

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Jéssica Leite Garcia**

**Influência da intervenção com  $\gamma$ -orizanol na  
prevenção da síndrome metabólica cardiorrenal em  
ratos obesos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Renata Corrêa  
Coorientador: Prof. Dr. Giancarlo Aldini

**Botucatu  
2022**

Jéssica Leite Garcia

Influência da intervenção com  $\gamma$ -orizanol na  
prevenção da síndrome metabólica cardiorrenal  
em ratos obesos

Tese apresentada à Faculdade  
de Medicina, Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título  
de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa.Dra. Camila Renata Corrêa  
Coorientador: Prof.Dr. Giancarlo Aldini

Botucatu  
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Garcia, Jéssica Leite.

Influência da intervenção com  $\gamma$ -orizanol na prevenção da síndrome metabólica cardiorrenal em ratos obesos / Jéssica Leite Garcia. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Camila Renata Corrêa  
Capes: 40501000

1. Dieta ocidental. 2. Obesidade. 3. Proteômica. 4. Síndrome metabólica.

Palavras-chave: Dieta ocidental; Disfunção cardíaca e renal; Gama-orizanol; Obesidade; Proteômica label-free.

*Dedicatória*

*À minha amada sobrinha Helena. Te dedico meu trabalho na esperança de me tornar um exemplo e te inspirar a seguir seus sonhos. Obrigada por nos encher de amor, risos e sorrisos e tornar cada pequena descoberta um momento fantástico.*

*À minha família, obrigada por todo o suporte para que eu chegasse até aqui. Cada vitória minha, é também de vocês. Meus amados pais, Reginaldo Garcia Pinto e Tania Maria Leite Pinto, vocês são minha fortaleza, aos quais nunca serei capaz de expressar minha gratidão por todo o amor e apoio; e a minha irmã Ana Cláudia Leite Garcia, obrigada por acreditar no meu potencial e estar incondicionalmente ao meu lado. Vocês foram meus grandes incentivadores.*

*Ao meu melhor amigo, meu parceiro de vida Guilherme Guida de Oliveira, que esteve ao meu lado pacientemente todos esses anos e por tantas longas distâncias, dividindo as angústias, celebrando minhas conquistas e se orgulhando delas. Obrigada pela fé que depositou em mim, me mantendo firme quando eu mesma estava incerta. Obrigada por embarcar comigo em minhas escolhas e fazer dos meus sonhos os seus também. E, acima de tudo, por sempre me lembrar que a vida é para ser (bem) vivida todos os dias.*

# *Agradecimentos*

*Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Camila Renata Correa, que me ensinou da teoria à prática e, ainda, foi muito além do conhecimento científico. Ensinou paciência, resiliência e calma diante das adversidades. Obrigada por acreditar em mim, por me incentivar a melhorar e por lutar pelos meus objetivos comigo.*

*A todos os colegas do laboratório Redox. Obrigada pela chance de aprender tanto e também de compartilhar conhecimento e por toda a contribuição do grupo à minha formação.*

*Aos colegas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Università degli Studi di Milano, Milão-Itália, obrigada por me receberem com tanta boa vontade e carinho. Ao Professor Giancarlo Aldini, obrigada pela oportunidade única. A Professora Alfonsina D'Amato, obrigada por todo o ensinamento, empatia e confiança. Às colegas, Alessandra Altomore e Gioavanna Baron, obrigada pela disponibilidade em ajudar e pela companhia diária.*

*À Tháís Silva Pinto, Elisa Pioltine, Mariana Janini Gomes, Jéssica Chechi, Danielle Fernandes Vileigas, Cristina Schmitt Gregolin e Mariane Róvero Costa. Mulheres incríveis, excelentes profissionais, grandes inspirações. Obrigada pela parceria no trabalho e amizade nos bons e nos piores momentos. Vocês tornaram os dias e o trabalho mais leves.*

*Desejo todo o sucesso do mundo a vocês!*

*A todos os colegas pós-graduandos e cientistas com quem pude compartilhar conhecimento, ensinar e aprender.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Patologia, em especial a coordenadora Prof. Dra Márcia Guimarães Silva.*

*Aos funcionários da Pós-graduação da FMB-UNESP, Botucatu, especialmente à Vânia do Amaral Soler secretária do Programa de Patologia.*

*Ao Prof. Dr Antonio Carlos Cicogna pelas reuniões e discussões científicas enriquecedoras.*

*A Prof. Dra Danielle F. Vileigas e o Prof. Dr. Guilherme Romualdo pelas considerações e sugestões realizadas durante o exame geral de qualificação.*



*A todos os funcionários e a Coordenação da Unidade de Pesquisa Experimental da FMB-UNESP (UNIPEX) pelo suporte técnico no desenvolvimento da tese.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp (processo 2018/15294-3) - Auxílio regular.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo 167750/2018-6) - Bolsa.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (processo 88887.466951/2019-00) - Programa Institucional de Internacionalização.*

*Epígrafe*

*“Existem muitas hipóteses na ciência que são erradas.  
Isso é perfeitamente correto; elas são a abertura para  
descobrir o que é certo.”*

*- Carl Sagan*

*Resumo*

**Introdução:** O padrão alimentar atual, conhecido como Dieta Ocidental, é caracterizado por alimentos de alta densidade energética ricos em açúcares e gordura, associado à prevalência da obesidade, um problema de saúde pública e plano de fundo para desenvolvimento de outras doenças como a síndrome metabólica cardiorenal (SMCR). A SMCR define a coexistência de disfunção cardíaca e renal que compartilham mecanismos fisiopatológicos decorrentes da obesidade. Considerando a busca de alternativas para prevenir esses desfechos nocivos, o composto bioativo gama-orizanol ( $\gamma$ Oz) se destaca por apresentar efeitos benéficos, como a ação anti-inflamatória e antioxidante. **Objetivo:** Avaliar o efeito preventivo do  $\gamma$ Oz sobre a SMCR em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcares e gordura. **Materiais e métodos:** O estudo foi aprovado pela Comissão Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (1309/2019). 21 ratos *Wistar*, foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos: controle (n=7), high-sugar fat (HSF, n=7) e HSF +  $\gamma$ Oz (n=7), por 30 semanas. O grupo controle recebeu dieta padrão + água, os grupos HSF receberam dieta rica em açúcares e gordura + água acrescida da 25% de sacarose. O grupo HSF +  $\gamma$ Oz recebeu o composto isolado na dose de 0.5% adicionado à ração. O peso corporal foi acompanhamento semanalmente. Na 30ª semana, foram realizadas as análises de pressão arterial sistólica, ecocardiograma e coleta de urina 24 horas. Posteriormente, os animais foram submetidos a jejum por 8 horas e à eutanásia. Foram coletados o plasma, para análises metabólicas, depósitos de gordura corporal para caracterizar a obesidade, coração e rins para análise do proteoma. Dados paramétricos estão apresentados em média e desvio padrão e não-paramétricos apresentados em mediana e intervalo interquartil, analisados por ANOVA uma via seguido de teste *post-hoc* de Tukey ou Kruskal Wallis seguindo de teste de Dunn's, respectivamente. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. **Resultados:** O grupo HSF apresentou maior

peso corporal e índice de adiposidade, níveis plasmáticos elevados de glicose, triglicérides, insulina e aumento da AUC (tolerância a glicose) e índice de resistência à insulina. A disfunção renal foi marcada por aumento da razão proteína/creatinina e diminuição da taxa de filtração glomerular e, no coração, foi verificada a presença de alterações estruturais e disfunção sistólica. O  $\gamma$ Oz preveniu a obesidade, elevação dos níveis de triglicérides, intolerância à glicose e resistência à insulina, assim como a disfunção em ambos os órgãos estudados. No tecido renal, o composto atuou sobre os processos biológicos de formação de espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo e proteínas da cadeia respiratória mitocondrial. No tecido cardíaco, o  $\gamma$ Oz atuou sobre os processos de síntese lipídica, fibrose, proteínas envolvidas na contratilidade cardíaca e também da cadeia respiratória mitocondrial. **Conclusão:** O  $\gamma$ Oz preveniu alterações no proteoma renal e cardíaco relacionadas ao estresse oxidativo e função mitocondrial, mecanismos fundamentais para o desenvolvimento da doença.

**Palavras-chave:** dieta ocidental, obesidade, disfunção cardíaca, disfunção renal,  $\gamma$ -orizanol, proteômica *label-free*.

*Abstract*

**Introduction:** The Western Diet is characterized by high energy density foods rich in sugars and fat which is associated with the prevalence of obesity, a public health problem and the onset for the development of other diseases such as cardiorenal metabolic syndrome (CRMS). The SMCR defines the coexistence of cardiac and renal dysfunction sharing pathophysiological mechanisms. Considering the search for alternatives to prevent these harmful outcomes, the bioactive compound gamma-oryzanol ( $\gamma$ Oz) is highlighted for its beneficial effects, such as anti-inflammatory and antioxidant action. **Aim:** To evaluate the preventive effect of  $\gamma$ Oz on the CRMS in a high sugar-fat-induced obesity model. **Materials and methods:** The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (1309/2019). 21 *Wistar* rats were randomly distributed into 3 groups: control (n=7), high-sugar fat (HSF, n=7) and HSF +  $\gamma$ Oz (n=7), for 30 weeks. The control group received a standard diet + water, the HSF groups received the high sugar-fat diet + 25% sucrose in drinking water. The HSF +  $\gamma$ Oz group received the isolated compound at the dose of 0.5% added to the diet. Body weight was monitored weekly. At the 30th week, systolic blood pressure, echocardiogram and 24-hour urine collection were performed. Subsequently, the animals were fasted for 8 hours and euthanized. Plasma were collected for metabolic analysis, body fat deposits to characterize obesity, heart and kidneys for proteome analysis. Parametric data are presented as mean and standard deviation and non-parametric data are presented as median and interquartile range, analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* or Kruskal Wallis test followed by Dunn's test, respectively. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. **Results:** The HSF group presented higher body weight and adiposity index, higher plasma levels of glucose, triglycerides, insulin and increased AUC (glucose tolerance) and insulin resistance index. Renal dysfunction was marked by an increase in the protein/creatinine ratio and a



decrease in the glomerular filtration rate and, in the heart, it was observed structural alterations and systolic dysfunction.  $\gamma$ Oz prevented obesity, elevation of triglycerides levels, glucose intolerance and insulin resistance, as well as the dysfunction of both organs studied. In kidney tissue, the compound acted on the biological processes of formation of reactive oxygen species, oxidative stress and mitochondrial respiratory chain proteins. In cardiac tissue,  $\gamma$ Oz acted on the processes of lipid synthesis, fibrosis, proteins involved in cardiac contractility and also on the mitochondrial respiratory chain. **Conclusion:** The  $\gamma$ Oz prevented changes in the kidney and heart proteome related to oxidative stress and mitochondrial function, key mechanisms for the development of the disease.

**Key-words:** western diet, obesity, cardiac dysfunction, renal dysfunction,  $\gamma$ -orizanol, label-free proteomics.

# *Lista de Ilustrações*

<b>Figura 1.</b> Alterações metabólicas e em diferentes órgãos decorrentes da obesidade.....	30
<b>Figura 2.</b> Vista sagital do coração e grandes vasos.....	32
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do sarcômero.....	34
<b>Figura 4.</b> Vista sagital do rim e sua anatomia.....	36
<b>Figura 5.</b> Representação do néfron em um lobo renal.....	37
<b>Figura 6.</b> Representação da fisiopatologia da SMCR.....	49
<b>Figura 7.</b> Estrutura do $\gamma$ Oz.....	53
<b>Figura 8.</b> Estrutura do $\gamma$ Oz grão de arroz e seus subprodutos.....	55
<b>Figura 9.</b> Mecanismo antioxidante do $\gamma$ Oz.....	61

# *Lista de Tabelas*

**Tabela 1.** Exemplos de compostos bioativos e suas fontes alimentares..51

*Lista de Abreviaturas e  
Siglas*

4-HNE	4-hidroxinonenal
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACR	Acroleína
AD	Átrio direito
AE	Átrio esquerdo
AGEs	Produtos da glicação avançada, do inglês <i>advanced glycation end-products</i>
AGLs	Ácidos graxos livres
ALEs	Produtos da lipoxidação avançada, do inglês <i>advanced lipoxidation end-products</i>
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
C <sup>14</sup>	Carbono-14
CAT	Catalase
CBO	Carbonilação
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento de resposta à carboidratos, do inglês <i>carbohydrate response element-binding protein</i>
DAMPs	Padrões moleculares associados à danos, do inglês <i>damage-associated molecular pattern</i> )
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GO	Glioxial
GPx	Glutaciona redutase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IKK	IκB Quinase, do inglês <i>IKappa B Kinase</i>

IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
Keap1	Inibidor natural do Nrf2, do inglês <i>Kelch-like ECH associated Protein 1</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP1	Proteína 1 quimioatraente de monócitos
MDA	Malonaldeído
MGO	Metilglioxal
MPO	Mieloperoxidase
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator nuclear-E2 relacionado ao fator 2
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OMS	Organização mundial de saúde
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico
SMCR	Síndrome metabólica cardiorrenal
SNS	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina-angiotensina
TA	Tecido adiposo
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TLRs	Receptores tipo <i>Toll</i> , do inglês <i>toll-like receptors</i>
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
$\gamma$ Oz	Gama-orizanol



# *Sumário*

# Sumário

## Capítulo I – Revisão de Literatura

<b>1. Obesidade.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Órgãos-alvo: o coração.....</b>	<b>31</b>
2.1 Anatomia.....	31
2.2 Mofofisiologia.....	33
<b>3. Órgãos-alvo: os rins.....</b>	<b>35</b>
3.1 Anatomia.....	35
3.2 Morfofisiologia.....	38
<b>4 Síndrome Metabólica Cardiorrenal.....</b>	<b>39</b>
4.1 Fatores desencadeadores.....	40
4.1.1 Componentes da dieta.....	40
4.1.2 Disbiose intestinal.....	42
4.1.3 Disfunção do tecido adiposo.....	43
4.2 Pilares patogênicos: estresse oxidativo e inflamação .....	45
4.2.1 Estresse oxidativo.....	45
4.2.2 Inflamação.....	47
<b>5 Intervenção.....</b>	<b>50</b>
5.1 Compostos bioativos.....	51
<b>6 O gama-orizanol.....</b>	<b>52</b>
6.1 Fontes de $\gamma$ Oz.....	54
6.2 Farmacocinética.....	56
6.3 Efeitos biológicos do gama-orizanol e mecanismos de ação...57	
<b>7 Considerações finais.....</b>	<b>62</b>
<b>8 Justificativa.....</b>	<b>62</b>
<b>9 Objetivos.....</b>	<b>63</b>
9.1 Objetivo geral.....	63
9.2 Objetivos específicos.....	63

<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>64</b>
--	-----------

## **Capítulo II – Artigo Científico**

Effect of gamma-oryzanol on the proteome profile of the target organs of cardiorenal metabolic syndrome in obesity model.....	74
---	----

## **Capítulo III – Conclusão**

Conclusão.....	121
----------------	-----

<b>ANEXO.....</b>	<b>123</b>
-------------------	------------

*Capítulo I*  
*Revisão de Literatura*

## 1 Obesidade

A revolução industrial e a expansão da globalização influenciaram drasticamente em mudanças na dinâmica dos hábitos alimentares e de atividade física da população, evento que foi associado a uma maior prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) representando atualmente 71% de mortes em todo o mundo (1, 2).

Como consequência dessas mudanças, os hábitos alimentares antes rico em alimentos *in natura*, ou seja, alimentos sem alterações e aditivos, deu lugar ao consumo de alimentos processados e ultra processados. Sendo estes últimos compostos por grandes quantidades de carboidratos simples (açúcares), gorduras, sódio e submetidos a processos industriais que incluem modificações químicas, adição de ingredientes sintéticos (emulsificantes, flavorizantes e adoçantes artificiais), fatores que aumentam o tempo de prateleira e melhoram a aparência, palatabilidade, aroma e condições de empacotamento (3,4).

Esse padrão alimentar é conhecido como Dieta Ocidental, caracterizada pelo consumo elevado de alimentos de alta densidade energética compostos por açúcares, ácidos graxos *trans*, saturados e ômega-6 e consumo reduzido de ômega-3, antioxidantes, vitaminas, amino ácidos essencial e não essenciais (5). A ingestão dessa dieta acompanhada por redução do consumo frutas, vegetais e legumes impactam diretamente na saúde (6). Além disso, esse padrão alimentar pode estar associado à inatividade física e fatores genéticos resultando em uma potente interação obesogênica, ou seja, promotora de sobrepeso e obesidade (7). Assim, o consumo elevado de calorias em associação com menor gasto energético, leva a um balanço energético positivo que resulta na deposição e acúmulo de gordura corporal resultando em obesidade (8).

