravasamento tecidual. Assim, durante o exercício físico ocorre o aumento do débito cardíaco e redistribuição do fluxo sanguíneo para musculatura esquelética e circulação coronariana. Mecanismo este mediado pelo eNOS (eNOS ou isoforma III), podendo ser potencializado com exercícios aeróbicos regulares (SHEN et al., 1995). Contudo, a principal função do NO é exercida no controle de adesão dos elementos sanguíneos (leucócitos e plaquetas) ao endotélio (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991). Por este mesmo mecanismo, o NO diminui a permeabilidade vascular. Várias pesquisas afirmam que o exercício físico está associado à estimulação da produção de NO (HIGASHI; YOSHIZUMI, 2004).

O óxido nítrico é uma molécula de importância no controle metabólico durante o exercício, pois a deficiência de sua produção pelo sistema vascular endotelial, contribui para as limitações no treinamento físico associadas às doenças cardiovasculares (KINGWELL, 2000). Estudos

demonstram que o estilo de vida que inclui a realização regular de exercícios físicos tem relação com a preservação da capacidade funcional do endotélio mediada pela preservação da capacidade de produção do óxido nítrico (SOUZA et al., 2007)

A biodisponibilidade do óxido nítrico apresenta efeitos distintos sendo agudo ou crônico. O exercício leva ao aumento da concentração de NO após uma única sessão. Esse efeito agudo do exercício sobre o NO pode induzir a ajustes positivos no sistema cardiovascular, hepático, muscular esquelético, entre outros (DE OLIVEIRA FARIA et al., 2010).

Estudo demonstraram que uma sessão de exercício parece influenciar de forma positiva na biodisponibilidade do óxido nítrico de forma aguda, possibilitando o aumento da capacidade de regulação do tônus vascular, equilíbrio entre o mecanismo de lesão e recuperação muscular, como também na prevenção de doenças como hipertensão arterial e aterosclerose (TABELA 6).

TABELA 6. Efeitos da biodisponibilidade do óxido nítrico mediada pelo exercício agudo (DE SOUZA JUNIOR, 2012).

	Amostra	Tipo de treinamento	Tempo de treinamento
Faria et al. (2010)	Ratos hipertensos	Agachamento utilizando colete com carga	↓ pressão arterial ↓ reatividade vascular ↑ relaxamento do endotélio dependente
Augeri et al. (2009)	Pré-hipertensos Caucasianos	Exercício de baixa intensidade (40% do VO ₂ max) e moderada intensidade (60% do VO ₂ max)	< resposta do alelo TT hipertensão pós-exercício
Long et al. (2010)	Porcos Yucatan treinados aerobiamente	Treinamento aeróbio em curto prazo	↓ possibilidade de ateromas macrovasculares
Chies, Rossignolia e Daniel (2010)	Ratos treinados	Corrida em esteira	↑ resposta da veia porta de ratos contra presença de angiotensina II
Cubbon et al. (2010)	Sul-asiáticos e europeus	Exercício de intensidade moderada (80% do limiar de lactato) em cicloergômetro	< células progenitoras circulantes após a infusão de L-NAME
Lee-Young et al. (2010)	Camundongos com ausência de e-NOS	Exercício aeróbio	↓ desempenho ↓ ATP

↓ = diminuiu ↑ = aumentou; < = menor; eNOS = Óxido nítrico sintase endotelial; VO₂max = consumo máximo de oxigênio; L-NAME = inibidor da óxido nítrico sintase.

Os ajustes crônicos do exercício sobre a biodisponibilidade de NO e função vascular também são pesquisados (TABELA 7). O exercício parece aumentar cronicamente a produção e disponibilidade de NO no organismo. Porém, ainda são necessárias pesquisas na tentativa de investigar diferentes marcadores biomoleculares e genéticos sobre a síntese, biodisponibilidade e sensibilidade do sistema vascular ao NO.

TABELA 7. Efeitos do aumento de biodisponibilidade do óxido nítrico em função do treinamento físico (DE SOUZA JUNIOR, 2012).

	Amostra	Tipo de treinamento	Tempo de treinamento	Efeito do treinamento
Souza et al. (2007)	Ratos com inibição de NOS	Treinamento aeróbio de natação	8 semanas	Adaptações cardíacas também são dependentes do NO
Rossi et al. (2009)	Ratos Wistar	Exercício aeróbio	10 semanas	Atenua o déficit autonômico cardíaco induzido pela inibição de NOS
Teixeira et al. (2010)	Ratos hipertensivos	Treinamento em esteira	20 semanas	↑capacidade de vasodilatação do endotélio na artéria colateral
Souza et al. (2009)	Ratos Wistar	Treinamento de natação	8 semanas	↑ nitrito plasmático, ↑ função endotelial e ↑ desempenho
Mastelari et al. (2011)	Ratos Wistar	Treinamento de natação	4 semanas	↑ do volume dos ossos e fluxo sanguíneo medular
Allen et al. (2010)	Portadores de doença arterial periférica	Exercícios domésticos	12 semanas	↓ tumorigênese do colo
Dominguez et al. (2010)	Ratos Fisher velhos	Corrida em esteira	12 semanas	
Aoi et al. (2010)	Camundongos	Exercício regular	6 semanas	Proliferação de células satélites é dependente do NO Efeitos do exercício não foram influenciados pelo genótipo da e-NOS
Kartashkina et al. (2010)	Ratos Wistar.	Alongamento	14 dias	Idosas portadoras do alelo C apresentam NO elevado e pressão arterial mais baixa após o treinamento
Zago et al. (2010)	Idosas pré- hipertensas	Treinamento aeróbio a 70% do VO _{2max}	12 semanas	Atenua o déficit autonômico cardíaco induzido pela inibição de NOS
Zago et al. (2010a)	Idosas pré-hipertensas	Exercício aeróbico	12 semanas	↑capacidade de vasodilatação do endotélio na artéria colateral
Negrão et al. (2010)	Indivíduos homocigotos com alelo T do gene da NOS	Exercício na intensidade do limiar anaeróbio	18 semanas	↑vasodilatação muscular em indivíduos com genótipo TT

NOS = óxido nítrico sintase; NO = óxido nítrico; VO_{2max} = consumo máximo de oxigênio.

Em resumo, a obesidade é considerada uma doença crônica e apresenta etiologia multifatorial. Para o seu tratamento, é necessária mudança de estilo de vida que inclui uma alimentação balanceada e início da prática de atividade física, sendo considerado um tratamento complexo e multifatorial. Desta forma, o acúmulo de tecido adiposo leva a disfunções orgânicas responsáveis em comprometer a saúde cardiovascular. Dentre elas, a disfunção vascular tem sido relacionada com a redução da biodisponibilidade de substâncias consideradas vasodilatadoras como o óxido nítrico e estudos evidenciam que estas reduções levam ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O uso de flavonoides, substâncias antioxidantes, tem sido vastamente proposto como terapia para os distúrbios cardiovasculares.

Assim, o uso de flavonoides e o treinamento físico tem sido proposto como tratamento para distúrbios cardiovasculares associados a saúde.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste projeto foi avaliar a composição corporal, parâmetros bioquímicos e função vascular em ratos obesos tratados cronicamente com G-hesperidina em associação com um programa de exercícios físicos.

Os objetivos específicos foram avaliar:

A função endotelial e do músculo liso vascular, através da avaliação de relaxamento da artéria mesentérica superior;

O estado oxidativo, através da avaliação da atividade de enzimas oxidantes e capacidade antioxidante;

3 MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, a partir da quarta semana de vida, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP), com peso inicial de 90 gramas em média. Os animais foram subdivididos aleatoriamente em 5 (cinco) grupos: cada grupo com 5 (cinco) animais, tratados com as dietas específicas para os grupos (controle e experimental), de acordo com a FIGURA 12. O projeto de pesquisa foi submetido para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade São Francisco (Pareceres 004.06.11 e 001.10.2014)

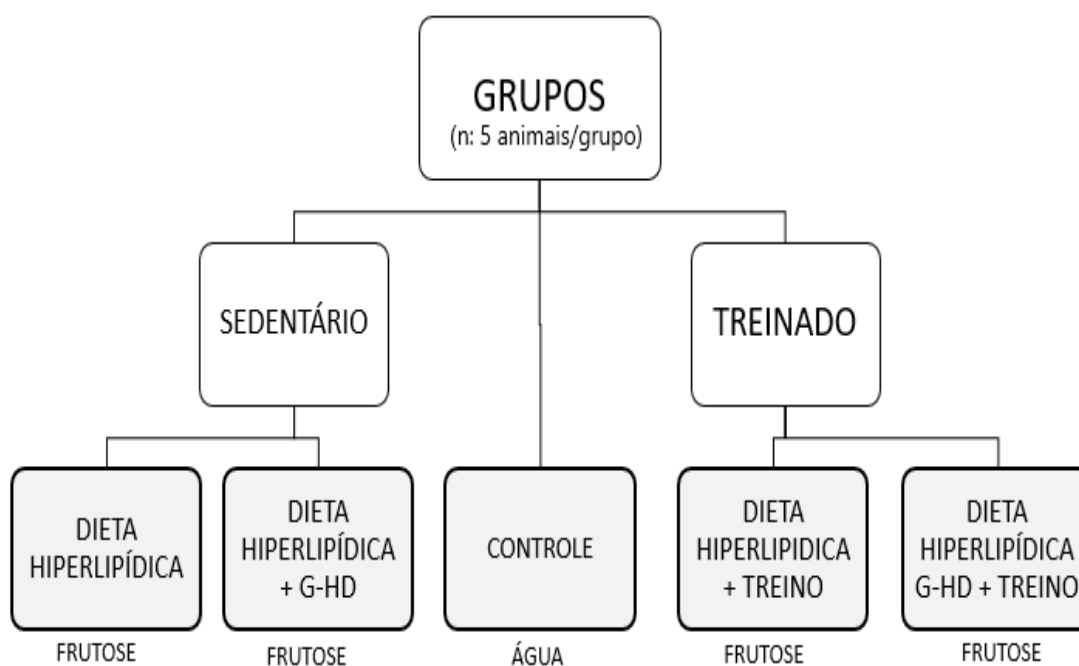


FIGURA 12. Organograma da divisão dos animais nos grupos experimentais.

3.2 Manutenção dos Animais

Todos os animais permaneceram alojados no Biotério da Universidade São Francisco e passaram por um período de adaptação às condições ambientais durante uma semana

Os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade São Francisco, em gaiolas coletivas, com fornecimento de água filtrada, frutose e ração (controle e experimental) *ad libitum*. A temperatura foi mantida entre 22 e 26 °C. A luminosidade foi programada para ciclos claro e escuro com duração de 12 horas cada.

3.3 Dietas

3.3.1 Dieta controle

Como padrão foi utilizada ração para animais de laboratório PragSoluções que fornece 3 Kcal/g sendo 40% sob a forma de carboidratos, 3,8 % sob a forma de lipídeos e 26,5% sob a forma de proteínas, mostrando-se uma dieta balanceada

3.3.2 Dieta Experimental

Nos grupos com tratamento de dieta experimental para a indução da obesidade, foi utilizada dieta hiperlipídica comercial adquirida comercialmente (PragSoluções Biociências, Jau, SP) e fornece 5,5 Kcal/g, sendo 59% sob a forma de lipídeos, 18% sob a forma de proteínas e 23 % sob a forma de carboidratos. Destaca-se a composição da dieta hiperlipídica utilizada no tratamento, conforme a TABELA 8.