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo que representa um

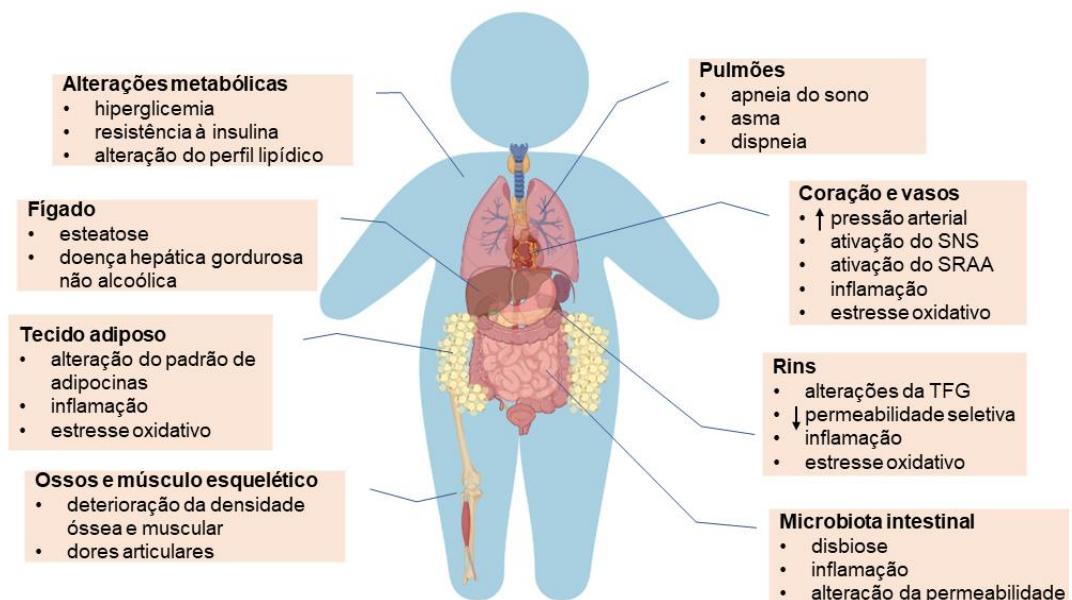
risco para a saúde, cuja incidência tem crescido a ponto de ser considerada uma epidemia (9). O número de indivíduos obesos atualmente é maior que o número de indivíduos desnutridos em todo o mundo, com exceção da Ásia e África subsariana, assim, o que foi um dia considerado um problema somente de países desenvolvidos, se tornou agora um problema em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (10). Esse cenário originou o fenômeno denominado “o fardo duplo da má-nutrição” (do inglês “the double burden of malnutrition”), termo que representa a coexistência de extremos, no qual observamos de um lado a desnutrição e de outro lado a obesidade (11).

De acordo com os números divulgados pela OMS, em 2016, 650 milhões de adultos eram obesos e mais de 1,9 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso. Nesse mesmo ano, o número de crianças e adolescentes entre 5 e 19 anos foi superior a 340 milhões somando obesidade e sobrepeso. Números mais recentes revelaram que 39 milhões de crianças abaixo de 5 anos já apresentavam obesidade ou sobrepeso em 2020 (9).

No Brasil, dados da Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2019 apontam que 96 milhões de indivíduos estão acima do peso no país. Especificamente 26,8% dos adultos brasileiros são obesos, porcentagem que há 17 anos atrás era 12,2%, ou seja, em menos de 20 anos os números dobraram. Na faixa etária de 40 a 59 anos, a porcentagem de indivíduos acima do peso é de assustadoramente 70,3% (12). Avaliando os números de obesidade e sobrepeso no mundo e no Brasil, compreende-se que esse é um problema de saúde pública que impacta diretamente na qualidade e expectativa de vida dos indivíduos, com a tendência de atingir maior magnitude no decorrer dos anos.

A obesidade predispõe o surgimento de complicações, comorbidades e outras DCNT (Figura 1). O aumento de gordura corporal está associado às alterações do perfil lipídico, hiperglicemia, resistência à

insulina, hipertensão, acidente vascular cerebral, alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, renais e hepáticas (13-15). Além da expansão da gordura total, o padrão de deposição também apresenta importância. A gordura excessiva na cavidade abdominal, próximo a órgãos vitais, é denominada gordura visceral, conhecida como obesidade central e está fortemente ligada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, resistência à insulina e hipertensão, ou seja, é um fator agravante que aumenta o risco para determinadas consequências da obesidade (16).



**Figura 1.** Alterações metabólicas e em diferentes órgãos decorrentes da obesidade. SNS: sistema nervoso simpático; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; TFG: taxa de filtração glomerular. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 10 de novembro de 2021).

Dentre as doenças derivadas da obesidade destacam-se as cardiovasculares, que são a maior causa de morte no mundo, e as doenças renais que afetam mais de 10% da população mundial (17,18). Ambas as condições, isoladamente, são indiscutivelmente problemas relevantes na saúde mundial (18,19). Não obstante, em meio ao agregado de alterações metabólicas e consequências nocivas para os órgãos que o

excesso de gordura corporal provoca, coração e rins podem ser afetados concomitantemente. Fundamentado nesse contexto, o termo Síndrome Metabólica Cardiorrenal (SMCR) emergiu na literatura para definir a coexistência de disfunção cardíaca e renal que compartilham mecanismos fisiopatológicos consequente à obesidade (20,21). Dessa forma, coração e rins perfazem os órgãos alvos de estudo nesse panorama.

## **2 Órgãos-alvo: o coração**

O coração é um órgão muscular, em forma de cone e oco, cujo funcionamento é comparado a duas bombas com capacidade contrátil e propulsora. A sua função de bombeamento do sangue, permite que nutrientes e oxigênio cheguem às células através dos vasos sanguíneos (artérias, arteríolas, vênulas, veias e capilares) (22).

### **2.1 Anatomia**

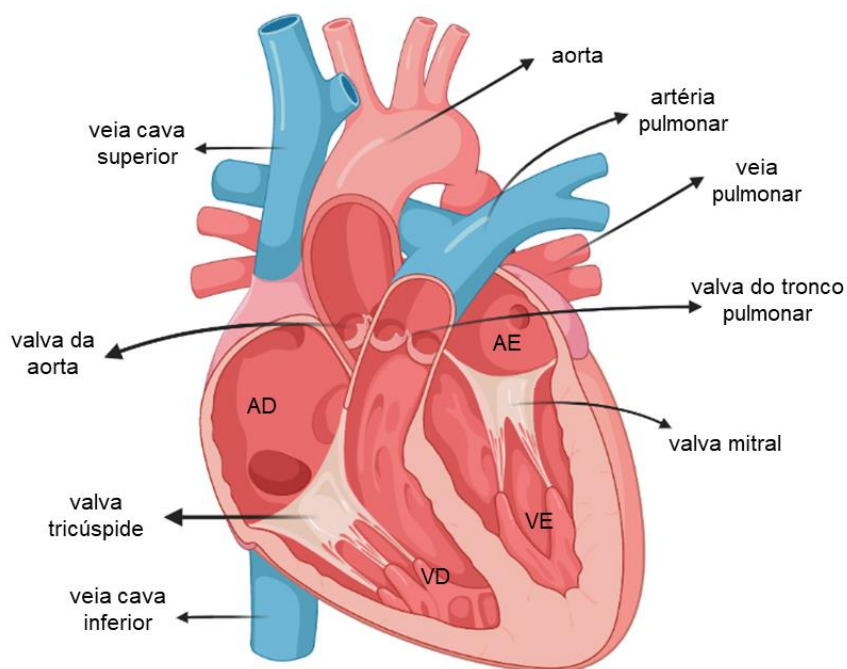
O coração apresenta um formato semelhante a um cone com uma base, um ápice e três faces (esternocostal, diafragmática e pulmonar). Sua base, a parte superior do órgão, tem delimitação não bem definida correspondendo a região de inserção dos grandes vasos, ou seja, vasos por onde o sangue entra e sai do coração. Localiza-se na cavidade torácica, no espaço entre os sacos pleurais denominado mediastino, atrás do esterno e acima do diafragma (23).

Internamente, a cavidade cardíaca apresenta septos subdividindo-o em quatro câmaras: átrios direito (AD) e esquerdo (AE) e ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE). O septo atrioventricular divide o coração nas porções superiores (AD e AE) e inferiores (VD e VE). Sagitalmente, o septo inter-atrial separa AD e AE e, por fim, o septo inter-ventricular separa VD e VE. O septo atrioventricular, possui orifícios que permite a



passagem do sangue dos átrios para os ventrículos. Esses orifícios contam com estruturas direcionadoras de fluxo, as valvas atrioventriculares (valva tricúspide e mitral). Essas valvas possuem filamentos de tecido conjuntivo denominados cordas tendíneas, que estão presas aos músculos papilares, pequenas projeções cônicas do miocárdio (23).

A veia cava inferior e superior desembocam no AD, e no AE desembocam as veias pulmonares, sendo duas de cada pulmão. A partir do VD sai o tronco pulmonar que se bifurca em artéria pulmonar direita e esquerda, relativas a cada pulmão, já do VE sai a artéria aorta. Ao nível dos orifícios que permitem a saída do sangue dos ventrículos para os vasos, existem a valva do tronco pulmonar e a valva da aorta (Figura 2) (23).



**Figura 2.** Vista sagital do coração e grandes vasos. AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito e VE: ventrículo esquerdo. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 10 de novembro de 2021).

O coração está envolvido por um saco fibro-seroso que o separa dos outros órgãos do mediastino, formado por uma camada externa (pericárdio fibroso e uma camada interna (pericárdio seroso). O pericárdio seroso se subdivide nas faces parietal e visceral, sendo essa última aderida ao coração e conhecida como epicárdio (24). Seguindo, de fora para dentro, encontra-se o miocárdio, a camada muscular e mais espessa do órgão, que realiza os processos de relaxamento (diástole) e contração (sístole). O endocárdio é a camada mais interna consistindo de células endoteliais e reveste as cavidades cardíacas se conectando com as estruturas internas das cavidades (23).

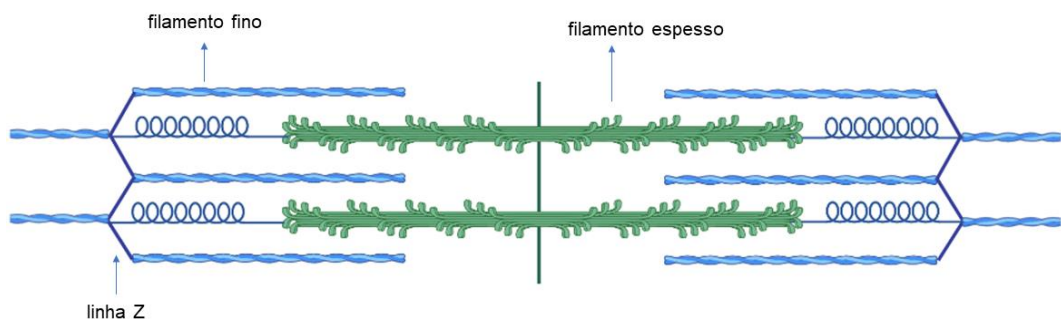
## 2.2 Morfofisiologia

O coração esquerdo e direito trabalham em série para que o sangue seja bombeado sequencialmente, do coração esquerdo para a circulação sistêmica e do coração direito para a circulação pulmonar. O sangue oxigenado vindo dos pulmões chega ao AE pela veia pulmonar que flui para o VE passando pela valva mitral. O VE se contrai aumentando a pressão na cavidade, o que força a abertura da valva aórtica e o sangue é ejetado para a aorta e flui pelo sistema arterial. O fluxo sanguíneo venoso (rico em dióxido de carbono) retorna e entra no AD pela veia cava. A pressão da veia cava é maior que do AD, fazendo com este seja preenchido pelo sangue venoso que flui para o VD passando pela valva tricúspide. Quando o VD se contrai o sangue é ejetado passando pela valva pulmonar para a artéria pulmonar que o leva para os pulmões (22).

Para que o ciclo cardíaco ocorra, além das células miocárdicas com capacidade de contração, o coração possui células que geram os impulsos elétricos e os conduzem. O sistema condutor é formado pelo

nodo sinoatrial, nodo atrioventricular, feixe de His e fibras de Purkinje. A regulação do ritmo do coração ocorre no nodo sinoatrial, localizado no AD, o impulso gerado é propagado para os átrios pelas fibras de Purkinje, provocando a sístole atrial. Ao atingir o nodo atrioventricular no septo interatrial, o impulso é retardado o suficiente para os átrios forçarem a passagem de sangue para os ventrículos. Então, o impulso atinge os ventrículos conduzido pelo feixe de His e provocando a sístole ventricular (25).

As células contráteis do coração são formadas por sarcômeros, compostos por filamentos espessos (miosina) e finos (actina, tropomiosina e troponina). A miosina apresenta cabeças globulares com locais de ligação à actina e capacidade de hidrolisar adenosina trifosfato (ATP). Os filamentos finos são cadeias de actina contendo troponina e tropomiosina fixados aos limites dos sarcômeros (linha Z) (Figura 3) (22).



**Figura 3.** Representação esquemática do sarcômero. Filamentos expressos, compostos por miosina, e filamentos finos compostos por actina, tropomiosina e troponina, fixados à linha Z. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 10 de novembro de 2021).

Nas linhas Z, existem invaginações (túbulos T) das células, contínuos com as membranas celulares e funcionam levando o potencial de ação para dentro das células. Os túbulos T estão conectados ao

retículo sarcoplasmático, local de armazenamento e liberação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), essencial para o processo de contração. A contração ocorre com a formação de pontes cruzadas entre actina e miosina, que se rompem, fazendo com que os filamentos espessos e finos deslizem um sobre os outros e a tensão é gerada. A intensidade de tensão desenvolvida é proporcional à concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. O relaxamento ocorre quando o  $\text{Ca}^{2+}$  é reacumulado no retículo sarcoplasmático (25).

Frente à sobrecarga ou aumento da atividade cardíaca desencadeados por fatores mecânicos e/ou neuro-humorais, ocorre um mecanismo adaptativo: a hipertrofia cardíaca (aumento de massa do miocárdio). Em condições patológicas, a hipertrofia cardíaca resulta no surgimento de fibrose no tecido e desenvolvimento da disfunção cardíaca, que por sua vez pode evoluir para morte dos cardiomiócitos e insuficiência cardíaca (26).

### **3 Órgãos-alvo: os rins**

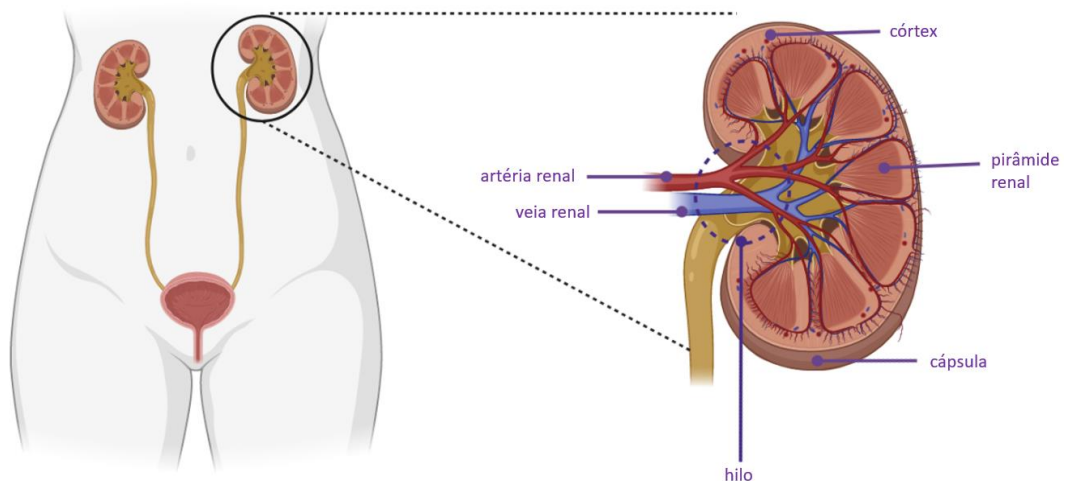
As atividades realizadas pelo corpo humano culminam na formação de produtos oriundos do metabolismo que precisam ser eliminados para o meio exterior. Juntamente com os ureteres, bexiga e uretra, os rins compõem o sistema urinário e são responsáveis pela filtração glomerular, reabsorção, secreção e excreção tubulares, processos que resultam na excreção desses produtos através da urina. Além da função excretora, os rins executam função reguladora (balanço eletrolítico, equilíbrio ácido-base, gliconeogênese) e endócrina (produção de calcitriol, renina e eritropoetina) (22, 23).

#### **3.1 Anatomia**

Os rins são órgãos pares com formato semelhante a um grande

feijão e estão localizados retroperitonealmente, na parede posterior ao abdome e laterais à coluna vertebral. O rim direito se apresenta um pouco mais baixo que o esquerdo, devido a presença do fígado logo acima. As extremidades superior e inferior são denominadas polos, situando-se sobre o polo superior a glândula suprarrenal (23).