TABELA 8. Composição da dieta hiperlipídica (PragSoluções, 2010)

Componente	Quantidade (g)
Amido de Milho	127,5
Caseína	200
Amido Dextrinizado	132
Sacarose	100
Óleo de soja	40
Fibras	50
L-cistina	3
Colina	2,5
HT	0,028
Mix Mineral	35
Mix Vitamínico	10
Banha	300
TOTAL	1000

3.4 Determinação da evolução de peso

A mensuração do peso dos animais foi realizada semanalmente. Colocando os animais no interior da balança, sendo um rato por vez, obtendo assim, o peso do animal individualmente e os valores anotados para controle do peso.

3.5 Determinação do consumo de dietas

A taxa de ingestão da dieta pelos animais foi monitorada diariamente, pelo resto-ingesta. A dieta, oferecida ad libitum, foi acrescentada nos comedouros 1 vez ao dia, anotando-se a quantidade ingerida. A quantidade estabelecida ofertada da dieta experimental 125 gramas/dia

dieta hiperlipídica e para o grupo controle 170 gramas/dia da ração comercial padrão. Estão sendo oferecidos água filtrada (somente grupo controle) ou água com frutose na concentração de 100 mg/ml – *Synth*, quantidade de 500 ml diários por grupo. Para que assim ocorra a indução da obesidade pela dieta hiperlipídica associada à sobrecarga de frutose (ROCHA et al., 2014).

3.6 Preparo das soluções

As soluções padrões aquosas de glicosil-hesperidina foram preparadas em água filtrada e administradas na dose de 0,5 mmol eq hesperidina/Kg de peso do animal (SOUZA, 2015).

3.7 Tratamento com G-hesperidina

A solução padrão aquosa de G-hesperidina foi administrada nas doses de 0,5 mmol/kg de peso com 0,5 mL de solução, via gavagem oragástrica durante 8 semanas, com início na administração dos flavonoides na semana 8 semanas de vida dos animais. Os animais foram pesados semanalmente para o ajuste da concentração de cada composto. Como mostram a TABELA 9, os grupos experimentais foram divididos em cinco grupos, com 5 animais cada.

TABELA 9. Suplementação e dieta dos animais

	Água	Água + frutose 10%	Dieta padrão	Dieta hiperlipídica	Suplementação
Grupo I	X		X		Água
Grupo II		X		X	Água
Grupo III		X		X	G-HD
Grupo IV		X		X	Água
Grupo V		x		x	G-HD

3.8. Programa de treinamento físico: corrida em esteira

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira, iniciado uma semana antes do programa de treinamento, cuja adaptação consiste em manter os animais na esteira em velocidades variando entre 0,3 no primeiro dia até 0,9 km/h no quinto dia da semana. Progressões de tempo na duração das sessões também foram realizadas até que os animais consigam permanecer correndo na esteira por 60 minutos. Após o período de adaptação, o treinamento físico será iniciado com uma velocidade de 0,3 Km/h na primeira sessão, aumentando progressivamente conforme a evolução do grupo de animais, até atingir a velocidade final de 0,9 Km/h a partir da segunda semana de treinamento. Esta intensidade de exercício escolhida corresponde a 70% do VO_{2max} . As sessões de exercício foram realizadas 5 dias por semana, com duração de 60 minutos cada, durante o período de 8 semanas. As sessões foram realizadas em uma esteira ergométrica elétrica, em baias individuais, com as seguintes dimensões: 0,70 m de largura, 0,45 m de altura e 1,35 m de comprimento. Após o término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas, antes de serem sacrificados.

3.9 Eutanásia dos animais e obtenção de tecidos

Após 12 semanas de tratamento os animais foram sacrificados no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa - Farmacologia Cardiovascular – USF, foram anestesiados por via respiratória com isoflurano. Após laparotomia, foi coletado o sangue na porção abdominal da artéria mesentérica para dosagens bioquímicas e oxidativas. A gordura retroperitoneal e a epididimal também foram retiradas e pesadas. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em freezer a -80 °C.

3.10 Avaliação funcional da artéria mesentérica

A artéria mesentérica foi isolada e imediatamente colocada em solução de Krebs-Henseleit gelado. O tecido foi submetido à remoção de tecidos gordurosos e conjuntivos e em seguida, foram feitos cortes transversais para a obtenção de anéis da artéria.

Os anéis foram montados em miógrafo para órgão isolado de 5 ml contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl: 118; NaHCO₃: 25; glicose 5,6; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,17 e CaCl₂.2H₂O: 2,5), aquecida a 37°C e aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os tecidos foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles fixo e o outro conectado a um transdutor de força. Foi aplicada uma tensão inicial de aproximadamente 10 mN e periodicamente ajustada até que ocorresse a estabilização de tensão dos mesmos, durante um período aproximado de 45 a 60 minutos. As alterações de tensão foram medidas por transdutores isométricos e registradas em sistema PowerLab de aquisição de dados (software versão 7.2, AD Instruments, MA, EUA).

As respostas de relaxamento para acetilcolina (1 nM – 10 μM) e nitroprussiato de sódio (10 pM – 1 μM) foram obtidas em anéis da artéria mesentérica e a pré-contraídos com fenilefrina (10 μM).

Para avaliar o relaxamento dependente do endotélio, foram realizadas curvas concentração-efeito para o agonista acetilcolina (estimulador da liberação do NO endotelial) nos diferentes grupos experimentais. O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através de curvas concentração-efeito ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio em anéis desprovidos de endotélio.

As curvas concentração-efeito foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações da droga utilizada em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas.

3.11. Avaliação do estado oxidativo

Amostras de plasma e kits específicos (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) foram utilizados para dosagem da atividade plasmática da SOD e os níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) para avaliação do estado oxidativo.

Para dosagem dos níveis plasmáticos de malondialdeídos (MDA), marcador da peroxidação lipídica, utilizou-se medida de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). Conforme a técnica, 250µL de amostra (plasma) foram misturados com 25µL BHT 4% em metanol, 1mL de ácido tricloroacético a 12%, 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,73% e 750µL 0,1 mol/L tampão Tris-HCl contendo 0,1mmol/L EDTA pH 7,4. Após 60 minutos de incubação em banho-maria fervente, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo, e adicionado 1,5mL de n-butanol. Em seguida foram homogeneizadas por 30 segundos em vortex e centrifugada a 3.000rpm por 10 minutos. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 532 nm.

Para dosagem da atividade plasmática da enzima SOD empregou-se o método que utiliza o sal de tetrazólio para detectar os radicais de superóxido gerados da xantina oxidase e da hipoxantina. A xantina oxidase e a hipoxantina produzem radicais superóxido, os quais reagem ao sal tetrazólio e formam compostos vermelho formazan. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade da enzima necessária para a exposição de 50 % da dismutação do radical superóxido. As amostras foram colocadas nos poços presentes no prato do kit de dosagem de SOD, juntamente com o detector de radical diluído. Incubou-se o prato por 30 minutos em temperatura ambiente. Após realizou-se a leitura da absorbância em 460 nm.

3.12 Avaliação da função renal e da função hepática

As funções renal e hepática foram avaliadas pela dosagem dos níveis plasmáticos de uréia e albumina, respectivamente, utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Os níveis plasmáticos de albumina foram dosados a partir do sistema de desvio de picos de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol) quando este se liga na

albumina. As amostras foram misturadas com o reagente de cor e após 2 minutos foi determinada a absorvância. A cor formada foi medida colorimetricamente em 630 nm, sendo proporcional a concentração de albumina na amostra.

Os níveis plasmáticos de uréia foram dosados a partir do princípio de que a uréia é hidrolisada pela urease produzindo amônia e dióxido de carbono. Os íons de amônia reagem em pH alcalino com o salicilato e o hipoclorito de sódio sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar o azul de indofenol. A amostra foi misturada com a uréase tamponada, incubada a 37° C por 5 minutos. Após adicionou-se o oxidante de uso e incubou-se novamente a 37°C por 5 minutos. Determinou a absorvância em 600 nm. A intensidade de cor formada foi proporcional a quantidade de uréia na amostra.

3.13 Perfil Lipídico

As amostras de sangue que foram processadas para obtenção de soro para as dosagens bioquímicas e foram coletadas após jejum noturno de aproximadamente 14 horas. Os animais foram anestesiados com halotano e através de uma incisão longitudinal no abdômen do animal foi coletado o sangue arterial (7 ml), pelo ramo descendente da artéria aorta.

Os níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) foram medidos pelo método enzimático utilizando-se kit específico (LABTEST). A glicose sanguínea foi determinada pelo método enzimático utilizando kit específico (Labtest), as amostras foram lidas em espectrofotômetro.

3.14 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) para n experimentos. Foram realizadas análise de variância (ANOVA) seguidas de pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Foi adotado um nível de significância de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

Inicialmente, os animais foram divididos randomicamente nos 5 grupos experimentais descrito na sessão de métodos. O peso corporal dos animais foi registrado ao início do estudo e ao final do estudo. A FIGURA 13 mostra que no início, o peso corporal dos animais era semelhante. Após 12 semanas de tratamento, houve aumento significativo no peso corporal dos animais que receberam dieta hiperlipídica. O tratamento com a G-hesperidina não afetou o ganho de peso corporal. Por outro lado, o treinamento físico por 8 semanas foi capaz de prevenir o aumento do peso corporal dos animais tratados com dieta hiperlipídica.

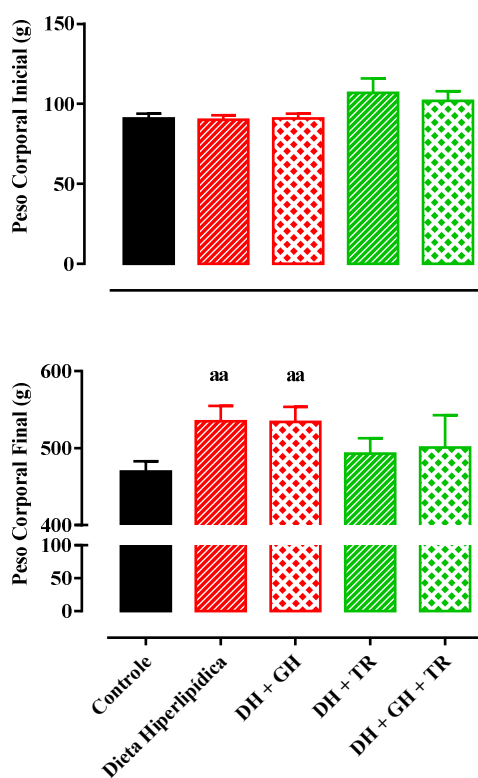


FIGURA 13. Peso corporal inicial e final de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados com G-hesperidina (GH), submetidos ou não ao treinamento físico (TR). Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 animais. ^{aa} $P < 0,01$ comparado ao grupo controle.

A gordura epididimal e a gordura retroperitoneal foram pesadas para avaliação do acúmulo de tecido adiposo após as 12 semanas de consumo da dieta hiperlipídica. Houve aumento significativo do acúmulo de gordura epididimal e retroperitoneal em todos os grupos tratados com a dieta hiperlipídica, associados ou não à G-hesperidina e/ou treinamento físico, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, este aumento foi significativamente menor nos grupos submetidos ao treinamento físico, quando comparado ao grupo tratado com dieta hiperlipídica + G-hesperidina (DH+GH). A gordura epididimal dos ratos submetidos a treinamento físico também foi significativamente menor quando comparado aos sedentários tratados com dieta hiperlipídica (FIGURA 14).

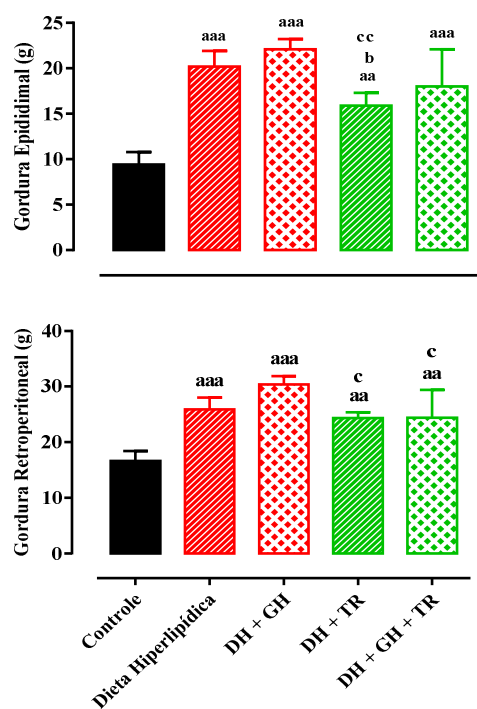


FIGURA 14. Acúmulo de gordura epididimal e retroperitoneal de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 animais. ^{aa} P < 0,01 comparado ao grupo controle. ^{aaa} P < 0,001 comparado ao grupo controle. ^b P < 0,05 comparado ao grupo DH. ^c P < 0,05 comparado ao grupo DH + GH. ^{cc} P < 0,01 comparado ao grupo DH + GH.

O consumo de dieta hiperlipídica associada ou não ao tratamento com a G-hesperidina não alterou os níveis plasmáticos de glicose em jejum. Por outro lado, o treinamento físico foi capaz de reduzir significativamente a glicemia dos animais, quando comparados ao grupo dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica + G-hesperidina (DH + GH). Entretanto, quando associado ao tratamento com a G-hesperidina, o treinamento físico não foi eficaz em produzir redução da glicemia (FIGURA 15).

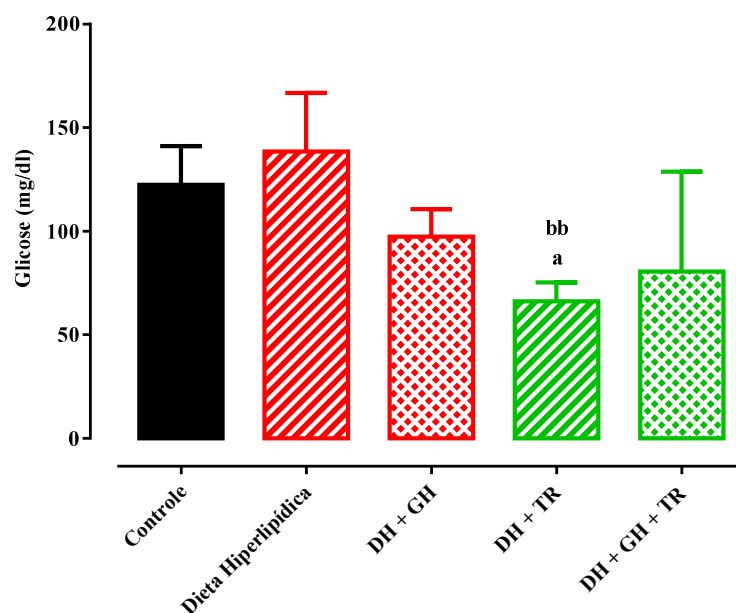


FIGURA 15. Glicemia de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 animais. ^a P < 0,05 comparado ao grupo controle. ^{bb} P < 0,01 comparado ao grupo DH.

Os lipídios plasmáticos colesterol total e triglicérides foram avaliados ao final do estudo. Pudemos observar que o consumo de dieta hiperlipídica associada ou não ao tratamento com a G-hesperidina não alterou o perfil lipídico. Por outro lado, o treinamento físico foi capaz de reduzir significativamente o colesterol total e os triglicérides plasmáticos dos animais, quando comparados ao grupo controle. O colesterol total dos animais submetidos a treinamento físico foi reduzido em relação ao grupo DH+GH e os triglicérides do grupo treinado foi reduzido quando comparado ao grupo dieta hiperlipídica (FIGURA 16).

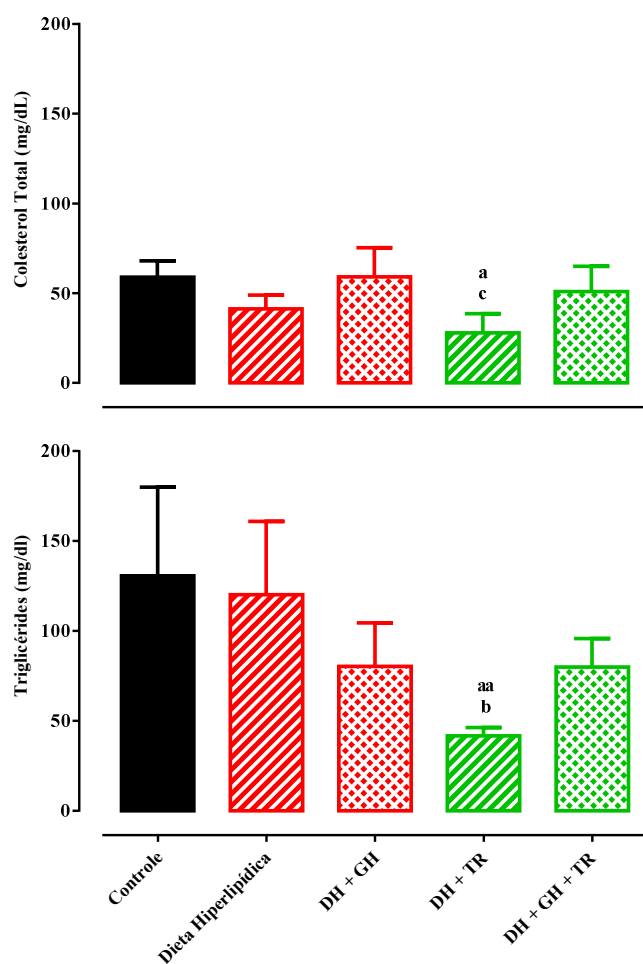


FIGURA 16. Níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 animais. ^a P < 0,05 comparado ao grupo controle. ^{aa} P < 0,01 comparado ao grupo controle. ^b P < 0,05 comparado ao grupo DH. ^c P < 0,05 comparado ao grupo DH + GH.

Níveis séricos de albumina e proteínas totais foram dosados ao final do estudo com o objetivo de avaliar a hepatotoxicidade do tratamento empregado com a G-hesperidina. Não foram observadas alterações nos níveis séricos de albumina e proteínas totais em nenhum dos grupos experimentais (FIGURA 17).

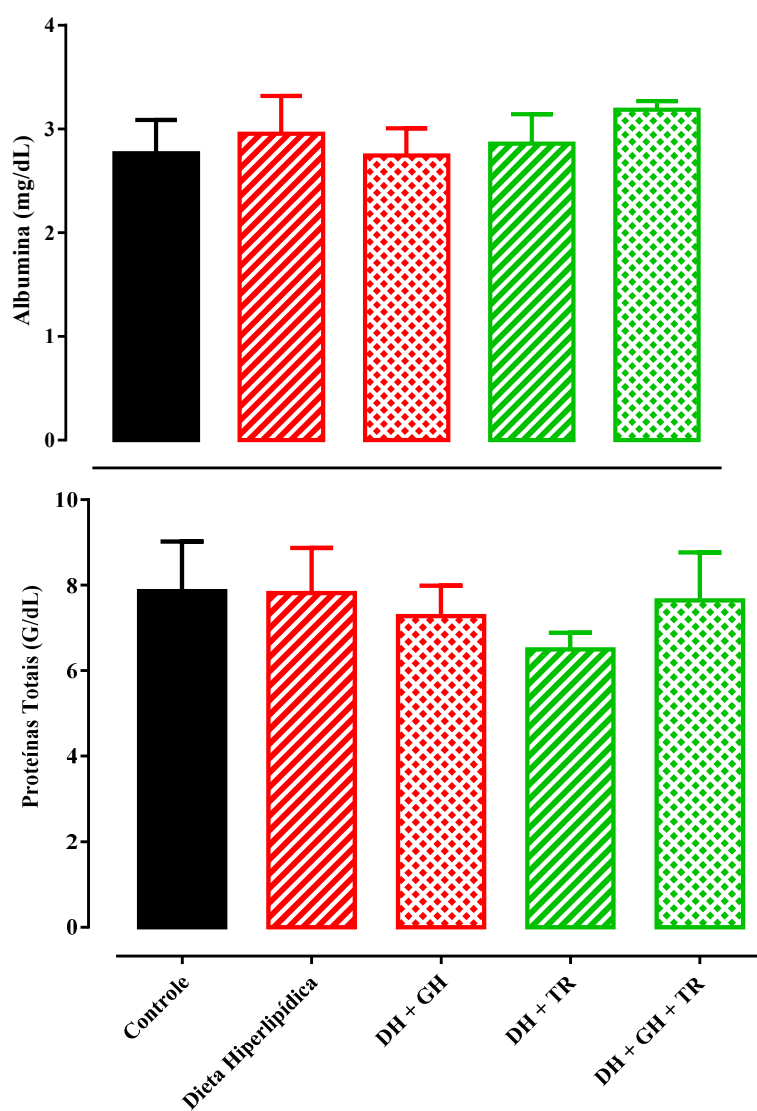


FIGURA 17. Níveis séricos de albumina e proteínas totais de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 animais.

Níveis plasmáticos de ureia foram dosados ao final do estudo com o objetivo de avaliar a nefrotoxicidade do tratamento empregado com a G-hesperidina. Não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos de ureia em nenhum dos grupos experimentais (FIGURA 18).