Os órgãos são envolvidos por uma capsula fibrosa que geralmente é abundante em tecido adiposo formando também uma capsula adiposa. Seu corpo pode ser dividido em duas regiões: córtex e medula. No córtex, região mais estreita e externa, onde estão localizados numerosos glomérulos, estruturas responsáveis pela filtração glomerular. Na medula se observa as pirâmides renais, estruturas cônicas e estriadas que são agrupamentos de ductos coletores de urina. Cada pirâmide renal compõe um lobo renal, juntamente com o tecido cortical que recobre sua base (região mais larga) e seus lados (colunas renais). Na margem medial do rim é encontrado o hilo renal, região por onde passam o ureter, artéria e veia renais, linfáticos e nervos (Figura 4) (22).

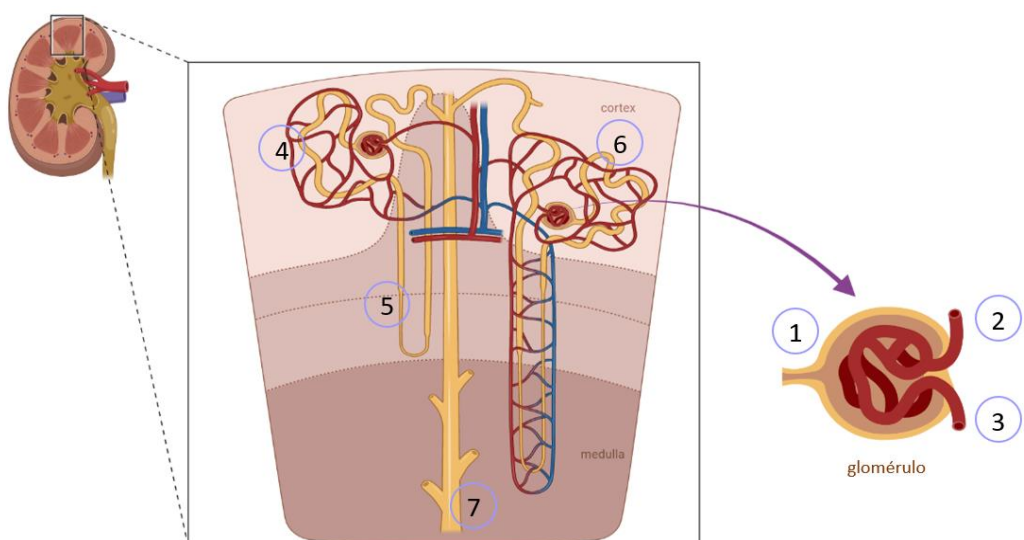


**Figura 4.** Vista sagital do rim e sua anatomia. A zona medular compreende a região onde estão localizadas as pirâmides renais. Cada lobo renal é composto por uma pirâmide renal e pelo tecido cortical ao seu redor. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/>

(acesso em 17 de novembro de 2021).

A partir do hilo, a artéria renal entra no rim e em sequência se abre em uma série de ramificações até originar as arteríolas aferentes que penetram nos glomérulos direcionando o sangue para a realização da filtração glomerular, processo que resulta na produção do filtrado. O sangue não filtrado é conduzido pelas arteríolas eferentes fora do glomérulo até os capilares peritubulares com destino final na veia cava. O filtrado, por sua vez, segue pela porção tubular até atingir o sistema coletor (23).

O glomérulo é a primeira porção da unidade morfofuncional dos rins, o néfron, responsável em sua totalidade pela filtração glomerular, reabsorção, secreção e excreção tubular. Avançando após o glomérulo, é formado pelos seguintes segmentos: túbulo contorcido proximal, túbulo reto proximal, alça de Henle (com o segmento descendente fino, o segmento ascendente fino e o segmento ascendente espesso), túbulo contorcido distal e ductos coletores (Figura 5). Cada segmento é diferente em seu revestimento de células epiteliais, pois são funcionalmente distintos (22).



**Figura 5.** Representação do néfron no lobo renal. A unidade

morfofuncional dos rins é formada pelo glomérulo envolvido pela cápsula de Bowman (1), o qual a arteríola aferente penetra para que o sangue seja filtrado e a arteríola eferente (2), direciona o fluxo de saída; pelo túbulo contorcido proximal (4), alça de Henle (5), túbulo contorcido distal (6) e ducto coletor (7). Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 17 de novembro de 2021).

### 3.2 Mofofisiologia

A filtração glomerular é a primeira etapa da formação da urina. Entre o glomérulo e a cápsula de Bowman há o espaço de Bowman, onde o filtrado se acumula. Partindo do lúmen dos capilares e indo em direção ao espaço de Bowman, existem três camadas que constituem barreiras de filtração: o endotélio dos capilares glomerulares, a membrana basal capilar e uma camada epitelial. A camada epitelial é formada pelos podócitos, células epiteliais atípicas que apresentam um corpo celular largo com grandes extensões e processos pediculados (pedicelos) (25). A camada endotelial apresenta poros que permite a passagem de líquido, solutos e proteínas, mas não de células sanguíneas. A membrana basal, por sua vez, não permite a filtração de proteínas sendo a barreira mais significativa. A camada formada pelos podócitos possui pequenas fendas de filtração, pelas quais passam líquidos e pequenos solutos (27).

Após a filtração, seguem-se os processos de reabsorção e secreção tubular. Água e solutos são reabsorvidos (glicose, sódio, aminoácidos, entre outros), principalmente nos túbulos proximais, para os capilares e retornam à circulação. Substâncias não filtradas, mas que precisam ser eliminadas, são secretadas para o filtrado (medicamentos, íons de hidrogênio, amônia). A excreção da urina é a somatória dos três processos (22). Esses processos possuem fatores que os regulam, modulando-os dependendo da necessidade corporal, como por exemplo mudanças fisiológicas da TFG. Em condições patológicas, a TFG pode ser

alterada, tal qual a excreção de substâncias na urina que não deveriam ser eliminadas, como por exemplo proteínas e glicose (22).

#### **4. Síndrome Metabólica Cardiorenal**

Os sistemas cardiovascular e renal compartilham uma estreita ligação fisiológica, na qual perturbações em um dos sistemas pode refletir no outro. A obesidade induzida pela dieta ocidental se estabelece como plano de fundo para o desenvolvimento da SMCR, que representa uma perturbação em ambos os sistemas com mecanismos fisiopatológicos comuns que acarretam na coexistência de disfunção cardíaca e renal (20).

Na obesidade ocorre maior atividade do sistema nervoso simpático (SNS) mediada pelos hormônios insulina e leptina que se encontram elevados. O SNS estimula a secreção de renina pelas células justaglomerulares dos rins, ativando o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que exerce manutenção da pressão arterial, balanço hídrico e de sódio (28). O tecido adiposo disfuncional contribui na secreção de angiotensinogênio, além do fígado. O angiotensinogênio é um peptídeo precursor da angiotensina, que por sua vez, tem ação vasoconstritora. O SRAA também promove reabsorção de sódio e consequente expansão de volume. Esses eventos estabelecem um mecanismo central de aumento de pressão arterial (29).

A hipertensão é um dos fatores de risco para disfunção cardíaca e renal. No coração, a hipertensão impõe uma sobrecarga mecânica exigindo maior esforço do miocárdio na contração, promovendo a hipertrofia ventricular esquerda. O aumento da pós-carga (tensão que o VE deve exercer durante a sístole) combinado à fatores neuro-humorais, dentre outros, culminam à longo prazo na disfunção cardíaca (30). Nos rins, ocorre aumento da pressão glomerular levando à hiperfiltração que cursa com aumento da TFG (31). A tensão nos capilares glomerulares



gera inflamação e danos aos podócitos podendo progredir para proteinúria, diminuição da função renal e redução da TFG. A progressão da hiperfiltração para redução da TFG está associada às alterações metabólicas, como resistência à insulina (29).

Embora a hipertensão desempenhe um papel importante, o desenvolvimento da SMCR é marcado por alterações metabólicas e fatores desencadeadores que contribuem para a instalação dos pilares patogênicos, inflamação e estresse oxidativo (32).

#### 4.1 Fatores desencadeadores

Fatores como os componentes da dieta, disbiose e disfunção do tecido adiposo figuram como desencadeadores dos pilares patogênicos da SMCR. A contribuição da dieta se desdobra para além da deposição de gordura devido ao excesso de nutrientes, uma vez que tanto os açúcares, em especial a frutose, quanto os ácidos graxos podem diretamente acarretar em efeitos deletérios (6). Interligada a disbiose e a disfunção do tecido adiposo, são disparadores iniciais do estresse oxidativo e da inflamação e sua ampliação para níveis sistêmicos.

##### 4.1.1 Componentes da dieta

O elevado consumo da Dieta Ocidental, rica em açúcares e gorduras, desencadeia diretamente alterações metabólicas como a hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina. Os alimentos industrializados contêm adição de açúcares, sendo a frutose o componente mais adicionado, pois torna esses produtos mais palatáveis (33). Embora a frutose seja não hiperglicemiante e sua absorção seja independente da insulina, sua contribuição para a SMCR é evidente.

O metabolismo da frutose (frutólise) não passa pelos mesmos pontos regulatórios que a glicólise, dessa forma, seu consumo rapidamente gera substrato para a via lipogênica resultando em armazenamento de triglicerídeos. Em adição, leva a ativação da proteína de ligação ao elemento de resposta à carboidratos (ChREBP, do inglês *carbohydrate response element-binding protein*) independentemente da sinalização da insulina. O ChREBP é um fator de transcrição de genes envolvidos na síntese de triglicerídeos. Dessa forma, o alto consumo desse tipo de açúcar, contribui para alterações metabólicas e deposição de gordura (34). Em adição, a frutose também é responsável pela elevação dos níveis de ácido úrico, produto final do metabolismo das purinas. A hiperuricemia é um achado frequente em indivíduos obesos e um fator de risco para SMCR, está associada à hipertensão e consequências cardíacas e renais, assim como é um mediador da resistência à insulina (21).

Além das consequências mencionadas a respeito do consumo elevado de açúcares, a quantidade de gordura e a sua qualidade (tipos de ácidos graxos) também contribuem para a fisiopatologia da SMCR. Na Dieta Ocidental é observado a presença de ácidos graxos *trans* cuja formação é resultante do processo de hidrogenação de óleos vegetais e marinhos, maior consumo de ácidos graxos ômega-6 acompanhado de redução de ácidos graxos ômega-3 e, ainda, maior consumo de ácidos graxos saturados (3,35).

Os ômega 6 e 3 apresentam efeitos fisiológicos para o organismo, no entanto, um desequilíbrio na razão ômega-6/ômega-3 devido ao consumo elevado do primeiro, resulta em aumento da formação de eicosanóides, mediadores inflamatórios de origem lipídica sintetizados a partir do ácido araquidônico, dentre os quais estão as prostaglandinas E2 e leucotrienos. Esse desequilíbrio é apontado como um fator pró-

inflamatório relacionado a diversas condições crônicas incluindo a obesidade e consequências cardiovasculares (35).

Por sua vez, os ácidos graxos saturados provenientes de alimentos de origem animal como carnes e laticínios podem ser reconhecidos por receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *toll-like receptors*), amplamente distribuídos em diferentes órgãos e tecidos, que ativam uma resposta pró-inflamatória via fator nuclear kappa B (NF-κB) (36).

#### 4.1.2 Disbiose intestinal

A microbiota intestinal é definida como uma comunidade complexa de micro-organismos que habita o trato intestinal mantendo uma relação simbiótica com o hospedeiro, exercendo uma diversidade de funções significantes que contribuem para a manutenção da fisiologia normal do intestino e para a saúde do indivíduo (37). Essas funções incluem a proteção contra patógenos, melhora do sistema imune, auxílio na digestão e metabolismo, controle da proliferação e diferenciação epitelial e influência sobre a secreção de insulina (38).

Existe uma variabilidade interindividual que caracteriza a microbiota intestinal determinada por fatores genéticos e ambientais. Apesar dessa variação há alguns enterotipos comuns e predominantes na população humana, como *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (38). Dentre os fatores ambientais que determinam a composição da microbiota, a dieta tem um profundo impacto. Uma determinada dieta pode promover o crescimento de algumas cepas em detrimento de outras, em específico a ingestão da dieta ocidental está associada a alterações na proporção entre *Bacteroidetes/Firmicutes*, o que favorece maior crescimento de bactérias gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* levando a um desequilíbrio conhecido como disbiose (39).

A disbiose acarreta em perturbação da integridade da barreira

intestinal e alterações na digestão, metabolismo e respostas imunológicas. Devido ao aumento da permeabilidade intestinal, bactérias gram-negativas podem se infiltrar no epitélio intestinal possibilitando a translocação bacteriana que resulta em aumento de lipopolissacarídeo (LPS) circulantes (39,40). O LPS também é um ligante dos TLRs e promove uma resposta inflamatória via NF- $\kappa$ B, assim como o mecanismo ativado pelos ácidos graxos dietéticos, contribuindo para um estado pró-inflamatório sistêmico (37,39).

#### 4.1.3 Disfunção do tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) foi, por muito tempo, tradicionalmente visto como um órgão passivo de estocagem de energia, isolante térmico e proteção mecânica a traumas, porém, atualmente é considerado um órgão de função dinâmica devido a sua atividade metabólica e endócrina que contribui para a homeostase energética do organismo e está envolvida em processos fisiológicos e patológicos (41). É composto por adipócitos e suas células precursoras, os pré-adipócitos, fibroblastos, macrófagos residentes, células do estroma vascular e tecido nervoso. Os adipócitos são as células predominantes e responsáveis por estocar gordura na forma de triacilglicerol em seu citoplasma (42).

A função de estocagem do TA não é ilimitada. Em situação de balanço energético positivo, em que a energia ingerida é superior à energia gasta, o aporte excessivo e contínuo de nutrientes promove o aumento de tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e do número (hiperplasia) até o tecido atingir a inflexibilidade para se expandir (43). A expansão do TA está associada à hipóxia, morte celular, inflamação e comprometimento do fluxo de ácidos graxos que desencadeiam diversas alterações metabólicas e hormonais (44).

Essas alterações caracterizam o TA disfuncional que implica em

um padrão alterado do conjunto de substâncias secretadas pelo tecido, denominadas adipocinas (45,46). A alteração do perfil de adipocinas incluem maior secreção de leptina, resistina, inibidor ativador de plasminogênio 1, angiotensinogênio, citocinas pró-inflamatórias e menor secreção de adiponectina e citocinas anti-inflamatórias (47).

A leptina é uma adipocina anorexígena que atua SNC suprimindo o apetite e estimulando o gasto energético e sua secreção é proporcional ao aumento da adiposidade (48). Entretanto, na obesidade, os níveis elevados de leptina estão associados à uma resistência central da sua ação (49). A adiponectina, por sua vez, destaca-se por estar significativamente reduzida em indivíduos obesos, ocorrendo uma correlação negativa entre seus níveis circulantes e o grau de adiposidade. É conhecida pelo seu efeito protetor anti-inflamatório e sensibilizadora da insulina (41).

Embora ocorra resistência à leptina no SNC, no tecido adiposo seus níveis elevados atuam induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos residentes, como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas, como a proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) (50).

Os macrófagos residentes, juntamente com os infiltrados, podem expressar fenótipos diferentes de acordo com o estímulo que recebem. Macrófagos M1 apresentam um padrão secretor de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que os macrófagos M2 secretam citocinas anti-inflamatórias. Além do aumento do número dos macrófagos no TA, na obesidade o perfil M1 é predominante, que são os grandes responsáveis por ampliar e manter uma inflamação crônica de baixo grau tecidual e níveis além da normalidade de IL-6 e TNF- $\alpha$  (51).

Outro fator que contribui para o a disfunção do TA é o estresse oxidativo, desencadeado por diferentes mecanismos como, por exemplo, a hipóxia devido à má oxigenação acarretando em áreas de necrose

tecidual nas quais os macrófagos atuam na fagocitose dos restos celulares, processo que libera espécies reativas, que também atuam como sinalizadores intracelulares e ativam vias inflamatórias (52).

A citocina TNF- $\alpha$  apresenta um papel importante na disfunção do TA e consequências não locais. Secretada em grandes quantidades pelos macrófagos interfere no metabolismo lipídico estimulando a lipólise e aumentando o fluxo de ácidos graxos livres (AGLs) na circulação, reduz a secreção de adiponectina e promove resistência à insulina diretamente impedindo a fosforilação dos seus receptores (53). Os AGLs circulantes podem ser reconhecidos por receptores TLR-4 em outros órgãos, ampliando a inflamação de local para sistêmica. Adicionalmente, os AGLs podem ser depositados em outros órgãos, evento extremamente danoso às células cuja função não é a estocagem de gordura (54).

Dessa forma, o processo inflamatório iniciado pelo TA disfuncional na obesidade gera alterações metabólicas e hormonais que impactam sistemicamente o organismo e favorecem o desenvolvimento de complicações em outros órgãos (55).