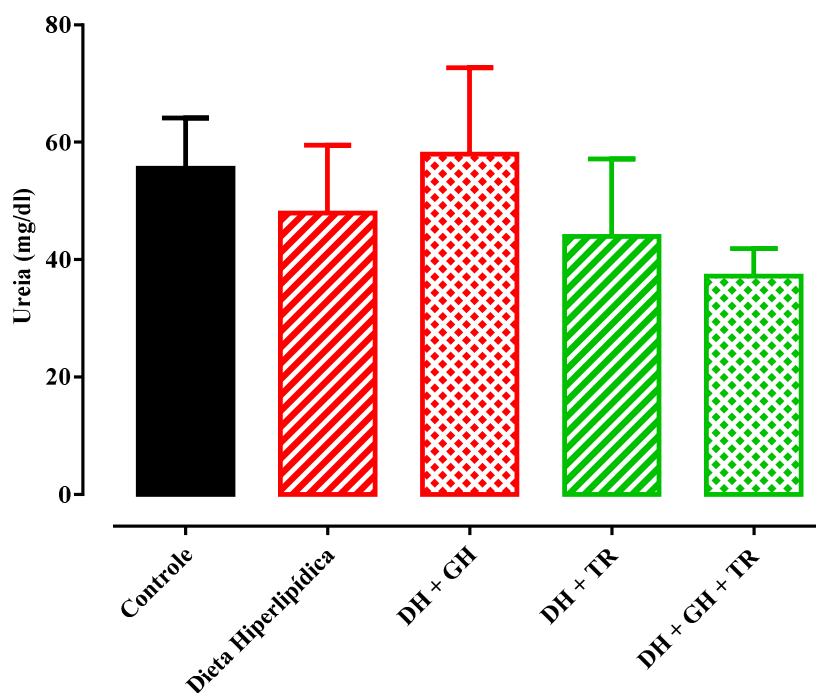


FIGURA 18. Níveis plasmáticos de ureia de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 animais.

Por sua ação antioxidante dos flavonoides, foram avaliados a atividade das enzimas antioxidantes endógenas SOD (superóxido dismutase) e a catalase.

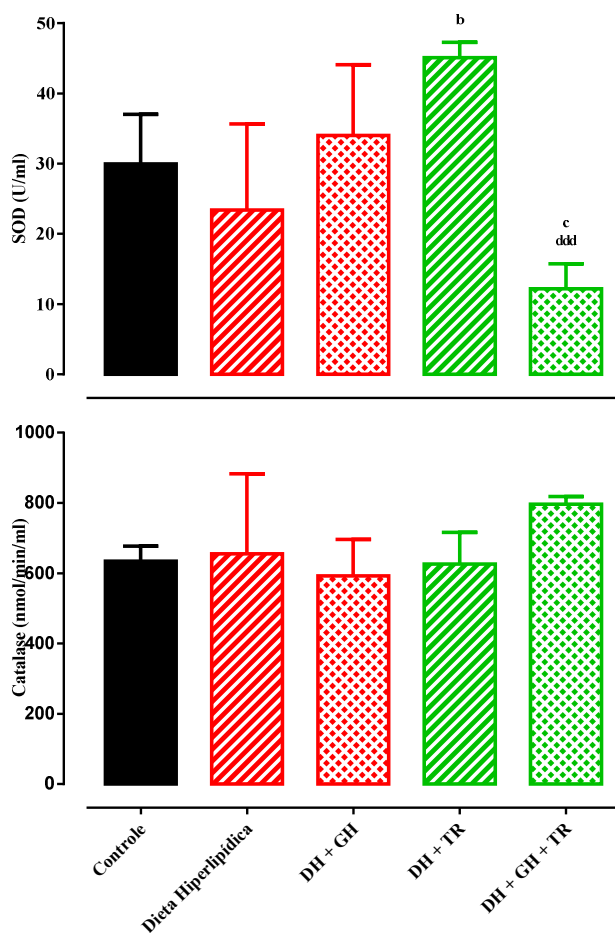


FIGURA 19. Atividade plasmática das enzimas antioxidantes SOD e catalase de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 3 - 5 animais. ^b P < 0,05 comparado ao grupo DH. ^c P < 0,05 comparado ao grupo DH + GH. ^{ddd} P < 0,001 comparado ao grupo DH + TR.

Da mesma forma, foi analisada a capacidade antioxidante total e o índice de peroxidação lipídica.

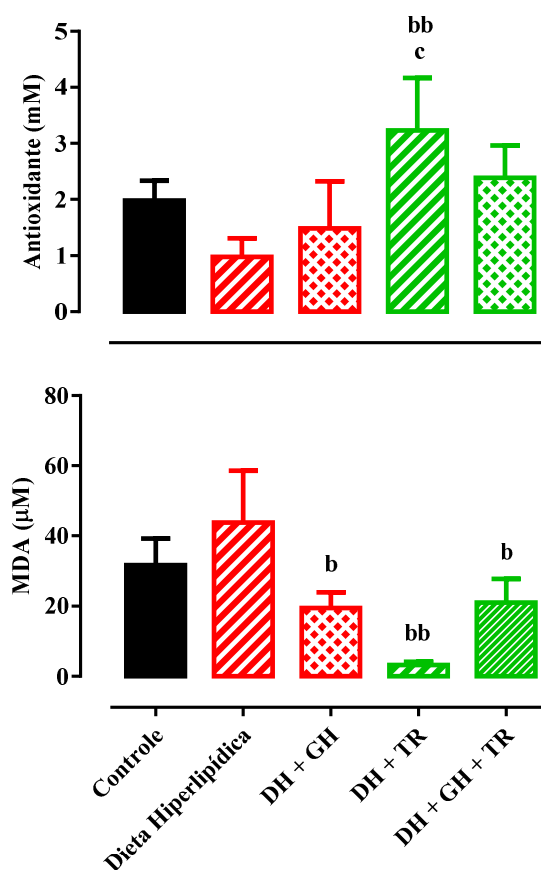


FIGURA 20. Capacidade antioxidante total plasmática e concentração plasmática de MDA de ratos controle e dieta hiperlipídica (DH), suplementados ou não com G-hesperidina (GH) e submetidos ou não ao treinamento físico (TR) após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 3 - 5 animais. ^b P < 0,05 comparado ao grupo DH. ^{bb} P < 0,01 comparado ao grupo DH. ^c P < 0,05 comparado ao grupo DH + GH.

Curva concentração-efeito à acetilcolina foi obtida em anel de artéria mesentérica provida de endotélio intacto, para avaliação do relaxamento dependente de endotélio. A TABELA 10 mostra a potência da acetilcolina (representada pela PD₂). Observamos que o tratamento com dieta hiperlipídica diminuiu a potência da acetilcolina na artéria mesentérica dos ratos. O tratamento com a G-hesperidina associadas ou não ao exercício físico, não preveniram a redução da potência da acetilcolina, ao contrário, apresentaram redução ainda maior da potência da acetilcolina.

TABELA 10- PD₂ da acetilcolina na artéria mesentérica de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, e tratados com Hesperidina ou G-Hesperidina, associadas ou não com exercício físico.

Acetilcolina	Controle	Dieta	G-Hesperidina
Sem Exercício	7.36 ± 0.08	6.83 ± 0.21 ^a	6.25 ± 0.14 ^{a b}
Com Exercício	-	6.17 ± 0.10 ^{a b}	6.30 ± 0.21 ^{a b}

Os dados representam a média ± E.P.M., para 3 animais. ^a, P<0,05 comparado ao grupo controle; ^b, P<0,05 comparado ao grupo dieta hiperlipídica apenas.

Curva concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio, obtida em anel de artéria mesentérica desprovida de endotélio, para avaliação do relaxamento independente de endotélio. O consumo de dieta hiperlipídica não provocou alteração da potência (pEC₅₀ = 6,67 ± 0,06) do nitroprussiato de sódio neste leito vascular, e durante o período estudado, comparado ao grupo controle (pEC₅₀ = 6,95 ± 0,21). O tratamento apenas com a G-hesperidina também não afetou a potência do nitroprussiato de sódio (pEC₅₀ = 7,26 ± 0,20). Entretanto, treinamento físico aumentou significativamente a potência do nitroprussiato de sódio (pEC₅₀ = 8,01 ± 0,13) quando comparado aos grupos controle e dieta hiperlipídica. Por outro lado, a associação do exercício físico com a administração de G-hesperidina prejudicou a potência de relaxamento do nitroprussiato de sódio (pEC₅₀ = 6,37 ± 0,18), quando comparado aos grupos que receberam a G-hesperidina ou treinamento físico isoladamente (TABELA 10).

A resposta máxima da acetilcolina não foi alterada pelo tratamento com a dieta hiperlipídica. Entretanto, o tratamento com a G-hesperidina reduziu a resposta máxima da acetilcolina. O exercício físico preveniu esta redução nos animais tratados com a G-hesperidina (TABELA 11).

TABELA 11- E_{MAX} da acetilcolina na artéria mesentérica de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, e tratados com Hesperidina ou G-Hesperidina, associadas ou não com exercício físico.

Acetilcolina	Controle	Dieta	G-Hesperidina
Sem Exercício	96 ± 0.3	92 ± 2	70 ± 15 ^{a,b}
Com Exercício	-	88 ± 7	92 ± 3

Os dados representam a média ± E.P.M., para 3 animais. ^a, P<0,05 comparado ao grupo controle; ^b, P <0,05 comparado ao grupo dieta hiperlipídica apenas.

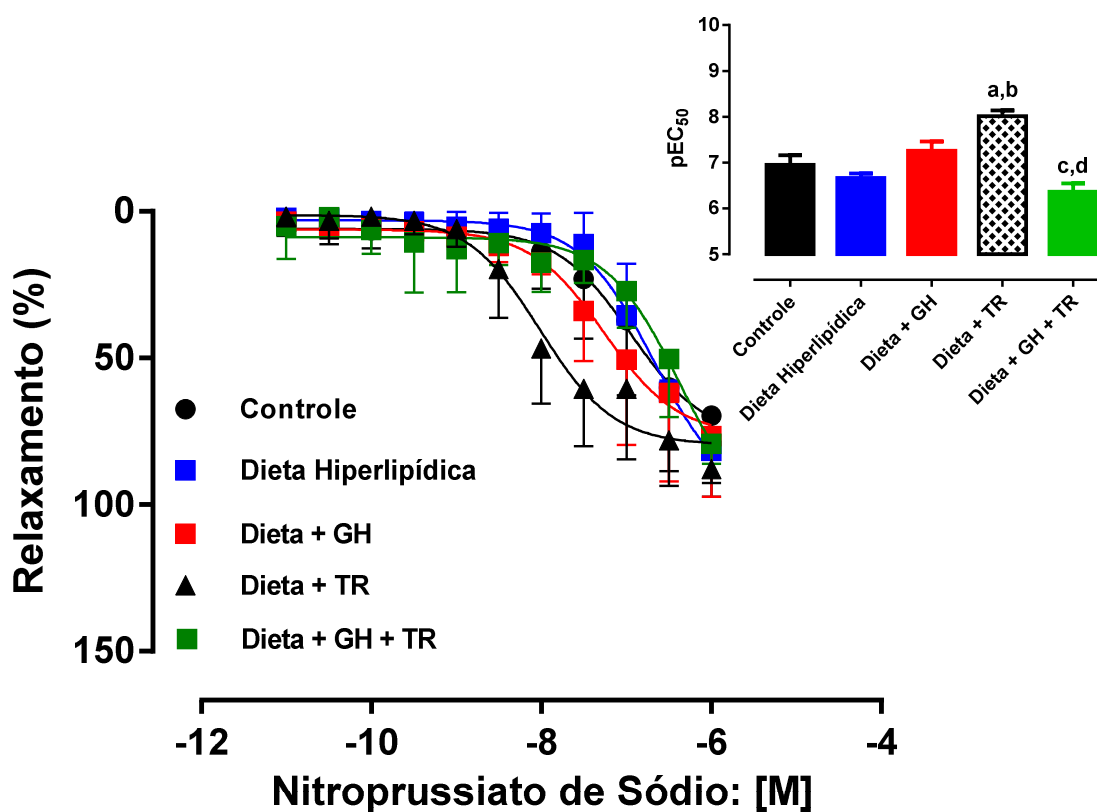


FIGURA 21. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio em artéria mesentérica desprovida de endotélio, de ratos controle e alimentados com dieta hiperlipídica (Dieta), suplementados com G-Hesperidina (GH) e submetidos a treinamento físico (TR). Os dados representam a média \pm E.P.M. de 3 animais. ^a $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. ^b $P < 0,05$ comparado ao grupo dieta hiperlipídica. ^c $P < 0,05$ comparado ao grupo Dieta + GH. ^d $P < 0,05$ comparado ao grupo Dieta + TR.

5 DISCUSSAO

Neste estudo, nós avaliamos os efeitos da administração do flavonoide antioxidante G-hesperidina, associado ou não ao treinamento físico, sobre a composição corporal, parâmetros bioquímicos e a função vascular de ratos obesos. A obesidade foi induzida por uma dieta hiperlipídica associada a uma sobrecarga de frutose, durante um período de 12 semanas, a partir da 4ª. semana de vida dos animais. O tratamento com flavonoide e/ou treinamento físico foram iniciados após 4 semanas de ingestão com a dieta hiperlipídica, e 8 semanas subsequentes, totalizando 12 semanas de estudo. Nós pudemos observar que a ingestão crônica de dieta hiperlipídica por 12 semanas produziu um maior ganho de peso corporal dos animais, quando comparado aos animais alimentados com dieta padrão. O tratamento com a G-hesperidina não preveniu este maior ganho de peso de animais alimentados com dieta hiperlipídica. Por outro lado, quando submetidos a treinamento físico, o ganho de peso corporal dos animais não se mostra diferente do ganho de peso de animais alimentados com a dieta padrão. Em ratos treinados, a administração de G-hesperidina não afetou o padrão de ganho de peso corporal além dos efeitos produzidos pelo exercício físico somente. Além do ganho de peso, avaliamos o acúmulo de gordura corporal, através da pesagem da gordura epididimal e gordura retroperitoneal. Pudemos observar que o acúmulo de gordura corporal foi elevado em todos os grupos alimentados com dieta hiperlipídica, tratados ou não com G-hesperidina, e submetidos ou não ao treinamento físico. Entretanto, nos animais submetidos a treinamento físico somente, o acúmulo de gordura epididimal e retroperitoneal foi menos pronunciado que os demais grupos alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com a G-hesperidina inibiu parcialmente os efeitos positivos do treinamento físico em relação ao acúmulo de gordura corporal, uma vez que o acúmulo de gordura epididimal deste grupo acompanhou o padrão dos grupos tratados com dieta hiperlipídica não treinados. A literatura aponta que flavonoides antioxidantes podem atuar como agentes inibidores da lipogênese, e, portanto, teriam um efeito antiobesidade. Um estudo mostrou que a atividade antioxidante dos flavonoides naringenina, rutina, hesperidina, resveratrol, naringina e quercetina foi capaz de induzir apoptose de pré-adipócitos, com maior

atividade para a quercetina (HSU; YEN, 2006). Por outro lado, outro estudo demonstrou que a G-hesperidina foi eficaz em inibir a lipogênese hepática apenas quando associada à cafeína (OHARA et al., 2015). Similarmente, um estudo com ratos eutróficos submetidos a natação por 12 semanas demonstrou que o ganho de peso corporal é significativamente reduzido por protocolos de treinamento físico contínuo ou intervalado, entretanto, este ganho de peso não é afetado pelo tratamento concomitante com G-hesperidina por 4 semanas (DE OLIVEIRA; DOURADO; CESAR, 2013). Estes dados corroboram nosso achado de que o tratamento com a G-hesperidina não afetou o ganho de peso e acúmulo de gordura corporal, em animais sedentários ou treinados.

Além da composição corporal, avaliamos parâmetros bioquímicos dos animais estudados, através da dosagem plasmática de glicose, colesterol total e triglicérides. Em nosso estudo, apenas o treinamento físico foi capaz de reduzir estes três parâmetros analisados. A G-hesperidina, associada ou não ao treinamento físico, não modificou a concentração plasmática de glicose, colesterol total e triglicérides. Similar ao que foi discutido em relação à composição corporal, estudos revelam que os flavonoides são capazes de modificar o metabolismo de lipídeos, de forma a promover significativa redução dos lipídeos plasmáticos e, portanto, representariam ferramentas importantes para o controle das dislipidemias. O estudo de De Oliveira, Dourado e Cesar (2013), que demonstrou que a G-hesperidina não afeta a composição corporal, revelou que o tratamento com a G-hesperidina não afeta a glicemia, entretanto, reduz significativamente os níveis séricos de triglicérides, colesterol total e a fração LDL, além de promover aumento significativo na fração HDL. Em outro estudo, o tratamento com a neohesperidina por 6 semanas reduziu a glicemia de jejum, a resistência à insulina e o colesterol e triglicérides séricos em camundongos diabéticos (JIA et al., 2015). Em ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica, o tratamento com hesperidina por 12 semanas melhorou o quadro de hipercolesterolemia e esteatose hepática, sem alterar os níveis séricos de LDL-colesterol e triglicérides. Neste estudo, maiores níveis de colesterol foram encontrados nas fezes dos ratos, sugerindo que a hesperidina reduz a absorção do colesterol, além de controlar a expressão gênica de proteínas relacionadas ao metabolismo proteico (WANG et al., 2011). É possível que as diferenças entre os achados que indicam que flavonoides apresentam atividade antiobesidade e antilipemiante estejam

relacionados ao tipo de flavonoide estudado e, adicionalmente, ao modelo experimental, ao tempo e à dose de administração empregados em cada estudo. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender as particularidades da G-hesperidina, em relação ao perfil de ganho de peso e alteração da composição corporal e parâmetros bioquímicos.

Os flavonoides, durante o processo de absorção, sofrem diversas modificações estruturais para que sejam absorvidos e transportados até o fígado pelo sistema porta-hepático. No fígado, os flavonoides sofrem biotransformação por meio de enzimas de conjugação de fase II, UDP's glicuronosiltransferases e sulfotransferases, formando diversos metabólitos (MATSUMOTO et al., 2004). Alguns destes metabólitos podem se tornar mais polares e, portanto, serem eliminados do organismo mais facilmente, podendo assim ser detectados nas fezes, na bile ou na urina (MANACH et al., 2003; YANG et al., 2012). Por passarem por metabolismo hepático e excreção renal, nós avaliamos a função hepática e renal dos grupos submetidos ao tratamento com a G-hesperidina, através dos níveis séricos de albumina e proteínas totais (para avaliação da função hepática) e de ureia (para avaliação da função renal), como um índice de hepato e nefrotoxicidade do tratamento empregado. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com a G-hesperidina não alterou o nível sérico de albumina, proteínas totais e ureia, mostrando que a G-hesperidina não apresenta hepato ou nefrotoxicidade. De fato este é um resultado esperado, uma vez que os dados da literatura demonstram que a hesperidina apresenta efeito protetor contra a hepato e a nefrotoxicidade induzida por medicamentos (KAUR; TIRKEY; CHOPRA, 2006; AHMAD et al., 2012; ANANDAN; SUBRAMANIAN, 2012; BENTILI et al., 2013; SAHU et al., 2013; KAMEL et al., 2014; MAHMOUD, 2014; SCHLOTTFELDT et al., 2015; SIDDIQI et al., 2015a; 2015b; OMAR et al., 2016).

Como já mencionado anteriormente, os flavonoides são conhecidos por sua atividade antioxidante. Em função disto, nós avaliamos a atividade das enzimas antioxidantes endógenas SOD (superóxido dismutase) e catalase, bem como a capacidade antioxidante total e o índice de peroxidação lipídica, a partir de amostras de plasma coletada dos animais de cada grupo. A atividade da catalase não foi modificada em nenhum dos grupos estudados. A atividade da SOD não foi modificada nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica, sedentários, tratados ou não com a G-hesperidina. Entretanto, a atividade da SOD mostrou-se

elevada no grupo alimentado com dieta hiperlipídica e submetido a treinamento físico. Por outro lado, em associação com a G-hesperidina, a atividade da SOD foi significativamente reduzida quando comparado ao grupo dieta + GH sedentário e ao grupo dieta + treinamento físico. Similarmente, a capacidade antioxidante total foi aumentada no grupo submetido a treinamento físico, enquanto que a G-hesperidina não afetou a capacidade antioxidante de animais sedentários ou treinados. Por outro lado, a peroxidação lipídica foi diminuída pelo tratamento com a G-hesperidina, bem como pelo treinamento físico e a associação do treinamento e tratamento. Entretanto, a magnitude da redução da peroxidação lipídica foi maior nos animais submetidos apenas a treinamento físico. Estudos demonstram que o treinamento físico modula a atividade da SOD, aumentando a capacidade antioxidante e diminuindo peroxidação lipídica em modelos experimentais e humanos (BURNEIKO et al., 2006; BOUZID et al., 2015). Por outro lado, há evidências de que o tratamento com antioxidantes possa suprimir o efeito benéfico do exercício físico. O estudo de RISTOW e colaboradores (2009) sugere que o treinamento físico promove um aumento temporário na produção de espécies reativas de oxigênio. Este aumento temporário serve de estímulo para a síntese de maior quantidade de enzimas antioxidantes endógenas. No entanto, os antioxidantes exógenos reagem com as EROS formadas, inibindo o estímulo para a síntese endógena de mais enzimas antioxidantes (RISTOW et al., 2009). Este estudo corrobora nossos dados de que o treinamento físico é capaz de aumentar a capacidade antioxidante, no entanto, a associação com o tratamento com a G-hesperidina, prejudicou os benefícios produzidos pelo exercício físico, diminuindo a atividade endógena da SOD e promovendo redução da peroxidação lipídica em menor magnitude que o efeito do treinamento físico isoladamente. Por outro lado, o tratamento com a G-hesperidina em sedentários não modificou a atividade da SOD ou da catalase, mas diminuiu a peroxidação lipídica, possivelmente pela sua própria ação antioxidante.