## 4.2 Pilares patogênicos: estresse oxidativo e inflamação

O estresse oxidativo e a inflamação são processos intimamente relacionados e são observados na iniciação e progressão de múltiplas doenças (56). Na SMCR, ambos os processos podem se iniciar pelas diferentes condições que o cenário obesogênico apresenta, sinalizando e amplificando respostas celulares que resultam em efeitos nocivos comprometendo órgãos como coração e rins.

### 4.2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é tradicionalmente definido como um

fenômeno resultante do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a defesa antioxidante (57). Em condições fisiológicas, as espécies reativas são produzidas pelas células e atuam como mensageiros intracelulares. Além disso, são essenciais na resposta inflamatória frente a uma infecção, com a finalidade de causar dano e eliminação dos patógenos (58). No entanto, essas espécies também são base para processos patológicos devido a característica reativa que apresentam, podendo reagir com as macromoléculas biológicas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) através de reação de oxirredução, danificando-as estrutural e funcionalmente (59).

Para tanto, nosso organismo conta com um sistema de defesa antioxidante, composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, sendo estes últimos subdivididos de acordo com fonte de origem: endógenos, produzidos pelo próprio organismo ou exógenos, provenientes da dieta. A defesa antioxidante é responsável por inativar as espécies reativas e impedir que causem dano as macromoléculas e, conseqüentemente, ao funcionamento celular (60).

Na SMCR, coração e rins lidam com o aporte excessivo de nutrientes. A maior disponibilidade de acetil-coA decorrente da oxidação de carboidratos e lipídios disponíveis para participar do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa levando à uma excessiva estimulação da mitocôndria (61). Durante esse processo, elétrons escapam da cadeia transportadora de elétrons reagindo com o oxigênio formando o superóxido ( $O_2^-$ ) que é impermeável à membrana mitocondrial. Através da enzima superóxido dismutase (SOD), o  $O_2^-$  é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). As enzimas catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) são responsáveis pela redução do  $H_2O_2$  em água. Em excesso, o  $H_2O_2$  pode deixar a mitocôndria e ser reduzido pelas reações de Fenton ou Haber-Weiss formando o radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ) (62). Esta molécula é altamente reativa que causa danos oxidativos importantes. A estimulação

excessiva da mitocôndria pela abundância de substrato leva à superprodução das espécies reativas e depleção da defesa antioxidante, resultando no estresse oxidativo (63).

O estresse oxidativo induz danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial e à cardiolipina, fosfolípido encontrado na membrana mitocondrial interna e com alta suscetibilidade à danos oxidativos, provocando a disfunção da organela. Além do mais, anormalidades mitocondriais conduzem à lipotoxicidade (64). A deposição de gordura em células não adiposas, juntamente com a disfunção mitocondrial levam ao acúmulo de ácidos graxos não metabolizados no citosol como diacilglicerol e as ceramidas. Estes produtos podem prejudicar a sinalização da insulina, mediam a inflamação e alimentam o estresse oxidativo (65).

A reação entre as espécies reativas e as macromoléculas forma produtos secundários que também apresentam reatividade. A oxidação de lipídios gera como produtos a acroleína (ACR), o 4-hidroxinonenal (4-HNE), malondialdeído (MDA) e glioxal (GO), já a oxidação de carboidratos forma o metilglioxal (MGO) e GO. Esses subprodutos são denominados produtos da lipoxidação avançada (ALEs, do inglês *advanced lipoxidation end-products*) e produtos da glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end-products*) que, por sua vez, podem danificar proteínas pela reação de carbonilação (CBO) (66).

Trabalhos relatam que esses produtos estão aumentados no coração e nos rins na obesidade, sendo indicadores de estresse oxidativo e estão associados ao dano de vias fisiológicas celulares, comprometendo a função cardíaca e renal (67,68).

#### 4.2.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta, do sistema imunológico, essencial a



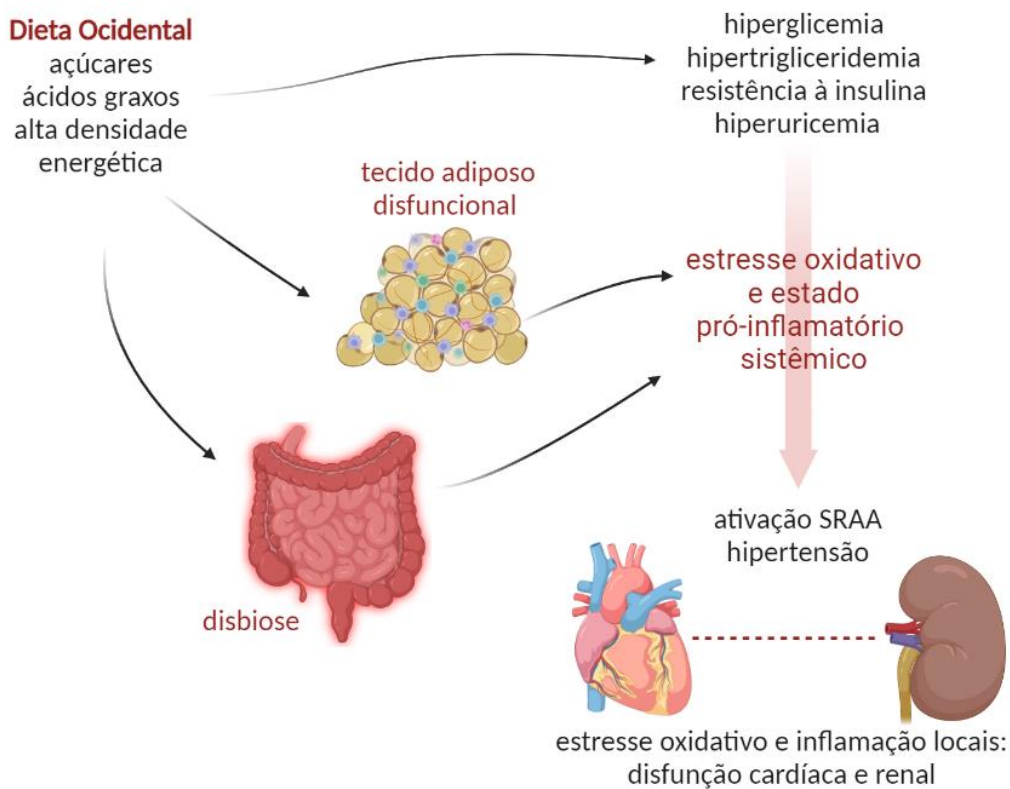
agentes infecciosos ou a injúria tecidual que está presente em processos fisiológicos e patológicos. Essa resposta demanda a participação de tipos celulares como granulócitos (basófilos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos), macrófagos, linfócitos e células dendríticas dependendo do agente nocivo envolvido (69). A inflamação ocorre ao custo de um declínio temporário da função tecidual, que com a resolução do processo retorna à homeostase. Entretanto, com a persistência do estímulo agressor, a inflamação atinge a cronicidade contribuindo para a patogênese de doenças crônicas (70).

As células inflamatórias secretam as citocinas que atuam como mensageiros intracelulares recrutando células e amplificando a sinalização. Ao se ligarem aos seus receptores, as citocinas ativam a produção de espécies reativas através da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH oxidases) e mieloperoxidase (MPO), que tem o objetivo destruir micro-organismos e debris celulares pelas células fagocíticas, porém quando produzidas em excesso contribuem para o estresse oxidativo (71). As espécies reativas geradas pelas NADPH oxidases e MPO, são sinalizadoras para a ativação do complexo I $\kappa$ B Quinase (IKK) resultando em uma cascata de ativações até o NF- $\kappa$ B que culmina na transcrição de genes pró-inflamatórios que incluem as citocinas IL-6, TNF- $\alpha$  e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) (72).

A ativação desse mecanismo pode ocorrer mesmo na ausência de micro-organismos resultando em uma resposta inflamatória “estétil”. Os fagócitos também são ativados em resposta aos padrões moleculares associados à danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern*), que incluem os AGEs e ALEs. Essas moléculas decorrentes do dano por espécies reativas se ligam ao receptor para produtos da glicação avançada (RAGE), culminando na ativação do NF- $\kappa$ B (73). Os RAGEs e seus ligantes são encontrados super-regulados em um grande espectro de condições inflamatórias crônicas (74). Conforme citado em tópicos

anteriores, a ativação da via do NF- $\kappa$ B também ocorrem pelos TLRs, que apresentam uma variedade de ligantes como o LPS, os ácidos graxos provenientes da dieta e AGLs liberados pela lipólise.

Esses mecanismos contribuem para o estado pró-inflamatório presente na obesidade que podem comprometer o coração e os rins bem como outros órgãos (36). Por fim, observa-se que a inflamação e estresse oxidativo são processos que se retroalimentam e responsáveis pelas consequências da obesidade, compreendendo assim os pilares patogênicos da SMCR no coração e rins.



**Figura 6.** Representação da fisiopatologia da Síndrome Metabólica Cardiorrenal. SRAA: sistema renina-angiotensina-aldotesrona. Os componentes da dieta, a disbiose e o tecido adiposo disfuncional estabelecem os pilares patogênicos: estresse oxidativo e um estado pró-inflamatório sistêmico. Esses fatores combinados às alterações

metabólicas, atingem os órgãos-alvo da síndrome. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 14 de abril de 2022).

## **5 Intervenção**

A obesidade é passível de reversão e suas consequências podem ser revertidas quando detectadas precocemente ou então, tratadas através de medicamentos mais tardiamente (75). O ponto crucial nessa condição, preconizado pela OMS, é a prevenção através da alimentação saudável acompanhada por exercício físico regular (9). Segundo as recomendações da própria OMS, uma dieta saudável deve conter frutas, vegetais, legumes, castanhas e grãos, com uma ingestão de açúcares compreendendo menos de 10% do total energético consumido e de gorduras, menos de 30% (76). A Dieta do Mediterrâneo se enquadra nessas características apresentando ademais um baixo consumo de carne vermelha, consumo moderado de vinhos e como fonte principal de gordura, azeite de oliva e peixes (77). Assim, é considerada como um padrão ideal refletindo em efeito benéficos para a saúde (78). O consumo de uma dieta rica em frutas, vegetais, legumes e grãos fornece uma menor densidade energética, maior consumo de fibras e de compostos de efeitos positivos (e.g. antioxidantes) associando-se a redução das taxas de DCNTs e de mortalidade, incluindo a redução de fatores de risco para doenças metabólicas cardiorrenais (77, 79).

Todavia, quando a premissa alimentar e de exercício físico regular não é praticada, a busca por alternativas se faz necessária, como por exemplo o consumo de alimentos específicos ou compostos de ação benéfica, sendo de mais fácil incorporação à dieta em comparação com a mudança do hábito alimentar como um todo. Essa busca visa encontrar alternativas não medicamentosas para prevenir e reduzir o risco de

doenças e suas consequências, como a SMCR. Nesse contexto, compostos naturais oriundos de plantas denominados compostos bioativos têm sido bastante explorados (80).

## 5.1 Compostos bioativos

Os compostos bioativos são compostos encontrados na natureza que possuem a capacidade de interagir com um ou mais componentes de tecidos vivos disparando uma resposta ou resultando em uma diversidade de efeitos (80). De uma forma mais simples, o termo “bioativo” é uma alternativa reduzida de “biologicamente ativo”, portanto, um composto que possui atividade biológica. Os efeitos no organismo podem ser positivos ou negativos dependendo da dose e biodisponibilidade. Podem ser consumidos diretamente através dos alimentos ou extraídos e utilizados como suplementos encapsulados ou adicionados à dieta (81). Os compostos bioativos existem em uma ampla variedade e classificações, dentre eles encontram-se os grupos dos polifenóis, carotenóides e os fitoesteróis (82) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Exemplos de compostos bioativos e suas fontes alimentares.

<b>Grupo</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Fontes</b>
Polifenóis flavanóides	Antocianinas (cianidina)	Frutas vermelhas, vinho tinto, berinjela, repolho e cebola roxos, chá verde (83)
Polifenóis não-flavanóides	Estibenos (resveratrol)	Uvas, mirtilo, amora, vinho tinto <i>cranberry</i> , cacau (83)
Carotenóides	Licopeno, $\beta$ -caroteno, luteína, $\beta$ -criptoxantina	Cenoura, tomate, mamão, espinafre, tangerina, goiaba (84)
Fitoesteróis	Sitostanol, campesterol, $\beta$ -sitosterol	Abacate, nozes, grãos, semente de girassol e gergelim, azeite de oliva (85)

O conteúdo da Tabela 1 apresenta exemplos de compostos bioativos, suas classificações e fontes alimentares. Estudos demonstram que estes compostos possuem papel importante na prevenção e atenuação de DCNT (82). Os polifenóis, por exemplo, são extensivamente abordados na literatura e dentre os efeitos benéficos decorrentes do seu consumo, foi reportado redução do risco cardiovascular (37%), risco de diabetes (31%) e risco de infarto (29%) (82,86,87).

Os fitoesteróis são compostos lipossolúveis componentes da maioria das células vegetais, onde participam da estrutura e estabilidade das membranas. Pertencem à família dos triterpenos e são caracterizados por uma estrutura tetracíclica com uma cadeia lateral muito similar ao colesterol, o mais abundantemente esteroide das células animais. A ingestão dos fitoesteróis variam muito de acordo com o padrão alimentar, sendo assim, nos países europeus onde há predomínio da Dieta do Mediterrâneo, a ingestão diária é de aproximadamente 250-400mg/dia, muito próximo à ingestão do colesterol (88,89). Além disso, os fitoesteróis apresentam um amplo espectro de efeitos terapêuticos em animais que transitam da redução dos níveis de lipídios plasmáticos até propriedades antitumorais, sem relatos de efeitos colaterais exceto em desordens lipídicas genéticas (89).

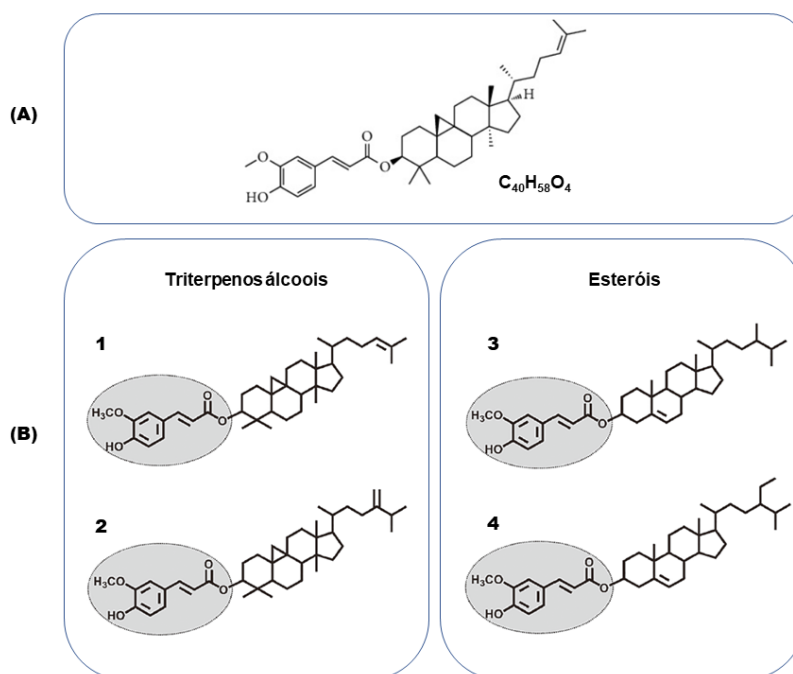
Portanto, investigar esse potencial na prevenção da SMCR é significativo. O fitoesterol, gama-orizanol ( $\gamma$ Oz) tem se destacado na literatura como um composto bioativo com efeitos benéficos que são compatíveis com a patogênese da SMCR.

## **6 Gama-orizanol**

O  $\gamma$ Oz é um composto bioativo proveniente do arroz, isolado pela

primeira vez por Kaneko e Tsuchiya em 1954 a partir do óleo extraído do grão (90). O composto isolado é um pó branco ou levemente amarelado, sem odor, lipossolúvel com ponto de fusão entre 137,5 e 138,5 °C, o que representa uma alta estabilidade térmica (91).

O  $\gamma$ Oz é uma mistura de ésteres de ácido ferúlico e fitoesteróis (esteróis e triterpenos álcoois), apresentando uma variedade de ferulatos, sendo os quatro predominantes (1) cicloartenol ferulato; (2) 24-metileno cicloartenol ferulato; (3) campesterol ferulato; e (4)  $\beta$ -sitosterol ferulato (Figura 7) (92).



**Figura 7.** Estrutura do  $\gamma$ Oz. **(A)** Fórmula estrutural e molecular do  $\gamma$ Oz e **(B)** Fórmula estrutural dos quatro ferulatos predominantes no  $\gamma$ Oz. (1) cicloartenol ferulato; (2) 24-metileno cicloartenol ferulato; (3) campesterol ferulato; e (4)  $\beta$ -sitosterol ferulato. Os círculos em cinza destacam o ácido ferúlico.

Desde seu isolamento há quase 70 anos, trabalhos reportaram diversas atividades benéficas do  $\gamma$ Oz: atividade hipocolesterolêmica,

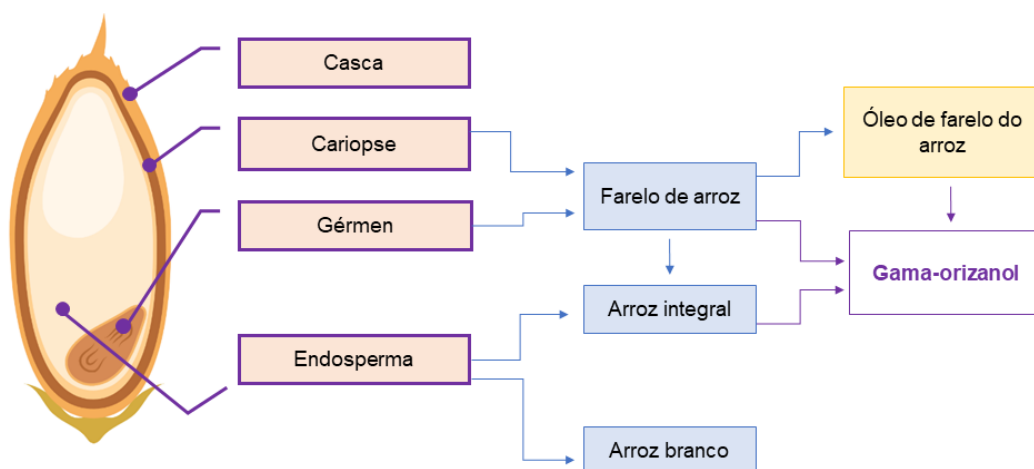
hipolipemiante, antiobesogênica, antidiabetogênica, ansiolítica, antioxidante e anti-inflamatória (92-96).

### 6.1 Fontes de $\gamma$ Oz

O arroz (*Oryza sativa L.*) é uma das principais fontes de alimento em todo mundo, sendo à base alimentar em diversas regiões, principalmente a Ásia e parte da América. Esse grão é a fonte mais rica de  $\gamma$ Oz (90,91).

O grão de arroz, resumidamente, é formado estruturalmente pela casca, cariopse, endosperma e pelo gérmen (Figura 8). A casca, sua camada protetora, é a camada mais externa que corresponde a cerca de 20% do grão e é removida no processo de descascagem. A cariopse, estrutura que representa de 5 a 8% do grão, é formada por 3 subcamadas, o pericarpo, o tegumento e aleurona. O pericarpo é rico em proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, constituintes que fornecem características importantes ao farelo de arroz. O endosperma é a maior parte do grão, 89 a 94%, e consiste em grânulos de amido e grânulos proteicos. Por fim, o gérmen ou embrião é rico em proteínas e lipídeos e representa de 2 a 3% do grão (97).

Após a descascagem obtém-se o arroz integral, composto pela cariopse e pelo endosperma e gérmen. Acrescentando-se mais um passo de processamento, o polimento, resta apenas o endosperma e obtendo-se o popularmente conhecido arroz branco (97,98).



**Figura 8.** Estrutura do grão de arroz e seus subprodutos. A casca é utilizada para a produção de ração animal e combustível. O farelo de arroz é obtido com a retirada da cariopse e do gérmen do restante do grão. O endosperma, após o polimento, origina o arroz branco. O  $\gamma$ Oz está presente no arroz integral, no farelo de arroz e no óleo. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 19 de novembro de 2021).

O farelo de arroz, subproduto do polimento, é considerado nutricionalmente rico devido a sua composição em macro e micronutrientes e pela presença de compostos bioativos (91,99). A partir do farelo, é possível realizar a extração de sua parte lipídica obtendo-se o óleo do farelo de arroz, que mantém a riqueza de parte desses compostos, uma vez muitos são lipossolúveis e são extraídos juntamente com o óleo (91).

O  $\gamma$ Oz é encontrado nas estruturas do grão que possuem componentes lipídicos, dessa forma, está presente no arroz integral, no farelo de arroz e no óleo. O  $\gamma$ Oz corresponde a aproximadamente 9,8 g/kg do farelo de arroz e sua concentração é de 13 a 20 vezes maior que outros compostos bioativos, como tocotrienóis e tocoferóis (*i.e.* vitamina E) (100,101). Em relação ao óleo de farelo de arroz, o  $\gamma$ Oz representa 20%



da fração não saponificável (91).

O  $\gamma$ Oz pode ser encontrado ainda no pericarpo de grãos de milho, trigo e centeio, porém, em quantidades muito pequenas (102). Sendo assim, o arroz é a maior fonte do composto e a mais relevante.

Tanto o farelo quanto o óleo têm sido estudados por serem boas fontes de compostos bioativos, porém os efeitos benéficos são atribuídos principalmente ao  $\gamma$ Oz, uma vez que este é o composto majoritário. O  $\gamma$ Oz tem sido descrito como um nutracêutico com aplicabilidade na área farmacêutica, cosmética e nutricional (103).

## 6.2 Farmacocinética

O uso do  $\gamma$ Oz como droga com aplicação na saúde já ocorre no Japão, pioneiros na pesquisa com o composto (104). No entanto, pouco é conhecido sobre a farmacocinética de conjugados de fitoesteróis.

O caminho do  $\gamma$ Oz após administração oral foi investigado pela primeira vez em coelhos em 1980 por Fujiwara *et al.* através da marcação com o isótopo radioativo carbono-14 ( $C^{14}$ ) (105). Neste estudo foi observado que 80% da radioatividade inicial estava presente no sangue como ácido ferúlico sugerindo a hidrólise do composto e esse metabólito seria responsável pelos efeitos *in vivo*. Posteriormente, Fujiwara *et al.* (1983), verificou em ratos machos que o  $\gamma$ Oz marcado com  $C^{14}$  foi parcialmente hidrolisado no intestino após administração oral; cerca de 89% do composto permaneceu intacto no fluido luminal e, então, mais de 80% do  $\gamma$ Oz foi transferido para a veia mesentérica e veia porta. Entre 10 e 20% da dose inicial foi hidrolisada no intestino a ácido ferúlico. Após 72h da administração, 9.8% da dose inicial foi excretada na urina como o metabólito. Dessa forma, foi hipotetizado que parte do  $\gamma$ Oz ingerido é hidrolisado a ácido ferúlico ainda no intestino e outra parte é absorvida intacta apresentando efeitos *in vivo* (106).

Estudos mais recentes observaram novamente a presença do  $\gamma$ Oz em sua forma intacta no plasma após administração oral (107,108). Em modelo de obesidade experimental induzida por dieta rica em gorduras, Kobayashi *et al.* (2019) detectou o  $\gamma$ Oz intacto no plasma, fígado, cérebro, rins, baço, musculo esquelético e gorduras mesentérica e perirrenal. Nesse estudo, também foi observado que o fígado apresentou a concentração mais elevada do composto enquanto que o cérebro foi o órgão com menor concentração (108).

Aprofundando-se no processo de digestão, através da simulação digestiva por enzimas pancreáticas e pépticas foi identificado a ação da enzima pancreática colesterol-esterase sobre o  $\gamma$ Oz (109). Essa enzima, é responsável pela hidrólise dos ferulatos campesteril e sitosteril, sem ação sobre os demais componentes. A estrutura de ambos é muito similar ao colesterol determinando sua suscetibilidade a ação da enzima (110).

A absorção, distribuição, metabolismo e excreção do  $\gamma$ Oz ainda carecem de elucidação. Os estudos foram conduzidos em sua maioria em animais, existindo uma falta de estudos em humanos em consideração ao fato de que o composto já tem sido utilizado.

Em resumo, segundo Sawada *et al.* (2019), o  $\gamma$ Oz ingerido é parcialmente excretado nas fezes passando diretamente pelo trato gastrointestinal. Demais quantidades do composto é, em parte, hidrolisada liberando ácido ferúlico que é absorvido e a outra parte é absorvida intacta. Após a absorção, ao atingir a circulação e tecidos, seu metabolismo ainda não é claro, no entanto, sabe-se que o ácido ferúlico é excretado na urina (111).

### 6.3 Efeitos biológicos do $\gamma$ Oz e mecanismos de ação

Mecanismos de ação são as vias bioquímicas e fisiológicas pelas quais os compostos interagem com os componentes celulares e teciduais

para realizar um efeito biológico. O  $\gamma$ Oz apresenta um grande espectro de efeitos benéficos, conforme relata a literatura, característica que é comum a muitos compostos bioativos (112). A somatória desses efeitos se deve não apenas ao composto isoladamente, pode ser resultante do sinergismo entre o composto em sua forma intacta e seus metabólitos ou outras moléculas presentes no organismo (80). Muitos trabalhos exploram a relação causa-efeito do composto, sendo assim, seus mecanismos de ação ainda não foram completamente desvendados.

#### Hipolipemiante e antiobesidade

A prevenção ou redução do ganho de adiposidade e melhora de alterações do perfil lipídico estão entre os benefícios relatados do  $\gamma$ Oz (92). Em ratos submetidos à dieta rica em gorduras e frutose, Wang *et al.* verificou que o  $\gamma$ Oz aliviou a obesidade e a dislipidemia, normalizando os níveis de colesterol total, triglicérides, lipoproteína de baixa densidade (LDL - do inglês, low density lipoprotein), AGLs e aumento do nível de lipoproteína de alta densidade (HDL - do inglês, high density lipoprotein) (113).

Devido a similaridade estrutural do  $\gamma$ Oz ao colesterol, assim como outros fitoesteróis, é solubilizado em micelas por ácidos biliares no lúmen intestinal. O composto apresenta maior solubilidade e afinidade pelas micelas que o colesterol, reduzindo a sua absorção (114). Foi verificado que o composto aumenta a excreção de gordura fecal, o que resulta em menor absorção, assim como tem ação supressora sobre a lipogênese hepática através de regulação da atividade de enzimas NADPH (115).

#### Antidiabetogênico

O desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) estão intimamente relacionados a obesidade. Son *et al.* verificou o efeito hipoglicemiante do  $\gamma$ Oz em camundongos alimentados com dieta

rica em gordura suplementada com o composto juntamente com redução nos níveis plasmáticos de insulina (116). Em um modelo experimental de síndrome metabólica, foi observado melhora da glicemia de jejum e do teste oral de tolerância a glicose (113). Além de efeitos nos níveis plasmáticos de glicose e insulina, o  $\gamma$ Oz também atua nos tecidos, como por exemplo, no músculo esquelético aumentando a expressão do transportador de glicose 4 (GLUT-4) e atenuando a resistência à insulina (117).

Especificamente na DM2, o composto apresentou efeito protetor sobre as células  $\beta$  pancreáticas, responsáveis pela secreção de insulina. O estresse do retículo endoplasmático nas ilhotas pancreáticas está ligado a disfunção de células  $\beta$  e a progressão para apoptose, fator que contribui para que ao longo do tempo ocorra diminuição da secreção de insulina e adição à resistência. Animais com diabetes induzida por estreptozotocina e alimentados com dieta rica em gordura que receberam o  $\gamma$ Oz concomitante a dieta, ocorreu atenuação do estresse do retículo endoplasmático e da sinalização para apoptose nas ilhotas melhorando o dismetabolismo da glicose (95).

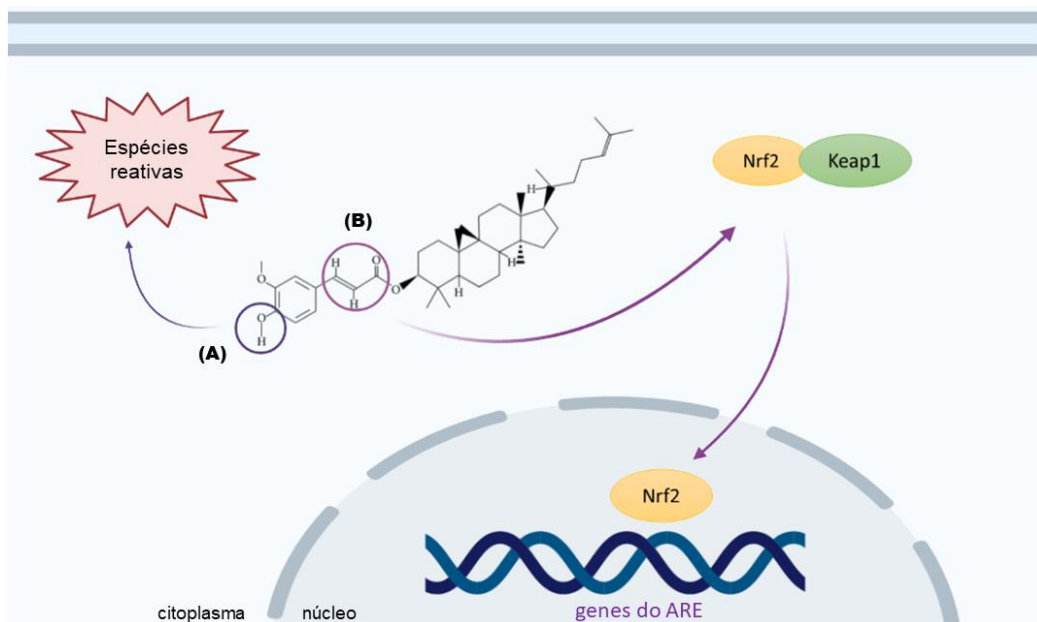
### Antioxidante

Os antioxidantes não enzimáticos são caracterizados pela habilidade de inativar rapidamente os oxidantes ou contribuir para que outras moléculas o façam. Provenientes de fonte dietética, os antioxidantes exógenos como o  $\gamma$ Oz, são essenciais para a manutenção das funções celulares e do equilíbrio redox (118).

O efeito antioxidante do  $\gamma$ Oz tem sido demonstrado pela sua ação como *scavenger* de espécies oxidantes e pela melhora da atividade antioxidante enzimática. Tanto o composto intacto, quanto seus metabólitos foram testados contra diferentes oxidantes, como oxigênio singleto, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH),

ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), revelando sua ação *scavenger in vitro* (118,119). Em modelos *in vivo*, foi verificado que o composto diminuiu ou preveniu o aumento de indicadores de estresse oxidativo como o MDA e CBO, assim como o aumento da defesa antioxidante enzimática (113,117,120).

O  $\gamma\text{Oz}$  também está envolvido com a modulação do fator de transcrição fator nuclear-E2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), cuja ativação parece ser o efeito central do composto (118). O Nrf2 é um mecanismo de regulação da homeostase redox promotor da transcrição de genes do elemento de resposta antioxidante (ARE) que inclui enzimas como a CAT e SOD. Em condições basais o Nrf2 está no citoplasma e ligado ao seu inibidor natural (Keap1 - do inglês "*Kelch-like ECH-associated Protein 1*"). Quando exposto a espécies oxidantes, os resíduos de cisteína do Keap1 são oxidados ocorrendo uma mudança conformacional resultando na liberação do Nrf2 que se transloca para o núcleo onde promove a transcrição dos genes do ARE. O  $\gamma\text{Oz}$ , através do deslocamento de elétrons é capaz de apresentar característica eletrofílica, dessa forma, também pode viabilizar a oxidação dos resíduos de cisteína do Keap1 e, conseqüentemente, ativar a resposta antioxidante (Figura 9) (121,122).



**Figura 9.** Mecanismo antioxidante do  $\gamma$ Oz. **(A)** Região do ácido ferúlico responsável pela transferência do átomo de hidrogênio para espécies reativas, atuando como *scavenger*. **(B)** Região carbonil responsável pela característica eletrofílica que atrai moléculas nucleofílicas (resíduos de cisteína) do Keap1, levando a translocação nuclear do Nrf2 e ativação do ARE. Nrf2: fator nuclear-E2 relacionado ao fator 2; Keap1: inibidor natural do Nrf2; ARE: elemento de resposta antioxidante. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 19 de novembro de 2021).

### Anti-inflamatório

Diversos trabalhos demonstraram a redução significativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias pelo  $\gamma$ Oz, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (91). O efeito foi verificado na disfunção do tecido adiposo, músculo esquelético, fígado e rins em modelos de obesidade (117,120,123,124). Outras condições avaliadas são a inflamação cerebral induzida por LPS em camundongos, isquemia renal, injúria pulmonar induzida pela sepse e injúria hepática induzida por acetaminofeno (121,125-127).

A expressão de citocinas pró-inflamatórias são subreguladas pelo

$\gamma$ Oz através da inibição da translocação do NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo. O mecanismo exato pelo qual a inibição ocorre ainda não foi estabelecido, no entanto, possivelmente está atribuído a sua capacidade antioxidante. Ao atuar neutralizando espécies reativas e melhorando a resposta antioxidante, o  $\gamma$ Oz impede conseqüentemente a ativação do fator transcricional por essa sinalização (92).