Por fim, em artéria mesentérica de ratos, nós avaliamos o relaxamento dependente e independente de endotélio, através de curvas concentração-efeito à acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente. Nossos dados mostram que a obesidade reduziu a potência sem afetar a resposta máxima da acetilcolina em ratos sedentários. Estes dados estão de acordo com o estudo prévio do grupo, que mostrou que o tratamento com dieta

hiperlipídica + frutose reduz a potência da acetilcolina em artéria mesentérica (ROCHA et al., 2014). Por outro lado, o treinamento físico foi ineficaz em prevenir a disfunção endotelial induzida pela dieta hiperlipídica, tendo ainda apresentado uma piora da potência, quando comparado ao grupo que recebeu apenas a dieta hiperlipídica. Contrário aos nossos dados, estudos mostram que ratos alimentados com uma dieta hipercalórica apresentam um menor relaxamento de aorta e artéria mesentérica induzido pela acetilcolina e que o treinamento físico é capaz de melhorar o relaxamento dependente de endotélio (DE MORAES et al., 2007; 2008). Outro estudo demonstrou que a melhora da função endotelial em hamsters alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos a treinamento físico é mais pronunciada quando associada à modificação da dieta (BOA et al., 2014). É possível que as diferenças entre as características da dieta e de idade dos animais sejam os fatores determinantes para estes efeitos controversos. Adicionalmente, também contrário à nossa hipótese, o tratamento com a G-hesperidina reduziu a potência da acetilcolina nos grupos sedentário e treinado. Estudos prévios mostram que o tratamento com flavonoides (hesperidina, naringina e G-hesperidina) tem um papel protetor na disfunção endotelial em ratos hipertensos (YAMAMOTO; SUZUKI; HASE, 2008, YAMAMOTO et al., 2008; IKEMURA et al., 2012). Apesar dos efeitos antiobesidade descritos para a G-hesperidina, não há estudos que avaliem seu papel na função endotelial de ratos obesos. Em relação ao relaxamento independente de endotélio, induzido pelo nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis desprovidos de endotélio íntegro, pudemos observar que a dieta hiperlipídica não afetou o relaxamento do SNP, nem o tratamento com a G-hesperidina. Estudos prévios demonstraram que o relaxamento induzido pelo SNP não é afetado pela dieta e pelo exercício físico (DE MORAES et al., 2007; 2008; BOA et al., 2014). No entanto, em nosso estudo, o exercício físico aumentou a potência do SNP, embora este efeito tenha sido inibido pelo tratamento concomitante com a G-hesperidina. Assim como observamos com o estado oxidativo, o tratamento com a G-hesperidina não afetou ou causou prejuízos aos efeitos do treinamento físico em relação à reatividade vascular, sugerindo que os efeitos dos antioxidantes exógenos podem de fato prejudicar os benefícios promovidos pelo exercício físico.

6 CONCLUSÃO

Nossos achados demonstram que, em modelo experimental de obesidade, o exercício físico é capaz de modificar a composição corporal e parâmetros bioquímicos, além de melhorar o estado oxidativo geral de animais alimentados com dieta hiperlipídica. O tratamento com o flavonoide antioxidante G-hesperidina inibiu os benefícios promovidos pelo exercício físico.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. T.; ARJUMAND, W.; NAFEES, S.; SETH, A.; ALI, N.; RASHID, S.; SULTANA, S. Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in Wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. **Toxicology Lett.**, v. 280, n. 2, p. 149-161, 2012.
- ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. Metabolic syndrome - a new worldwide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. **Diabet. Med.**, v. 23, n. 5, p. 469-480, 2006.
- AMUNA, P.; ZOTOR, F. B. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 67, n. 1, p.82-90, 2008.
- ANANDAN, R.; SUBRAMANIAN, P. Renal protective effect of hesperidin on gentamicin-induced acute nephrotoxicity in male Wistar albino rats. **Redox Rep.**, v. 17, n. 5, p. 219-226, 2012.
- ANDRADE JÚNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.
- ANDRADE-WARTHA, E. R. S. **Capacidade antioxidante in vitro do pedúnculo de caju (Anacardium Occidentale L.) e efeito sobre as enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal.** 2007. 111f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BAHIA, L.; AGUIAR, L. G. K.; VILLELA, N. R.; BOTTINO, D.; BOUSKELA, E. O endotélio na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 2, p. 291-303, 2006.
- BARBOSA, K. B. F.; BRESSAN, J.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. **An. Sist. Sanit. Navar.**, v. 31, n. 3, p. 259-80, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BASSETT JUNIOR, D. R.; HOWLEY, E. T. Maximum oxygen uptake: “classical” versus “contemporary” viewpoints. **Med. Sci Sports Exerc.**, v. 29, n. 5, p. 591- 603, 1997.
- BEHRENDT, D; GANZ, P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. **Am. J. Cardiol.**; v. 90, n. 10C, p. 40L-48L, 2002.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 56, n. 15, p. 6185-6205, 2008.
- BENTLI, R.; CIFTCI, O.; CETIN, A.; UNLU, M.; BASAK, N.; CAY, M. Oral administration of hesperidin, a citrus flavonone, in rats counteracts the oxidative stress, the inflammatory cytokine

- production, and the hepatotoxicity induced by the ingestion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **Eur. Cytokine Netw.**, v. 24, n. 2, p. 91-96, 2013.
- BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1998.
- BOA, B. C. S.; SOUZA, M. D. G. C.; LEITE, R. D.; DA SILVA, S. V.; BARJA-FIDALGO, T. C.; KRAEMER-AGUIAR, L. G.; BOUSKELA, E. Chronic Aerobic Exercise Associated to Dietary Modification Improve Endothelial Function and eNOS Expression in High Fat Fed Hamsters. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e102554, 2014.
- BOLOTINA, V. M.; NAJBI, S; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.
- BOUZID, M. A.; HAMMOUDA, O.; MATRAN, R.; ROBIN, S.; FABRE, C. Influence of physical fitness on antioxidant activity and malondialdehyde level in healthy older adults. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v. 40, n. 6, p. 582-589, 2015.
- BRAVO, L. PolyPhenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BURNEIKO, R. C.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; RODRIGUES, H. G.; EBAID, G. M.; FAINE, L. A.; PADOVANI, C. R.; CICOONA, A. C.; NOVELLI, E. L. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, 2006.
- BURTON, G. J. Oxidative stress. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.
- CALLE; E. E.; THUN, M. J.; PETRELLI, J. M.; RODRIGUEZ C.; HEATH JR, C. W. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 15, p. 1097-1105, 1999.
- CARVALHO, J. F.; MASUDA, M. O.; POMPEU, F. A. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140, n. 4, p. 409-413, 2005.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.
- CHAVES, E. S.; ARAÚJO, T. L.; CHAVES, D. B. R.; COSTA, A. G. S.; OLIVEIRA, A. R. S.; ALVES, F. E. C. Crianças e adolescentes com história familiar de hipertensão arterial: indicadores de risco cardiovasculares. **Acta Paul. Enferm.**, v. 22, n. 6, p. 793-799, 2009.

COROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.**, v. 51, p. 15-25, 2012.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and Phenolic acids. **Ann. Acad. Sci.**, v. 854, n. 1, p. 435-442, 1998.

DALGAARD, K.; LANDGRAF, K.; HEYNE, S.; LEMPRADL, A.; LONGINOTTO, J.; GOSSENS, K.; RUF, M.; ORTHOFER, M.; STROGANTSEV, R.; SELVARAJ, M.; LU, T. T.; CASAS, E.; TEPERINO, R.; SURANI, M. A.; ZVETKOVA, I.; RIMMINGTON, D.; TUNG, Y. C.; LAM, B.; LARDER, R.; YEO, G. S.; O'RAHILLY, S.; VAVOURI, T.; WHITELAW, E.; PENNINGER, J. M.; JENUWEIN, T.; CHEUNG, C. L.; FERGUSON-SMITH, A. C.; COLL, A. P.; KÖRNER, A.; POSPISILIK, J. A. Trim28 Haploinsufficiency Triggers Bi-stable Epigenetic Obesity. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 353-336, 2016.

DE MORAES, C.; CAMARGO, E. A.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; ZANESCO, A. Reactivity of mesenteric and aortic rings from trained rats fed with high caloric diet. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 147, n. 3, p. 788-792, 2007.

DE MORAES, C.; DAVEL, A. P.; ROSSONI, L. V.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol.**, v. 8, n. 12, p. 1-8, 2008.

de OLIVEIRA FARIA, T.; TARGUETA, G. P.; ANGELI, J. K.; ALMEIDA, E. A.; STEFANON I.; VASSALLO, D. V.; de FÚCIO LIZARDO, J. H. Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. **Eur. J. App. Physiol.** v. 110, n. 2, p. 359-366, 2010.

DE OLIVEIRA, D. M.; DOURADO, G. K.; CESAR, T. B. Hesperidin associated with continuous and interval swimming improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. **J. Int. Soc. Sports Nutr.**, v. 10, n. 27, p. 1-7, 2013.

DE SOUZA JUNIOR, T. P.; ASANO, R. Y.; PRESTES, J.; DE SALES, M. P.; DE OLIVEIRA COELHO, J. M.; SIMÕES, H. G. Óxido nítrico e exercício: uma revisão. **Rev. Educ. Fis. U.E.M.**, v. 23, n. 3, p. 469-481, 2012.

DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, I.; BERGERON, J.; PIBAROT, P.; MATHIEU, P.; LAROSE, E. RODÉS-CABAU, J.; BERTRAND, O. F.; POIRIER, P. Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, n. 6, p. 1039-1049, 2008.

DEURENBERG, P.; DEURENBERG YAP, M.; WANG, J.; LIN, F. P.; SCHMIDT, G. The impact of body build on the relationship between body mass index and percent body fat. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 23, n. 5, p. 537-542, 1999.

- DREWNOWSKI, A. Taste preferences and food intake. **Annu. Rev. Nutr.**, v.17, p. 237-253, 1997.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 4, p. 435-450, 2003.
- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenina. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, v. 24, n. 10, p. 851-874, 2004.
- ERSELCAN, T.; CANDAN, F.; SARUHAN, S.; AYCA, T. Comparison of body composition analysis methods in clinical routine. **Ann. Nutr. Metab.**, v.44, n. 4-5, p. 243-248, 2000.
- FÉLÉTOU M.; VANHOUTTE P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 23, n. 12, p. 1082-1090, 1996.
- FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, C. E. R.; FRANÇA, N. M. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina (HOMA-IR). **J. Pediatr.**, v. 83, n. 1, p. 21-26, 2007.
- FILHO, C. B.; DEL FABBRO, L.; GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; SOUZA, L. C.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 698, n. 1, p. 286-291, 2013.
- FISBERG, R. M.; MARTINI, L. A.; SLATER, B. **Métodos de inquéritos alimentares**. São Paulo: Manole; p. 1-31, 2005.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADSKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.
- GIBSON, A. C.; LAMBERT, M. I.; NOAKES, T. D. Neural control of force output during maximal and submaximal exercise. **Sports Med.**, v. 31, n. 9, p. 637-650, 2001.
- GOEDECKE, J. H.; GIBSON, A. C.; GROBLER, L.; COLLINS, M.; NOAKES, T. D.; LAMBERT, E. V. Determinants of the variability in respiratory exchange ratio at rest and during exercise in trained athletes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 279, n. 6, p. 1325-1334, 2000.
- GOMES, F.; TELO, D. F.; SOUZA, H. P.; NICOLAU, J. C.; HALPERN, A. S.; SERRANO JR., C. V. Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 94, n. 2, p. 273-279, 2010.