## **7 Considerações finais**

A SMCR surge em meio ao agregado de alterações metabólicas e conseqüências nocivas para os órgãos que a obesidade causa, afetando concomitantemente o coração e rins (20). A partir dos efeitos protetores relatados sobre o  $\gamma$ Oz em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, é possível classificá-lo como um agente terapêutico não farmacológico promissor para prevenir doenças e efeitos deletérios, como a SMCR (92).

Ferramentas metodológicas podem possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pelos processos fisiopatológicos e potenciais alvos terapêuticos. Nesse sentido, a análise proteômica tem sido empregada, revelando a expressão diferencial de proteínas e fornecendo insights que podem contribuir para estratégias terapêuticas (128).

## **8 Justificativa**

O consumo de uma dieta rica em carboidratos simples e gordura está associada ao desenvolvimento da obesidade, caracterizada pelo excesso de gordura corporal que causa prejuízo à saúde. Dentre os seus desfechos nocivos, encontram-se as alterações metabólicas e conseqüente acometimento do coração e rins, denominado como SMCR, que apresenta como pilares patogênicos a inflamação e o estresse

oxidativo. Considerando a relevância dessa condição no cenário mundial, é importante buscar alternativas preventivas que promovam a manutenção da saúde. O composto bioativo,  $\gamma$ Oz, apresenta características importantes que o tornam alvo de estudos, dentre elas a atividade anti-inflamatória e antioxidante. Este trabalho tem como hipótese que o  $\gamma$ Oz é capaz de prevenir a SMCR, através da preservação da expressão de proteínas principalmente associadas ao estresse oxidativo e inflamação, em modelo experimental de obesidade induzida por dieta.

## **9 Objetivos**

### *9.1 Objetivo geral*

Avaliar o efeito preventivo do  $\gamma$ Oz sobre a SMCR em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcares e gordura.

### *9.2 Objetivos específicos*

1. Caracterizar a presença da obesidade;
2. Avaliar a presença de complicações decorrentes da obesidade;
3. Avaliar a manifestação da SMCR;
4. Verificar o efeito preventivo do  $\gamma$ Oz sobre as complicações da obesidade e sobre a SMCR;
5. Verificar o efeito preventivo do  $\gamma$ Oz sobre o proteoma do coração e dos rins.



## Referências Bibliográficas

1. Popkin BM. Nutrition transition and the global diabetes epidemic. *Curr Diab Rep.* 2015;15(9):64.
2. World Health Organization. Noncommunicable diseases [Internet]. Fact sheet n° 355. Geneva: WHO; 2021. [citado 27 Set 2021]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>
3. Myles IA. Fast food fever: reviewing the impact of the Western diet on immunity. *Nutr J.* 2014;13(61):1–17.
4. Monteiro CA, Cannon G, Levy RB, Moubarac J-C, Louzada ML, Rauber F, et al. Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public Health Nutr.* 2019 Apr 12;22(5):936–41.
5. Baker P, Machado P, Santos T, Sievert K, Backholer K, Hadjidakou M, et al. Ultra-processed foods and the nutrition transition: global, regional and national trends, food systems transformations and political economy drivers. *Obes Rev.* 2020;21(12):e13126.
6. Garcia JL, Francisqueti FV, Ferraz APCR, Ferron AJT, Costa MR, Gregolin CS, et al. High sugar-fat diet induces metabolic-inflammatory disorders independent of obesity development. *Food Nutr Sci.* 2019;10(6):664–77.
7. Hruby A, Hu FB. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics.* 2015;33(7):673–89.
8. DiNicolantonio JJ, Berger A. Added sugars drive nutrient and energy deficit in obesity: a new paradigm. *Open Hear.* 2016;3(2):e000469.
9. World Health Organization. Fact sheets: obesity and overweight [Internet]. Geneva: WHO; 2021. [citado 27 Set 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
10. Popkin BM, Corvalan C, Grummer-Strawn LM. Dynamics of the double burden of malnutrition and the changing nutrition reality. *Lancet.* 2020;395(10217):65–74.
11. Min J, Zhao Y, Slivka L, Wang Y. Double burden of diseases worldwide: coexistence of undernutrition and overnutrition-related non-communicable chronic diseases. *Obes Rev.* 2018;19(1):49–61.
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde 2019: ciclos da vida [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2021. [citado 28 Set 2021].
13. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2009;9:88.
14. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB.

- Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Curr Obes Rep.* 2015;4(3):363–70.
15. Andolfi C, Fisichella PM. Epidemiology of obesity and associated comorbidities. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2018;28(8):919–24.
  16. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol.* 2018;36(1):14–20.
  17. World Health Organization. Fact sheets: cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. Geneva: WHO; 2021. [citado 29 Set 2021]. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
  18. Olsen N, Câmara S, Iseki K, Kramer H, Liu Z, Sharma K. Kidney disease and obesity: epidemiology, mechanisms and treatment. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(3):181–90.
  19. Jokinen E. Obesity and cardiovascular disease. *Minerva Pediatr.* 2015;67(1):25–32.
  20. Whaley-Connell A, Sowers JR. Basic science: pathophysiology: the cardiorenal metabolic syndrome. *J Am Soc Hypertens.* 2014;8(8):604–6.
  21. Chaudhary K, Malhotra K, Sowers J, Aroor A. Uric acid-key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome. *Cardio Renal Med.* 2013;3(3):208–20.
  22. Costanzo L. *Fisiologia.* 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2018.
  23. Dângelo JG, Fattini CA. *Anatomia humana sistêmica e segmentar.* 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2011.
  24. Hoit BD. Anatomy and physiology of the pericardium. *Cardiol Clin.* 2017;35(4):481–90.
  25. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica.* 13a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2017.
  26. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol.* 2015;89(9):1401–38.
  27. Garg P. Nephrology a review of podocyte biology. *Am J Nephrol.* 2018;47 Suppl 1:3–13.
  28. Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, et al. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *J Clin Hypertens.* 2013;15(1):14–33.
  29. Silva GB Jr, Bentes ACSN, Daher EDF, Matos SMA. Obesity and kidney disease. *J Bras Nefrol.* 2017;39(1):65-9.
  30. Shenasa M, Shenasa H. Hypertension, left ventricular hypertrophy, and sudden cardiac death. *Int J Cardiol.* 2017;237:60–3.
  31. Cabandugama PK, Gardner MJ, Sowers JR. The renin angiotensin

- aldosterone system in obesity and hypertension. *Med Clin North Am.* 2017;101(1):129–37.
32. Rojas E, Velasco M, Bermúdez V, Israili Z, Bolli P. Targeting hypertension in patients with cardiorenal metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2012;14(5):397–402.
  33. van Buul VJ, Tappy L, Brouns FJPH. Misconceptions about fructose-containing sugars and their role in the obesity epidemic. *Nutr Res Rev.* 2014;27(1):119–30.
  34. Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients.* 2017;9(9):981.
  35. Simopoulos A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients.* 2016;8(3):128.
  36. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis.* 2016;244:211–5.
  37. Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, Dinan TG, Ross RP, Fitzgerald GF, et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgrad Med J.* 2016;92(1087):286–300.
  38. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2020;113(12):2019–40.
  39. Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(16):2959–77.
  40. Tilg H, Zmora N, Adolph TE, Elinav E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(1):40–54.
  41. Choi CHJ, Cohen P. Adipose crosstalk with other cell types in health and disease. *Exp Cell Res.* 2017;360(1):6–11.
  42. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):216–29.
  43. Castro JP, Grune T, Speckmann B. The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte function and dysfunction. *Biol Chem.* 2016;397(8):709–24.
  44. Jernås M, Palming J, Sjöholm K, Jennische E, Svensson PA, Gabrielsson BG, et al. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J.* 2006;20(9):1540–2.
  45. Halberg N, Wernsted I, Scherer P. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009;37(3):1–15.
  46. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):2358.
  47. Opatrilova R, Caprnda M, Kubatka P, Valentova V, Uramova S, Nosal V, et al. Adipokines in neurovascular diseases. *Biomed*

- Pharmacother. 2018;98:424–32.
48. Zhang Y, Chua S. Leptin function and regulation. *Compr Physiol*. 2017;8(1):351–69.
  49. Krysiak R, Handzlik-Orlik G, Okopien B. The role of adipokines in connective tissue diseases. *Eur J Nutr*. 2012;51(5):513–28.
  50. Castoldi A, Souza CN, Câmara NOS, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. *Front Immunol*. 2016;6:637.
  51. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175–84.
  52. Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr*. 2015;114(7):999–1012.
  53. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*. 2008;582(1):117–31.
  54. Butler TJ, Ashford D, Seymour AM. Western diet increases cardiac ceramide content in healthy and hypertrophied hearts. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27(11):991-8.
  55. Moreno-Indias I, Tinahones FJ. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J Diabetes Res*. 2015:970375.
  56. Dandekar A, Mendez R, Zhang K. Cross Talk Between ER Stress, Oxidative Stress, and Inflammation in Health and Disease. *Stress responses*. 2015:205–14.
  57. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2011;3(1):17.
  58. Eruslanov E, Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*. 2010;594:57–72.
  59. Semchyshyn HM. Reactive carbonyl species in vivo: Generation and dual biological effects. *ScientificWorldJournal*. 2014:417842.
  60. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55–74.
  61. Simões ICM, Fontes A, Pinton P, Zischka H, Wieckowski MR. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;95:93–9.
  62. Dunning S, Ur Rehman A, Tiebosch MH, Hannivoort RA, Haijer FW, Woudenberg J, et al. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2027–34.
  63. Ježek J, Cooper KF, Strich R. Reactive oxygen species and mitochondrial dynamics: the yin and yang of mitochondrial

- dysfunction and cancer progression. *Antioxidants*. 2018;7(1):13.
64. Li J, Romestaing C, Han X, Li Y, Hao X, Wu Y, et al. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell Metab*. 2010;12(2):154–65.
  65. Hauck AK, Bernlohr DA. Oxidative stress and lipotoxicity. *J Lipid Res*. 2016;57(11):1976–86.
  66. Aldini G, Dalle-Donne I, Colombo R, Facino RM, Milzani A, Carini M. Lipoxidation-derived reactive carbonyl species as potential drug targets in preventing protein carbonylation and related cellular dysfunction. *Chem Med Chem*. 2006;1(10):1045–58.
  67. Harcourt BE, Sourris KC, Coughlan MT, Walker KZ, Dougherty SL, Andrikopoulos S, et al. Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. *Kidney Int*. 2011;80(2):190–8.
  68. Navarro MEL, Santos KC, Nascimento AF, Francisqueti FV, Minatel IO, Pierine DT, et al. Renal inflammatory and oxidative and metabolic changes after 6 weeks of cafeteria diet in rats. *J Bras Nefrol*. 2016;38(1):9–14.
  69. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454(7203):428-35.
  70. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;14(6):771–6.
  71. Paiva CN, Bozza MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxidants Redox Signal*. 2014;20(6):1000-37.
  72. Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res*. 2011;21:103–15.
  73. Kosaka T, Fukui R, Matsui M, Kurosaka Y, Nishimura H, Tanabe M. RAGE, Receptor of advanced glycation endproducts, negatively regulates chondrocytes differentiation. *PLoS One*. 2014;9(10):e108819.
  75. Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(2):95–112.
  75. De Lorenzo A, Romano L, Di Renzo L, Di Lorenzo N, Cennamo G, Gualtieri P. Obesity: a preventable, treatable, but relapsing disease. *Nutrition*. 2020;71(3):110615.
  76. World Health Organization. Healthy diet. Fact sheets. Geneva: WHO;2020.
  77. Giugliano D, Esposito K. Mediterranean diet and metabolic diseases. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Feb;19(1):63–8.
  78. Mentella, Scadaferri, Ricci, Gasbarrini, Miggiano. Cancer and Mediterranean Diet: A Review. *Nutrients*. 2019;11(9):2059.
  79. Lanuza F, Zamora-Ros R, Hidalgo-Liberona N, Andrés-Lacueva C, Meroño T. Wholegrain Consumption and Risk Factors for Cardiorenal Metabolic Diseases in Chile: A Cross-Sectional

- Analysis of 2016–2017 Health National Survey. *Nutrients*. 2020;12(9):2815.
80. González S. Dietary bioactive compounds and human health and disease. *Nutrients*. 2020;12(2):348.
  81. Guaadaoui A, Benaicha S, Elmajdoub N, Bellaoui M, Hamal A. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *Int J Nutr Food Sci*. 2014;3(3):174.
  82. Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct*. 2019;10(2):514–28.
  83. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 2021;13(1):273.
  84. Langi P, Kiokias S, Varzakas T, Proestos C. Carotenoids: From Plants to Food and Feed Industries. In 2018. p. 57–71.
  85. Racette SB, Lin X, Ma L, Ostlund, Jr RE. Natural Dietary Phytosterols. *J AOAC Int*. 2015;98(3):679–84.
  86. Guasch-Ferré M, Merino J, Sun Q, Fitó M, Salas-Salvadó J. Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–16.
  87. Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, Mo H, Shastri A, Su R, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem*. 2014;25(1):1–18.
  88. Poli A, Marangoni F, Corsini A, Manzato E, Marrocco W, Martini D, et al. Phytosterols, Cholesterol Control, and Cardiovascular Disease. *Nutrients*. 2021;13(8):2810.
  89. Ling W., Jones PJ. Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci*. 1995;57(3):195–206.
  90. Ramazani E, Akaberi M, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Biological and pharmacological effects of gamma-oryzanol: an updated review of the molecular mechanisms. *Curr Pharm Des*. 2020;27(19):2299–316.
  91. Sohail M, Rakha A, Butt MS, Iqbal MJ, Rashid S. Rice bran nutraceuticals: a comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(17):3771–80.
  92. Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pereira Lima GP. Antioxidant activity of  $\gamma$ -oryzanol: a complex network of interactions. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1107.
  93. Francisqueti FV, Minatel IO, Ferron AJT, Bazan SGZ, Silva VS, Garcia JL, et al. Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet. *Nutrients*. 2017;9(12):1299.
  94. Minatel IO, Lee Y, Yoon H, Yoon Y, Han S, Corrêa CR, et al. Antiadipogenic activity of  $\gamma$ -oryzanol and its stability in pigmented

- rice. *J Med Food*. 2016;19(7):1–6.
95. Kozuka C, Sunagawa S, Ueda R, Higa M, Tanaka H.  $\gamma$ -oryzanol protects pancreatic beta-cells against endoplasmic reticulum stress in male mice. *Endocrinology*. 2015;156(4):1242–50.
  96. Akter S, Uddin KR, Sasaki H, Shibata S. Gamma oryzanol alleviates high-fat diet-induced anxiety-like behaviors through downregulation of dopamine and inflammation in the amygdala of mice. *Front Pharmacol*. 2020;11:330.
  97. Walter M, Marchezan E, Avila LA. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciênc Rural*. 2008;38(4):1184–92.
  98. Zhou Z, Robards K, Helliwell S, Blanchard C. Composition and functional properties of rice. *Int J Food Sci Technol*. 2002;37(8):849–68.
  99. Sharif MK, Butt MS, Anjum FM, Khan SK. Rice bran: a novel functional ingredient. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(6):807–16.
  100. Fang N, Yu S, Badger TM. Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS / MS. *J Agric Food Chem*. 2003;51(11):3260–7.
  101. Bergman CJ, Xu Z. Genotype and environment effects on tocopherol, tocotrienol, and  $\gamma$ -oryzanol contents of southern U.S. rice. *Cereal Chem*. 2003;80(4):446–9.
  102. Seitz LM. Stanol and sterol esters of ferulic and p-coumaric acids in wheat, corn, rye, and triticale. *J Agric Food Chem*. 1989;37(3):662–7.
  103. Zhong J, Liu X, Wang Y, Qin X, Li Z.  $\gamma$ -Oryzanol nanoemulsions produced by a lowenergy emulsification method: an evaluation of process parameters and physicochemical stability. *Food Funct*. 2017;8(6):2202–11.
  104. Taniguchi H, Hashimoto H, Hosoda A, Kometani T, Tsuno T, Adachi S. functionality of compounds contained in rice bran and their improvement. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 2012;59(7):301–18.
  105. Fujiwara S, Sakurai S, Noumi K, Sugimoto I, Awata N. Metabolism of gamma-oryzanol in rabbit. *J Pharm Soc Jpn*. 1980;100:1011–8.
  106. Fujiwara S, Sakurai S, Sugimoto I, Awata N. Absorption and metabolism of gamma-oryzanol in rats. *Chem Pharm Bull*. 1983;31(2):645–52.
  107. Kobayashi E, Ito J, Kato S, Sawada K, Matsuki M, Hashimoto H, et al. Presence of orally administered rice bran oil  $\gamma$ -oryzanol in its intact form in mouse plasma. *Food Funct*. 2016;7(12):4816–22.
  108. Kobayashi E, Ito J, Shimizu N, Kokumai T, Kato S, Sawada K, et al. Evaluation of  $\gamma$ -oryzanol accumulation and lipid metabolism in the body of mice following long-term administration of  $\gamma$ -oryzanol. *Nutrients*. 2019;11(1):104.
  109. Szcześniak KA, Ostaszewski P, Ciecierska A, Sadkowski T.