GORTMAKER, S. L.; MUST, A.; PERRIN, J. M.; SOBOL, A. M.; DIETZ, W. H. Social and economic consequences of overweight in adolescence and young adulthood. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, n. 14, p.1008-1012, 1993.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. **Encyclopedia of Life sciences.**, p. 1-7, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HARMS, C. A. Effects of skeletal muscle demand on cardiovascular function. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 32, n. 1, p. 94-99, 2000

HAWLEY, J. A. Specificity of training adaptation: time for a rethink? **J. Physiol.**, v. 586, n. 1, p. 1-2, 2008.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBIYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v. 13, n. 10, p. 572-584. 2002.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-disease - The Zutphen elderly study **The Lancet.** v. 342, n. 8878, p. 1007-1011, 1993.

HIGASHI, Y.; YOSHIKAWA, M. Exercise and endothelial function: Role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacol. Ther.**, v. 102, n. 1, p. 87-96, 2004.

HOWARD, B. V.; MANSON, J. E.; STEFANICK, M. L.; BERESFORD, S. A.; FRANK, G.; JONES, B. Low-fat dietary pattern and weight change over 7 years: the Women's Health Initiative Dietary Modification Trial. **JAMA**, v. 295, n. 1, p. 39-49, 2006.

HSU, C. L.; YEN, G. C. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 50, n. 11, p. 1072-1079, 2006.

HUANG, H. H.; FARMER, K.; WINDSCHEFFEL, J.; YOST, K.; POWER, M.; WRIGHT, D. E.; STEHNO-BITTEL, L. Exercise increases insulin content and basal secretion in pancreatic islets in type 1 diabetic mice. **Exp. Diabetes Res.**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

IKEMURA, M.; SASAKI, Y.; GIDDINGS, J. C.; YAMAMOTO, J. Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Phytother. Res.**, v. 26, n. 9, p. 1272-1277, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE PESQUISA E ESTATÍSTICA (IBGE), **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009.** Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoadevida/pof/2008_2009_encaa/default.shtm>. Acesso em: 7 de maio, 2015.

JEFFREYS, M.; MCCARRON, P.; GUNNELL, D.; MCEWEN, J.; SMITH, G. D. Body mass index in early and mid-adulthood, and subsequent mortality: a historical cohort study. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, n. 11, p. 1391-1397, 2003.

JIA, S.; HU, Y.; ZHANG, W.; ZHAO, X.; CHEN, Y.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of neohesperidin derived from *Citrus aurantium* L. in diabetic KK-A(y) mice. **Food Funct.**, v. 6, n. 3, p. 878-886, 2015.

JORDÃO Jr., A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina** (Ribeirão Preto Online), v. 31, n. 3, p. 434-449, 1998.

KAMEL, K.; ABD EL-RAOUF, O. M.; METWALLY, S. A.; ABD EL-LATIF, H. A.; EL-SAYED, M. E. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 28, n. 7, p. 312-319, 2014.

KAUR, G.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity. **Toxicol.**, v. 226, n. 2-3, p. 152-160, 2006.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 100, n. 5, p. 567-575, 1993.

KINGWELL, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB J.**, v. 14, n. 12, p. 1685-1696, 2000.

KINLAY, S.; LIBBY, P.; GANZ, P. Endothelial function and coronary artery disease. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 12, n. 4, p. 383-389, 2001.

KNEKT, P.; RITZ, J.; PEREIRA, M. A.; O'REILLY, E. J.; AUGUSTSSON, K.; FRASER, G. E.; GOLDBOURT, U.; HEITMANN, B. L.; HALLMANS, G.; LIU, S.; PIETINEN, P. Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a Pooled analysis of 9 cohorts. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, n. 6, p. 1508-1520, 2004.

KONTUREK, S. K.; KONTUREK, P. C. Role of Nitric Oxide in the Digestive System. **Digestion**, v. 56, n. 1, p. 1-13, 1995.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, n. 11, p. 4651-4655, 1991.

KUSHNER, R. F.; KUNIGK, A.; ALSPAUGH, M.; ANDRONIS, P. T.; LEITCH, C. A.; SCHOELLER, D. A. Validation of bioelectrical impedance analysis as a measurement of change in body composition in obesity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 52, n. 2, p. 219-223, 1990.

LABARTHE, D. R.; DUNBAR, S. B. Global cardiovascular health promotion and disease prevention 2011 and beyond. **Circulation**, v. 125, n. 21, p. 2667-2676, 2012.

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ S.; CHEPENIK, K. P.; WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 3, p. 375-414, 2000.

LUI, R. H.; HOTCHKISS, J. H. Potencial genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. **Mutat. Res.**, v. 339, n. 2, p. 73-89, 1995.

MAGALHÃES, F. J.; MENDONÇA, L. B. A.; REBOUÇAS, C. B. A.; LIMA, F. E.; CUSTÓDIO, I. L.; OLIVEIRA, S. C. Fatores de risco para doenças cardiovasculares em profissionais de enfermagem: estratégias de promoção da saúde. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 67, n. 3, p. 394-400, 2014.

MAHMOUD, A. M. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 92, n. 9, p. 717-724, 2014.

MANACH, C. 1.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; REMESY, C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 57, n. 2, p. 235-242, 2003.

MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Letters**, v. 426, n. 3, p. 331-336, 1998.

MANTHEY, J. A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, n. 2, p. 135- 153, 2001.

MARIATH, A. B; GRILLO, L. P.; SILVA, R. O.; SCHMITZ, P.; CAMPOS, I. C.; MEDINA, J. R. P.; KRUGER, R. M. Obesidade e fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis entre usuários de unidade de alimentação e nutrição. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 897-905, 2007.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927-930, 1994.

MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochem.**, v. 27, n. 24, p. 8706-8711, 1988.

MARTINS, L. N.; SOUZA, L. S.; SILVA, C. F.; MACHADO, R. S.; SILVA, C. E. F.; VILAGRA, M. M.; CARVALHO, C. V. A.; PEREIRA, A. B. C. N. G. Prevalência dos Fatores de Risco Cardiovascular em Adultos Admitidos na Unidade de Dor Torácica em Vassouras, RJ. **Rev. Bras. Cardiol.**, v. 24, n. 5, p. 299-307, 2011.

MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; SUGIURA, M.; MASAMICHI Y.; HASEGAXA, Y. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. **Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 21, p. 6653-6659, 2004.

MEHTA, J. L.; LI, D. Facilitative interaction between angiotensin II and oxidized LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. **J. Renin-Angiotensin Aldosterone System**, v. 2, n. 1, p. S70-S76, 2001.

MILLER, V. M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. **Am. J. Physiol.**, v. 248, n. 4, p. H432-H437, 1985.

MOLARIUS, A.; SEIDELL, J. C.; SANS, S.; TUOMILEHTO, J.; KUULASMAA, K. Varying sensitivity of waist action levels to identify subjects with overweight or obesity in 19 populations of the WHO MONICA Project. **J. Clin. Epidemiol.**, v. 52, n. 12, p. 1213-1224, 1999.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, p. 663-665, 1976.

MONTEIRO, C. A.; CONDE, W.L.; POKIN, B. M. Independent effects of income and Obesity: education on the risk of obesity in the Brazilian adult population. **J. Nutr.**, v. 131, n. 3, p. 881S-886S, 2001.

MONTENEGRO NETO, A. N.; SIMÕES, M. O. S.; MEDEIROS, A. C. M.; PORTELA, A. S.; DANTAS, P. M. S.; KNACKFUSS, M. R. Estado nutricional alterado e sua associação com perfil lipídico e hábitos de vida em idosos hipertensos. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, v. 58, n. 4, p. 350-356, 2008.

MYIASAKA, C. K.; MENDONÇA, J. R.; NISHIYAMA, A.; ALVES DE SOUZA, J. A.; DE MELO, M. P.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R. Comparative effects of fish oil given by gavage and fish oil-enriched diet on leukocytes. **Life Sciences**, v. 69, n. 15, p. 1739-1751, 2001.

N. C. D. RISK FACTOR COLLABORATION. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377-1396, 2016.

NATHAN, C.; XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 269, P. 13725-13728, 1994.

NEDEL, D.R. **Antioxidantes x radicais livres**: a influência das vitaminas antioxidantes no retardo do envelhecimento cutâneo. 2005. 78 f. Monografia - Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NEVES, L. C. Frutos- O remédio do futuro. **Rev. Bras. Fruticultura**, v. 34, n. 4 p. 1, 2012.

NIELSEN, I. L.; CHEE, W. S.; POULSEN, L.; OFFORD-CAVIN, E.; RASMUSSEN, S. E.; FREDERIKSEN, H.; ENSLEN, M.; BARRON, D.; HORCAJADA, M. N.; WILLIAMSON, G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **J. Nutr.**, v. 136, n. 2, p. 404-408, 2006.

ODLAND, L. M.; HEIGENHAUSER, G. J. F.; SPRIET, L. L. Effects of high fat provision on muscle PDH activation and malonyl-CoA content in moderate exercise. **J. Appl. Phys.** v. 89, n. 6, p. 2352–2358, 2000.

OHARA, T.; MUROYAMA, K.; YAMAMOTO, Y.; MUROSAKI, S. A combination of glucosyl hesperidin and caffeine exhibits an anti-obesity effect by inhibition of hepatic lipogenesis in mice. **Phytother Res.**, v. 29, n. 2, p. 310-316, 2015.

OLUSI, S.O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 26, n. 9, p. 1159-1164, 2002.

OMAR, H. A.; MOHAMED, W. R.; ARAFA, E. S.; SHEHATA, B. A.; SHERBINY, G. A.; ARAB, H. H.; ELGENDY, A. N. Hesperidin alleviates cisplatin-induced hepatotoxicity in rats without inhibiting its antitumor activity. **Pharmacol. Rep.**, v. 68, n. 2, p. 349-356, 2016.

PAIVA, S. A. R.; RUSSEL, R. M.; DUTTA, S. K. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 18, n. 5, p. 426-433, 1999.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; VIKRAM, A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, n. 18, p. 8142-8160, 2009.

PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas**: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. São Paulo, Manole, 2003. 612 p.

PEREIRA, R. A.; MARINS, V. M. R.; SICHIERI, R. Nutritional profile of adult people in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. In: 16th International Congress of Nutrition. **Annals of the 16th International Congress of Nutrition**. Montreal, CA. 1997, p. 302.

PETERSON, G. D; CARPENTER, S. R; BROCK, W. A. Uncertainty and the Management of Multistate Ecosystems: an apparently rationale route to collapse. **Ecology**, v. 84, n. 6, p. 1406-1411, 2003.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PILEGAARD, H.; OSADA, T.; ANDERSEN, L. T.; HELGE, J. W.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Substrate availability and transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle during recovery from exercise. **Metabolism**, v. 54, n. 8, p. 1048–1055, 2005.

PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-UŚCIŁKO, H.; NAZAR, K.; WOJTINA, J. Anaerobic Thershold in rats. **Biochem. Physiol.**, v. 106, n. 2, p. 285-289, 1993.

POPKIN, B. M. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 84, n. 2, p. 289-298, 2006.