- Investigation of nutraceutical phytochemical - gamma-oryzanol in experimental animal models. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2016;100(4):601–17.
110. Miller A, Majauskaite L, Engel KH. Enzyme-catalyzed hydrolysis of  $\gamma$ -oryzanol. *Eur Food Res Technol.* 2004;218(4):349–54.
  111. Kazue S, Halida R, Midori M, Hiroyuki H, Oz RB. Absorption and metabolism of  $\gamma$ -Oryzanol, a characteristic functional ingredient in rice bran. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2019;65:180–4.
  112. Serrano JCE, Jove M, Gonzalo H, Pamplona R, Portero-Otin M. Nutridynamics: mechanism(s) of action of bioactive compounds and their effects. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66 Suppl 1:22-30.
  113. Wang O, Liu J, Cheng Q, Guo X, Wang Y, Zhao L, et al. Effects of ferulic acid and  $\gamma$ -Oryzanol on high-fat and high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *PLoS One.* 2015;10(2):1–14.
  114. Hamada T, Goto H, Yamahira T, Sugawara T, Imaizumi K, Ikeda I. Solubility in and affinity for the bile salt micelle of plant sterols are important determinants of their intestinal absorption in rats. *Lipids.* 2006;41(6):551–6.
  115. Jin Son M, Rico CW, Hyun Nam S, Young Kang M. Influence of oryzanol and ferulic acid on the lipid metabolism and antioxidative status in high fat-fed mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46(2):150–6.
  116. Son MJ, Rico CW, Nam SH, Kang MY. Effect of oryzanol and ferulic acid on the glucose metabolism of mice fed with a high-fat diet. *J Food Sci.* 2011;76(1):4–7.
  117. De Mattei L, Francisquetti-Ferron FV, Garcia JL, Ferron AJT, Silva CCVA, Gregolin CS, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of gamma-oryzanol attenuates insulin resistance by increasing GLUT-4 expression in skeletal muscle of obese animals. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;537:111423.
  118. Rungratanawanich W, Memo M, Uberti D. Redox homeostasis and natural dietary compounds: focusing on antioxidants of rice (*Oryza sativa* L.). *Nutrients.* 2018;10(11):1605.
  119. Sari YP, Santoso U, Supriyadi, Raharjo S. Determination of singlet oxygen quenching rate and mechanism of  $\gamma$ -oryzanol. *Heliyon.* 2021;7(5):e07065.
  120. Francisquetti FV, Junio A, Ferron T, Hasimoto FK, Henrique P, Alves R, et al. Gamma oryzanol treats obesity-induced kidney injuries by modulating the adiponectin receptor 2 / PPAR- $\alpha$  Axis. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;1278392.
  121. Shu G, Qiu Y, Hao J, Fu Q, Deng X.  $\gamma$ -Oryzanol alleviates acetaminophen-induced liver injury: roles of modulating AMPK/GSK3 $\beta$ /Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Food Funct.* 2019;10(10):6858–72.
  122. Rungratanawanich W, Abate G, Serafini MM, Guarienti M, Catanzaro M, Marziano M, et al. Characterization of the antioxidant



- effects of  $\gamma$ -oryzanol: involvement of the Nrf2 pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:2987249.
123. Francisqueti-Ferron FV, Garcia JL, Ferron AJT, Nakandakare-Maia ET, Gregolin CS, Silva JPC, et al. Gamma-oryzanol as a potential modulator of oxidative stress and inflammation via PPAR- $\gamma$  in adipose tissue: a hypothetical therapeutic for cytokine storm in COVID-19? *Mol Cell Endocrinol*. 2021;520:111095.
  124. Wang L, Lin Q, Yang T, Liang Y, Nie Y, Luo Y, et al. Oryzanol modifies high fat diet-induced obesity, liver gene expression profile, and inflammation response in mice. *J Agric Food Chem*. 2017;65(38):8374–85.
  125. Mastinu A, Bonini SA, Rungratanawanich W, Aria F, Marziano M, Maccarinelli G, et al. Gamma-oryzanol prevents Ips-induced brain inflammation and cognitive impairment in adult mice. *Nutrients*. 2019;11(4):728.
  126. Bagheri Y, Barati A, Nouraei S, Namini NJ, Bakhshi M, Fathi E, et al. Comparative study of gavage and intraperitoneal administration of gamma-oryzanol in alleviation/attenuation in a rat animal model of renal ischemia/reperfusion-induced injury. *Iran J Basic Med Sci*. 2021;24(2):175–83.
  127. Zolali E, Asgharian P, Hamishehkar H, Kouhsoltani M, Khodaii H, Hamishehkar H. Effects of gamma oryzanol on factors of oxidative stress and sepsis-induced lung injury in experimental animal model. *Iran J Basic Med Sci*. 2015;18(12):1257–63.
  128. Moulder R, Schwartz D, Goodlett DR, Dayon L. Proteomics of diabetes, obesity, and related disorders. *Proteomics Clin Appl*. 2018;12(1):1600134.

*Capítulo* **II**  
*Artigo*

1        **Effect of gamma-oryzanol on the proteome profile of the target**  
2        **organs of cardiorenal metabolic syndrome in obesity model**

3  
4        Jéssica Leite Garcia <sup>1,\*</sup>, Alfonsina D'Amato <sup>2</sup>, Fabiane Valentini  
5        Francisqueti-Ferron, Cristina Schmitt Gregolin<sup>1</sup>, Silmeia Garcia Zanati  
6        Bazan, Artur Junio Togneri Ferron <sup>1</sup>, Fernando Moreto <sup>1</sup>, Igor Otavio  
7        Minatel <sup>3</sup>, Giancarlo Aldini <sup>2</sup>, Camila Renata Correa<sup>1</sup>

8  
9        <sup>1</sup> Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP),  
10        Botucatu, SP, Brazil

11        <sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Milan, Italy

12        <sup>3</sup> Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São  
13        Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

14  
15        **Abstract**

16        **Aim:** To test the hypothesis that  $\gamma$ Oz acts on the proteomic profile of the  
17        SMCR target organs, preventing the deleterious effect from the HSF diet.

18        **Methods:** Male Wistar rats were distributed into 3 experimental groups (7  
19        animals/group): control, high sugar-fat (HSF) and HSF +  $\gamma$ Oz for 30 weeks.

20        Renal and cardiac functions were assessed. The proteomic profiling of  
21        both tissues was analysed by label-free quantitative proteomics. **Results:**  
22        The HSF diet promoted obesity, metabolic and hormonal complications.

23        The CRMS was characterized by the presence of renal and cardiac  
24        dysfunction associated with changes in the proteomic profiling.  $\gamma$ Oz

25        prevented the increase body weight, adiposity index, triglycerides, glucose  
26        tolerance impairment and HOMA-IR. Changes in the proteome profiling

27        was also modulated by the compound which acted on the expression of  
28        protein associated with oxidative stress in kidneys; lipid synthesis, fibrosis

29        and cardiac contractility in heart and mitochondrial dysfunction in both  
30        tissues. **Conclusion:** The  $\gamma$ Oz prevented changes in the kidney and heart

31 proteome related to oxidative stress and mitochondrial function, key  
32 mechanisms for the development of the disease.

33

34 **Key-words:** high sugar-fat diet, bioactive compound, label-free  
35 quantitative proteomic, cardiac dysfunction, renal dysfunction

36

## 37 **1 Introduction**

38

39 Obesity is a chronic metabolic disease that has reached pandemic  
40 levels, representing a public health problem and an economic burden (1,2).  
41 As pointed out by the World Health Organization (WHO), more than 1.9  
42 billion adults were obese in 2016 and more recent data revealed that in  
43 2020 more than 39 million children were overweight or obese (2). A  
44 complex interaction between genetic and behavioral factors is responsible  
45 for this condition, however the high intake of processed foods rich in sugar  
46 and fat associated with sedentary lifestyle have significantly increased the  
47 obesity prevalence worldwide (3). Many complications are related to  
48 obesity, as hypertriglyceridemia, hyperglycemia, insulin resistance,  
49 diabetes mellitus type 2, cardiovascular and renal diseases, contributing to  
50 a decline in quality of life and life expectancy (1,4).

51 This scenario is the onset for the development of the cardiorenal  
52 metabolic syndrome (CRMS), term that designates the co-existence of  
53 renal and cardiac dysfunction as consequence of the obesity-related  
54 complications (5). The CRMS pathophysiology is strongly associated to  
55 hypertension and insulin resistance presenting the adipose tissue  
56 dysfunction as major contributor of the pathogenic pillars, oxidative stress  
57 and inflammation (6). Considering the outcomes, the investigation of  
58 therapeutic strategies is essential for the prevention and treatment of  
59 obesity-related diseases.

60 The bioactive compound, Gamma-oryzanol ( $\gamma$ Oz), abundantly found

61 in the rice bran is a combination of multiple molecules of ferulic acid and  
62 phytosterol with antioxidant and anti-inflammatory properties (7,8).  
63 Additionally, has been described in the literature, that  $\gamma$ Oz is a non-  
64 pharmacological therapeutic agent due to its beneficial effects in different  
65 illnesses, mainly in metabolic diseases and related disorders as the ability  
66 to lower cholesterol and triglycerides (9). Previous study reported that  $\gamma$ Oz  
67 is able to prevent renal and cardiac dysfunction in condition of obesity (10).  
68 However, the exact mechanism of this prevention was not reported and it  
69 still has not been clarified.

70 Proteins are the main components of all cellular processes. The  
71 proteome is dynamic and understanding the changes caused by  
72 pathological processes is fundamental. Proteomics approach is the large-  
73 scale study of proteins with constant methodological improvements which  
74 have provided new possibilities and strategies to investigate diseases (11).  
75 These advances are mainly aimed at finding novel target proteins for  
76 diagnosis and/or therapeutics. Several studies have investigated the  
77 proteome in obesity in plasma and different tissues, including adipose  
78 tissue (12-15). However, the combination of cardiac and renal dysfunction  
79 characterizing obesity-related CRMS has not been evaluated, as well as  
80 the  $\gamma$ Oz effect. Since the positive action of  $\gamma$ Oz on the heart and kidney in  
81 SMCR has been reported the aim of this study was to test the hypothesis  
82 that  $\gamma$ Oz acts on the proteomic profile of the SMCR target organs,  
83 preventing the deleterious effect from the HSF diet.

84

## 85 **2 Methods**

86

### 87 **2.1 Animal model and experimental protocol**

88 The study was performed according to the guidelines for animal  
89 research (16) and approved by the Ethics Committee on Animal  
90 Experiments of the Botucatu Medical School, UNESP (protocol number

91 1309/2019). Eight-weeks-old male Wistar rats ( $\pm$  187 g) obtained from the  
92 Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda - ANILAB (Paulínia, SP,  
93 Brazil), were housed in individual cages in a controlled environment under  
94 a 12-h light-dark cycle at a room temperature of  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  and humidity  
95 of  $55 \pm 5\%$ , with a free supply of food and water, Rats were randomly  
96 distributed into three groups ( $n = 7/\text{group}$ ): Control, High sugar-fat (HSF)  
97 and HSF +  $\gamma\text{Oz}$  for 30 weeks. At the 30th week of experiment, oral glucose  
98 tolerance test (OGTT), systolic blood pressure (SBP) measurement,  
99 echocardiogram and 24-h urine collection were performed. To collect the  
100 urine, the animals were placed in metabolic cages for 24 h. At the of the  
101 experimental protocol, the rats were fasted for 8 h, anesthetized (50 mg/kg  
102 ketamine; 10 mg/kg xylazine; i.p.), and euthanized by decapitation. Blood  
103 samples were collected and the plasma was separated by centrifugation  
104 ( $800 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min) for metabolic analyzes. The kidneys and heart  
105 were excised and dissected and the samples were immediately frozen at  
106 the temperature of liquid nitrogen and stored in  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer for analysis.  
107 The adipose tissue was isolated, dissected, and weighed for nutritional  
108 profile assessment.

109

## 110 **2.2 Diets and $\gamma\text{Oz}$ dose**

111 The diets,  $\gamma\text{Oz}$  dose and the experimental period were based on  
112 previous work from our research group (17). Briefly, both diets were  
113 nutritionally balanced for micronutrients but different for macronutrients.  
114 The control diet was composed of soybean meal, sorghum, soybean peel,  
115 dextrin, soybean oil, vitamins, and minerals. The high sugar-fat diet was  
116 designed to mimic the western dietary habits, being composed of soybean  
117 meal, sorghum, soybean peel, dextrin, sucrose, fructose, lard, vitamins  
118 and minerals, and addition of 25% sucrose in the drinking water. The  
119 macronutrients composition is presented in Table 1.

120 The isolated compound was purchased from Tokyo Chemical

121 Industry Co., Ltd. (Toshima, Kita-ku, Tokyo) and was added to the diets to  
122 reach 0.5% of the final concentration (w/w) during all the 30 weeks of  
123 experiment aiming to evaluate the preventive effect.

124

125 **Table 1.** Nutritional composition of the diets.

<b>Nutritional Values</b>	<b>Control</b>	<b>HSF</b>
Protein (% of ingredients)	20.0	18.0
Carbohydrate (% of ingredients)	60.0	53.5*
Fat (% of ingredients)	4.00	16.5
% of unsaturated	69.0	47.0
% of saturated	31.0	53.0
Protein (% of calories)	22.9	16.6
Carbohydrate (% of calories)	66.8	49.2*
Fat (% of calories)	10.4	34.2
Energy (Kcal/g)	3.59	4.35

126 HSF: high sugar-fat. \* % of carbohydrate and energy in chow without  
127 considering the sucrose added in drinking water.

128

## 129 **2.3 Nutritional profile and obesity complications assessment**

130

### 131 **2.3.1 Nutritional parameters**

132 The nutritional profile was evaluated by final body weight, chow  
133 intake, water intake, caloric intake and adiposity index (AI). Chow and  
134 water intake were daily calculated from the individual leftovers of each  
135 animal, and the caloric intake was determined by multiplying the energy  
136 value of each diet (g × Kcal) by the daily food consumption. For the groups  
137 fed the HSF diet, the caloric intake also included the calories from the  
138 sucrose in drinking water. The body weight was measured weekly. The AI  
139 was obtained by the sum of epididymal, retroperitoneal, and visceral fat  
140 pad weights (total body fat) and calculated as follows: [body fat (g)/final  
141 weight (g)] × 100.

142

143

### 144 **2.3.2 Metabolic and hormonal analysis**

145 Blood glucose levels was measured in a blood drop using a  
146 handheld glucometer (Accu-Chek Performa. Roche Diagnostics Brazil  
147 Limited. SP. Brazil). To estimate insulin resistance, the homeostatic model  
148 assessment for insulin resistance (HOMA-IR) index was used and  
149 calculated by the following formula: fasting insulin ( $\mu\text{U/mL}$ )  $\times$  fasting  
150 glucose (mmol/L)/22.5. Insulin plasmatic levels were analyzed by an  
151 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (EMD Millipore  
152 Corporation. Billerica. MA. USA) according to the manufacturer's  
153 instructions and the reading was recorded using a microplate reader  
154 (Spectra Max 190. Molecular Devices®. Sunnyvale.CA. USA). Plasmatic  
155 triglycerides concentrations were measured using specific kits (BIOCLIN®.  
156 Belo Horizonte, MG, Brazil) and analyzed by a colorimetric-enzymatic  
157 method in an automatic enzymatic analyzer system (Chemistry Analyzer  
158 BS-200, MindrayMedical International Limited, Shenzhen, China).

159 To evaluate glucose tolerance by the oral glucose tolerance test  
160 (OGTT), the animals were fasted for 6 h at the 30<sup>th</sup> week of experiment.  
161 Blood samples from the tail tip were collected at baseline and after  
162 intraperitoneal administration of 30% glucose solution (Sigma-Aldrich®, St  
163 Louis, MO, USA), equivalent to 2.0 g/kg body weight. Blood samples were  
164 collected at 0 min (baseline) and after 15, 30, 60, 90 and 120 min of  
165 glucose infusion, and analyzed using a handheld glucometer (Accu-Chek  
166 Go Kit; Roche Diagnostic Brazil Ltda, Sao Paulo, Brazil). Glucose  
167 tolerance was assessed by the area under the curve (AUC) (18).

168

### 169 **2.3.3 Systolic blood pressure**

170 The systolic blood pressure (SBP) analysis was assessed in  
171 conscious rats by a non-invasive tail-cuff method with a  
172 NarcoBioSystems® Electro-Sphygmomanometer (International  
173 Biomedical, Austin, TX, USA). The animals were warmed in a wooden box



174 (50 × 40 cm) between 38 and 40°C for 4 min to stimulate arterial  
175 vasodilation. After this procedure, a cuff with a pneumatic pulse sensor  
176 was attached to the tail of the animal. The cuff was inflated to 200mmHg  
177 pressure and subsequently deflated. The arterial pulsations were recorded  
178 in a computerized data acquisition system (AcqKnowledge ® MP100.  
179 Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA). The average of three  
180 pressure readings was obtained for each animal (19).