POULIOT, M. C.; DESPRÉS, J. P.; LEMIEUX, S.; MOORJANI, S.; BOUCHARD, C.; TREMBLAY, A.; NADEAU, A.; LUPIEN P. J. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. **Am. J. Cardiol.**, v. 73, n. 7, p. 460-468, 1994.

PRASAD, N. R.; KARTHIKEYAN, A.; KARTHIKEYAN, S.; REDDY, B. V. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. **Mol. Cell Biochem.**, v. 349, n. 1-2, p. 11-19, 2011.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin. Interv. Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RANKINEN, T.; KIM, S. Y.; PÉRUSSE, L.; DESPRÉS, J. P.; BOUCHARD, C. The prediction of abdominal visceral fat level from body composition and anthropometry: ROC analysis. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 23, n. 8, p. 801-809, 1999.

REXRODE, K. M.; CAREY, V. J.; HENNEKENS, C. H.; WALTERS, E. E.; COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C.; MANSON, J. E. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. **JAMA**, v. 280, n. 21, p.1843-1848, 1998.

RIBEIRO, A. G.; COTTA, R. M. M.; RIBEIRO, S. M. R. A promoção da saúde e a prevenção integrada dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Ciênc. Saúde Colet.**, v. 17, n. 1, p. 7-17, 2012.

RIBEIRO-FILHO, F. F.; FARIA, A. N.; KOHLMANN, N. E.; ZANELLA, M. T.; FERREIRA, S. R. Two-hour insulin determination improves the ability of abdominal fat measurement to identify risk for the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 26, n. 6, p. 1725-1730. 2005.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and Phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RISTOW, M.; ZARSE, K.; OBERBACH, A.; KLÖTING, N.; BIRNINGER, M.; KIEHNTOPF, M.; STUMVOLL, M.; KAHN, C. R.; BLÜHER, M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 26, n. 21, p. 8665-8670, 2009.

ROCHA, T.; MENDES, I. R.; COSTA, T. M.; RAVOS, A. G.; OLIVEIRA, R. A.; CLAUDINO, M. A.; PRIVIERO, F. B. M. Functional and morphological evaluation of the mesenteric artery, kidney and liver from obese rats: impact of a high fat diet plus fructose. **J. Mol. Genet. Med.**, S1-013, 2014.

ROSMOND, R.; BJORNTORP, P. Psychiatric illhealth of women and its relationship to obesity and body fat distribution. **Obes. Rev.**, v. 6, n. 5, p. 338-345, 1998.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, n. 1, p. 19-34, 2002.

ROSS, R.; LEGER, L.; MORRIS, D.; DE GUISE, J.; GUARDO, R. Quantification of adipose tissue by MRI: relationship with anthropometric variables. **J. Appl. Physiol.**, v. 72, n. 2, p. 787-795, 1992.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **Am. J. Physiol.**, v. 250, n. 5, p. H822-H827, 1986.

SAHU, B. D.; KUNCHA, M.; SINDHURA, G. J.; SISTLA, R. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 453-460, 2013.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, n. 6, p. 276-282, 2002.

SCHLOTTFELDT, F. D.; FERNANDES, S. M.; MARTINS, D. M.; CORDEIRO, P.; FONSECA, C. D.; WATANABE, M.; VATTIMO, M. F. Prevention of amphotericin B nephrotoxicity through use of phytotherapeutic medication. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 49, p. 74-79, 2015.

SCHMIDT, H. H.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; GORSKY, L. D.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating factor synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 88, n. 2, p. 365-369, 1991.

SHEN, W.; ZHANG, X.; ZHAO, G.; WOLIN, M. S.; SESSA, W.; HINTZE, T. H. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 27, n. 8, p. 1125-1134, 1995.

SIDDIQI, A.; HASAN, S. K.; NAFEES, S.; RASHID, S.; SAIDULLAH, B.; SULTANA, S. Chemopreventive efficacy of hesperidin against chemically induced nephrotoxicity and renal carcinogenesis via amelioration of oxidative stress and modulation of multiple molecular pathways. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 99, n. 3, p. 641-653, 2015a.

SIDDIQI, A.; NAFEES, S.; RASHID, S.; SULTANA, S.; SAIDULLAH, B. Hesperidin ameliorates trichloroethylene-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress and apoptosis in wistar rats. **Mol. Cell Biochem.**, v. 406, n. 1-2, p. 9-20, 2015b.

SILALAHI, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 11, n. 1, p. 79-84, 2002.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia integrada, fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. 432 p.

SINGH, P. P.; CHANDRA, A.; MAHDI, F.; ROY, A.; SHARMA, P. Reconvence and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. **Indian J. Clin. Biochem.**, v. 25, n. 3, p. 225-243, 2010.

SIPPEL, C.; BASTIAN, R. M. A.; GIOVANELLA, J.; FACCIN, C.; CONTINI, V.; BOSCO, S. M. Processos Inflamatórios na Obesidade. **Rev. Aten. Saúde**. v. 12, n. 42, p. 48-56, 2014.

SNYDER, S. H.; BREDET, D. S. Biological role of nitric oxide. **Sci. Am.**, v. 266, n. 5, p. 68-71, 1992.

SOUZA, H. C.; PENTEADO, D. M.; MARTIN-PINGE, M. C.; BARBOSA NETO, O.; TEIXEIRA, V. D.; BLANCO, J. H.; SILVA, V. J. O bloqueio da síntese do óxido nítrico promove aumento da hipertrofia e da fibrose cardíaca em ratos submetidos a treinamento aeróbio. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 89, n. 2, p. 99-104, 2007.

SOUZA, V. T. **Avaliação do perfil lipidômico, da lipoperoxidação e biodisponibilidade em ratos suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2015.

STAHL, W.; AUST, O.; SIES, H.; POLIDORI, M. C. Total antioxidant activity and fiber content of select Floridagrown tropical fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 19, p. 7355-7363, 2006.

STOCKER, R.; BOWRY, V. W.; FREI, B. Ubiquinol-10 Protects human low density lipoprotein more effeciently against lipid peroxidation than does alfa-tocopherol. **Proc. Natl. Sci. USA**, v. 88, n. 5, p. 1646-1650, 1991.

STOLK, R. P.; WINK, O.; ZELISSEN, P. M.; MEIJER, R.; VAN GILS, A. P.; GROBBE, D. E. Validity and reproducibility of ultrasonography for the measurement of intra-abdominal adipose tissue. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 25, n. 9, p. 1346-1351, 2001.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 82, n. 22, p. 7738-7742, 1985.

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic threshold: The concept and methods of measurement. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 28, n. 2, p. 299-323, 2003.

SWINBURN, B. A.; RAVUSSIN, E. Energy and macronutrient metabolism. **Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 8, n. 3, p. 527-548, 1994.

SZMITKO, P. E.; WANG, C. H.; WEISEL, R. D.; DE ALMEIDA, J.; ANDERSON, T.; VERMA, S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: part I. **Circulation**, v. 108, n. 16, p. 1917-1923, 2003.

TABASSUM, A.; BRISTOW, R. G.; VENKATESWARAN, V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? **Cancer Treat. Rev.**, v. 36, n. 3, p. 230-234, 2010.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertens.**, v. 42, n. 6, p. 1075-81, 2003.

TAYLOR, H. L.; BUSKIRK, E.; HENSCHL, A. Maximal oxygen uptake as an objective measure of cardiorespiratory performance. **J. Appl. Phys.**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 1955.

THAETE, F. L.; COLBERG, S. R.; BURKE, T.; KELLEY, D. E. Reproducibility of computed tomography measurement of visceral adipose tissue area. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.** v. 19, n. 7, p. 464-467, 1995.

THOMAS, D. W.; RYDE, S. J.; ALI, P. A.; BIRKS, J. L.; EVANS, C. J.; SAUNDERS, N. H.; AL-ZEIBAK, S.; DUTTON, J.; HANCOCK, D. A. The performance of an infra-red interactance instrument for assessing total body fat. **Physiol. Meas.**, v. 18, n. 4, p. 305-315, 1997.

VANHOUTTE, P. M.; KATUSIC, Z. S. Endothelium-derived contracting factor: endothelin and/or superoxide anion? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 9, p. 229-230, 1988.

VELTMAR, A.; GOHLKE, P.; UNGER, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. **Am. J. Hypertens.**, v. 4, n. 3, p. 263S-269S, 1991.

VERVOOT, L. M. T.; RONDEN, J. E.; THIJSEEN, H. H. W. The Potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 54, n. 8, p. 871-876, 1997.

WAJCHENBERG, B. L. Tecido adiposo como glândula endócrina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 44, n. 1, p. 13-20, 2000.

WANG, X.; HASEGAWA, J.; KITAMURA, Y.; WANG, Z.; MATSUDA, A.; SHINODA, W.; MIURA, N.; KIMURA, K. Effects of hesperidin on the progression of hypercholesterolemia and fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 117, n. 3, p. 129-138, 2011.

WATKINS, M. L.; ERICKSON, J. D.; THUN, M. J.; MULINARE, J.; HEALTH, C. W. Multivitamin use and mortality in large prospective study. **Am. J. Epidemiol.**, v. 152, n. 2, p. 149-162, 2000.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; EDEN, M. E. V.; AUST, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, n. 7, p. 577-583, 2002.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/>>, Acesso em: 10 jun. 2016.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. **World Health Organization**, n. 284. p.256, 2000.

WILMORE, J. H. Applied exercise physiology: A personal perspective of the past, present, and future. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 31, n. 4, p. 159-160, 2003.

WILMORE, J. H.; COSTIL, D. L. Physical energy: fuel metabolism. **Nutr. Rev.**, v. 59, n. 1, p. S13-S16, 2001.

WITT, K. A.; BUSH, E. A. College athletes with an elevated body mass index often have a high upper arm muscle area, but not elevated triceps and subscapular skinfolds. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 105, n. 4, p. 599-602, 2005.

YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N.; MITSUZUMI, H.; MIWA, Y.; KUBOTA, M.; CHAEN, H.; KIBATA, M. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 6, p. 1386-1394, 2006.

YAMAMOTO, M.; SUZUKI, A.; HASE, T. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 54, n. 1, p. 95-98, 2008.

YAMAMOTO, M.; SUZUKI, A.; JOKURA, H.; YAMAMOTO, N.; HASE, T. Glucosyl hesperidin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 470-476, 2008.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v.31, n.332, p. 411-415, 1988.

YANG, H. L.; CHEN, S. C; KUMAR, S.; YU, K. N; CHAO, P. D. L.; TSAI, S. Y.; HOU, Y. C.; HSEU, Y. C. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, n. 1, p. 522-532, 2012.

YAO, M.; ROBERTS, S. B.; PAN, H.; MCCRORY, M. A. Field methods for body composition assessment are valid in healthy chinese adults. **J. Nutr.**, v. 132, n. 2, p. 310-317, 2002.

ZHANG, J.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxid activation of poly (ADP-ribose) synthase in Neurotoxicity. **Science**, v. 263, N. 5147, p. 687-689, 1994.

ZHANG, Q.; NACHMAN, R. J.; KACZMAREK, K.; ZABROCKI, J.; DENLINGER, D. L. Disruption of insect diapause using agonists and an antagonist of diapause hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 108, n. 41, p. 16922–16926, 2011.