181

#### 182 **2.4 $\gamma$ Oz bioavailability evaluation**

183 The presence of  $\gamma$ Oz was determined in heart and kidney tissue  
184 homogenate. To extract the compound, samples were mixed with  
185 chloroform/methanol CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (3 mL, 2:1, v/v) and 500 mL of saline  
186 8.5 g/L. Then the samples were centrifuged (2000 × g for 10 min) and the  
187 supernatant was collected and hexane was added. The chloroform and  
188 hexane layers were evaporated under nitrogen and the residue was  
189 resuspended in 150 mL of ethanol and sonicated for 30 s. 20  $\mu$ L of this  
190 aliquot was injected into the HPLC. The HPLC system was a Waters  
191 Alliance 2695 (Waters, Wilmington, MA, USA) and consisted of pump and  
192 chromatography bound to a 2996 programmable photodiode array  
193 detector, a C30 column (3 mm, 150 × 3 × 4.6 mm, YMC, Wilmington, MA,  
194 USA) and Empower 3 chromatography data software (Milford, MA, USA).  
195 The mobile phase consisted of ethanol/methanol/methyl-tert-butyl  
196 ether/water (83:15:2, v/v/v, 15 g/L with ammonium acetate in water,  
197 solvent A) and methanol/methyl-tert-butyl ether/water (8:90:2, v/v/v, 10 g/L  
198 with ammonium acetate in water, solvent B). The gradient procedure, at a  
199 flow rate of 1 mL/min (16 °C), was as follows: (1) 100% solvent A was  
200 used for 2 min followed by a 6 min linear gradient to 70% solvent A; (2) a 3  
201 min hold followed by a 10 min linear gradient to 45% solvent A; (3) a 2 min  
202 hold, then a 10 min linear gradient to 5% solvent A; (4) a 4 min hold, then a  
203 2 min linear gradient back to 100% solvent A.  $\gamma$ Oz was quantified at 330

204 nm by determining peaks areas under the curve of the chromatograms.  
205 The results are expressed in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , and correspond to the average of  
206 three consecutive injections per sample. All analyses were performed in  
207 triplicate.

208

## 209 **2.5 Renal and cardiac function**

210

### 211 **2.5.1 Renal function**

212 The function of kidneys was evaluated by protein/creatinine ratio  
213 and glomerular filtration rate (GFR). Plasmatic creatinine, urinary protein  
214 and creatinine were measured by colorimetric-enzymatic method in an  
215 automatic enzymatic analyzer system (Chemistry Analyzer BS-200,  
216 MindrayMedical International Limited, Shenzhen, China). The urinary flux  
217 was calculated by the urine volume (mL) per min in 24h. The GFR was  
218 obtained by the formula:  $\text{GFR} = (\text{urine creatinine} \times \text{flux})/\text{plasma creatinine}$ .  
219

### 220 **2.5.2 Echocardiographic study**

221 Doppler echocardiographic evaluation was performed by a single  
222 examiner using commercially available echocardiography (General Electric  
223 Medical Systems, Vivid S6, Tirat Carmel, Israel) equipped with a 5–  
224 11.5 MHz multifrequency ultrasonic transducer. Animals were anesthetized  
225 via intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (50 mg/kg) and  
226 xylazine hydrochloride (1 mg/kg). After trichotomy of the anterior chest  
227 region, the animals were placed in slight left lateral decubitus for the exam.  
228 For structural measurements of the heart, the images were obtained in  
229 one-dimensional mode (M-mode) guided by the images in two-dimensional  
230 mode with the transducer in the parasternal position, minor axis. Left  
231 ventricular (LV) evaluation was performed by positioning the cursor M-  
232 mode just below the mitral valve plane at the papillary muscles level. The  
233 images of the aorta and left atrium were obtained by positioning the M-

234 mode course to plan the aortic valve level. The following LV structural  
235 parameters were analyzed: LV mass and LV relative wall thickness (RWT).  
236 The LV systolic function was assessed by ejection fraction (EF), posterior  
237 wall shortening velocity (PWSV). The LV diastolic function was evaluated  
238 by early diastolic mitral inflow velocity (E wave), E wave deceleration time  
239 (EDT) (20).

240

## 241 **2.6 Proteomic profile**

242

### 243 **2.6.1 Tissue preparation**

244 LV or kidney aliquots (~50 mg) were homogenized in urea-rich  
245 protein extraction buffer (urea 6M in 50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, pH 8.5,  
246 and 1% of protease inhibitor) in 2.0-ml tubes prefilled with 0.5mm silica  
247 beads using BeadBug™ (three shaking cycles of 30s at 3500 rpm).  
248 Samples were centrifuged (10000xg, 30 min, at 4°C) and total protein  
249 concentration was checked by the Bradford assay. Then, the samples  
250 were diluted 1:10 in ammonium bicarbonate (25mM) and 20 µg of protein  
251 of the diluted solution was reduced with dithiothreitol (DTT) for 30 min at  
252 56°C (in thermomixer) and alkylated with 15mM iodoacetamide for 20 min  
253 at room temperature in the dark. After this, samples proteins were digested  
254 with trypsin 1:20 (enzyme:protein) overnight at 37 °C. Concentrated tryptic  
255 peptides were stored until further analysis at -20°C. Samples were  
256 analyzed in biological (7 animals/group) and three technical replicates.

257

### 258 **2.6.2 Shotgun proteomics followed by label-free quantification**

259 The analysis was performed by a Dionex Ultimate 3000 nano-LC  
260 system connected to an Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer  
261 equipped with a nano-electrospray ion source (Thermo Fisher Scientific,  
262 Hemel Hempstead, UK). Tryptic peptides were separated on an  
263 EASY-Spray 15 cm× 75 µm ID column packed with Thermo Scientific

264 Acclaim PepMap RSLC C18, 3  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$  particles. Mobile phases were  
265 0.1% formic acid in water (Solvent A) and 0.1% formic acid in  
266 water/acetonitrile, 2:8/v:v (Solvent B). The elution gradient consisted of  
267 4%–28% of B during 90 min and then 28%–40% in 10min, and 95% within  
268 the next 6min to rinse the column. The column was then re-equilibrated for  
269 20min. The total run time was 130min. The flow rate was 300 nl/min and  
270 the temperature was set at 35°C. Each sample was analyzed in three  
271 technical replicates. A blank sample was injected after each triplicate to  
272 avoid sample carryover. The operational m/z range to obtain MS spectra  
273 was set at 375–1500Da at 120.000 resolution. The collision energy was  
274 set at 35 eV and the system operated in a data-dependent mode. 3 s  
275 between each master scan.

276 The raw files obtained from the MS analyzer were processed by the  
277 software MaxQuant V1.6.6.0 (<https://maxquant.net/>) (Max Planck Institute  
278 of Biochemistry). The peak list was searched against the UniProt database  
279 of *Rattus norvegicus* (37.164 entries) to identify the proteins. Trypsin was  
280 the specified enzyme, carbamidomethylation of cysteine as a variable  
281 modification, and methionine oxidation as a fixed modification. A precursor  
282 mass tolerance of 20 ppm and the false discovery rate (FDR) was set at  
283 0.1%.

284 The quantitative analysis of the identified proteins was based on the  
285 label-free quantification (LFQ) intensities. The differential proteins  
286 expression and statistics were processed by Perseus V1.6.6.0  
287 (<https://maxquant.net/perseus/>) (Max Planck Institute of Biochemistry,  
288 Germany). The proteins LFQ intensities of the groups were analyzed by  
289 two-sided t test (false discovery rate [FDR] < 0.05) for each comparison  
290 (HSF vs Control and HSF + yOz vs HSF). The data from technical and  
291 biological replicates were analyzed by statistical correlation tests. For each  
292 analysis, the Pearson correlation coefficient was >0.98, attesting the  
293 accuracy of replicates. The protein expression was displayed in volcano

294 plot according to the statistical p-value and the difference of abundance  
295 (i.e., fold change). The fold-change established to consider the proteins  
296 differentially expressed was 1.5 and -1.5 for up and down-regulation,  
297 respectively.

298

### 299 **2.6.3 Proteomics bioinformatics**

300 The data were analyzed by the software Ingenuity Pathway Analysis  
301 (QIAGEN. USA) to identify biological processes associated with the  
302 differentially expressed proteins in the experimental groups.

303

### 304 **2.7 Statistical analysis**

305 Prior to further statistical analysis, all data were tested for normality  
306 by Shapiro-Wilk test and for homogeneity of variance using Levene's test.  
307 Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median  
308 (interquartile range). Differences between the groups were determined by  
309 one-way ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test or KruskalWallis  
310 followed by Dunn's *post-hoc* test. The differences were considered  
311 statistically significant when  $p < 0.05$ . The analyses were performed using  
312 SigmaPlot 12.0 for Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).  
313 Graphics were generated using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software  
314 Inc., San Diego, CA, USA).

315

## 316 **3 Results**

317 The exposure to the HSF diet induced obesity in the animals by  
318 increasing the final body weight and adiposity index. Adiposity index  
319 showed a 70% rise in the HSF group compared to Control. As expected,  
320 the caloric intake was higher in the both groups that received the diet. The  
321 diet also promoted disorders related to obesity in HSF group, as higher  
322 plasmatic triglycerides, blood glucose, glucose tolerance impairment,  
323 insulin, HOMA-IR and SBP levels than Control group (Table 2). The  $\gamma$ Oz

324 successfully prevented the rise of weight and adiposity even with high  
 325 caloric intake. The effect on triglycerides levels was observed as well. The  
 326 compound did not prevent the higher levels of blood glucose, insulin and  
 327 SBP, however  $\gamma$ Oz intervention was effective on attenuating the glucose  
 328 tolerance impairment (AUC) and insulin resistance (HOMA-IR).

329

330 **Table 2.** Nutritional profile and obesity complications assessment.

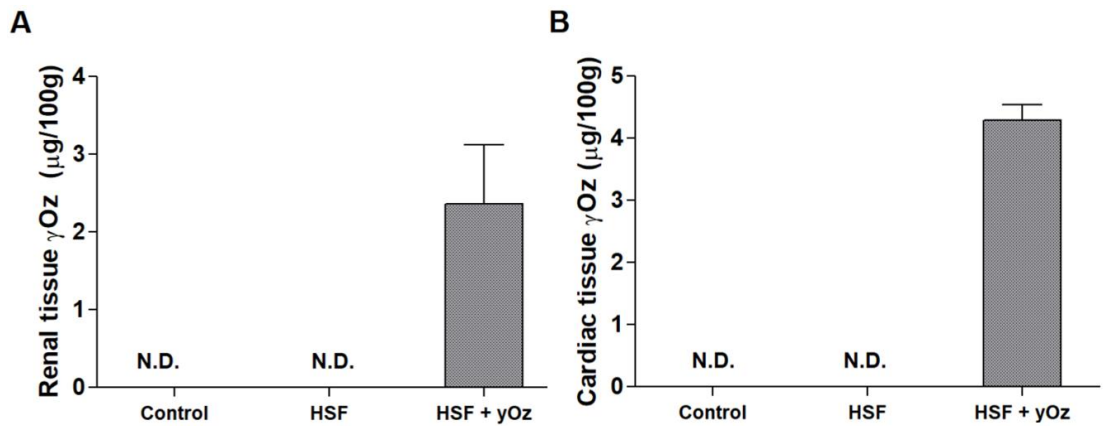
Variables	Groups		
	Control (n=7)	HSF (n=7)	HSF + $\gamma$ Oz (n=7)
Initial body weight (g)	179 $\pm$ 9.1	187 $\pm$ 3.5	179 $\pm$ 7.6
Final body weight (g)	464 $\pm$ 28.8	545 $\pm$ 64.3*	467 $\pm$ 64.3 <sup>&amp;</sup>
Chow intake (g/day)	23.6 $\pm$ 2.1	12.0 $\pm$ 1.4*	12.2 $\pm$ 1.9*
Water intake (g/day)	34.0 $\pm$ 4.6	42.8 $\pm$ 2.2*	41.8 $\pm$ 5.3*
Caloric intake (Kcal/day)	85.0 $\pm$ 7.5	96.8 $\pm$ 6.3*	97.8 $\pm$ 7.1*
Adiposity index (%)	4.5 $\pm$ 1.01	7.67 $\pm$ 1.1*	5.41 $\pm$ 0.65 <sup>&amp;</sup>
Triglycerides (mg/dl)	60.8 $\pm$ 13.8	118 $\pm$ 4.1*	82.6 $\pm$ 13.9 <sup>*&amp;</sup>
Blood glucose (mg/dl)	76.4 (46.0 – 88.0)	105 (89.0 – 123)*	89.0 (80 – 92)
AUC (mg/dL <sup>-1</sup> /min)	62,565 $\pm$ 18,842	131,876 $\pm$ 15,612*	106,030 $\pm$ 16,677 <sup>*&amp;</sup>
Insulin (ng/ml)	0.93 (0.82 – 1.0)	3.44 (3.0 – 4.0)*	2.40 (1.8 – 2.8)
HOMA-IR	6.5 $\pm$ 2.0	43.2 $\pm$ 7.8*	19.3 $\pm$ 5.2 <sup>&amp;</sup> *
SBP (mmHg)	120 $\pm$ 5.76	132 $\pm$ 5.92*	140 $\pm$ 8.45*

331 HSF: high sugar-fat;  $\gamma$ Oz: gamma-oryzanol; HOMA-IR: homeostatic model  
 332 assessment for insulin resistance and SBP: systolic blood pressure. Data  
 333 were expressed as mean  $\pm$  SD or median (interquartile range) compared  
 334 by one-way ANOVA followed Tukey post-hoc test or Kruskal Wallis  
 335 followed by Dunn's post-hoc test, respectively. p<0.05: \* vs Control; & vs  
 336 HSF.

337

338 The  $\gamma$ Oz bioavailability is shown in Figure 1. It is possible to verify  
 339 the presence of  $\gamma$ Oz in the both organs, as well as its absence in the  
 340 groups that did not receive the compound in the diet.

341



342

343 Figure 1. Presence of  $\gamma$ Oz in the target organs. (A) renal and (B) cardiac  
 344 tissue. N.D.: non-detectable; HSF: high sugar-fat. Data were expressed as  
 345 mean  $\pm$  SD (n=7/group).

346

347 The model induced changes in renal and cardiac function (Table 3).  
 348  $\gamma$ Oz prevented the renal dysfunction, characterized by higher  
 349 protein/creatinine ratio and GFR in HSF. Regarding cardiac function, HSF  
 350 group presented structural (hypertrophy) changes and systolic dysfunction,  
 351 although diastolic dysfunction was not observed. The preservation of  
 352 cardiac structure and function was achieved as an effect of  $\gamma$ Oz.

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366 **Table 3.** Renal and cardiac function.

Renal variables	Groups		
	Control (n=7)	HSF (n=7)	HSF + $\gamma$ Oz (n=7)
Protein/creatinine ratio	2.26 $\pm$ 0.53	3.15 $\pm$ 0.24*	2.55 $\pm$ 0.20 <sup>&amp;</sup>
GFR	2.74 (2.03 – 3.34)	1.40 (1.37 – 1.66)*	2.30 (2.26 – 2.38) <sup>&amp;</sup>
<b>Cardiac variables</b>			
HR (bpm)	232 $\pm$ 41.6	295 $\pm$ 29.1*	269 $\pm$ 55.7
LV mass (g)	0.75 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.08*	0.76 $\pm$ 0.09 <sup>&amp;</sup>
RWT	0.44 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.07*	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>&amp;</sup>
EF (%)	0.92 $\pm$ 0.01	0.89 $\pm$ 0.02*	0.92 $\pm$ 0.01 <sup>&amp;</sup>
PWSV (cm/s)	59.1 $\pm$ 3.02	50.7 $\pm$ 4.18*	61.1 $\pm$ 6.46 <sup>&amp;</sup>
E wave	70.2 $\pm$ 8.41	72.5 $\pm$ 3.90	73.8 $\pm$ 4.84
EDT (ms)	46.1 $\pm$ 3.18	51.7 $\pm$ 6.55	45.8 $\pm$ 5.30

367 HSF: high sugar-fat;  $\gamma$ Oz: gamma-oryzanol; HR: heart rate; LV: left  
368 ventriculum; RWT: LV relative wall thickness; EF: ejection fraction; PWSV:  
369 posterior wall shortening velocity (PWSV) and EDT: E wave deceleration  
370 time. Data were expressed as mean  $\pm$  SD or median (interquartile range)  
371 compared by one-way ANOVA followed Tukey *post-hoc* test or Kruskal  
372 Wallis followed by Dunn's *post-hoc* test, respectively.  $p < 0.05$ : \* vs Control;  
373 <sup>&</sup> vs HSF.

374

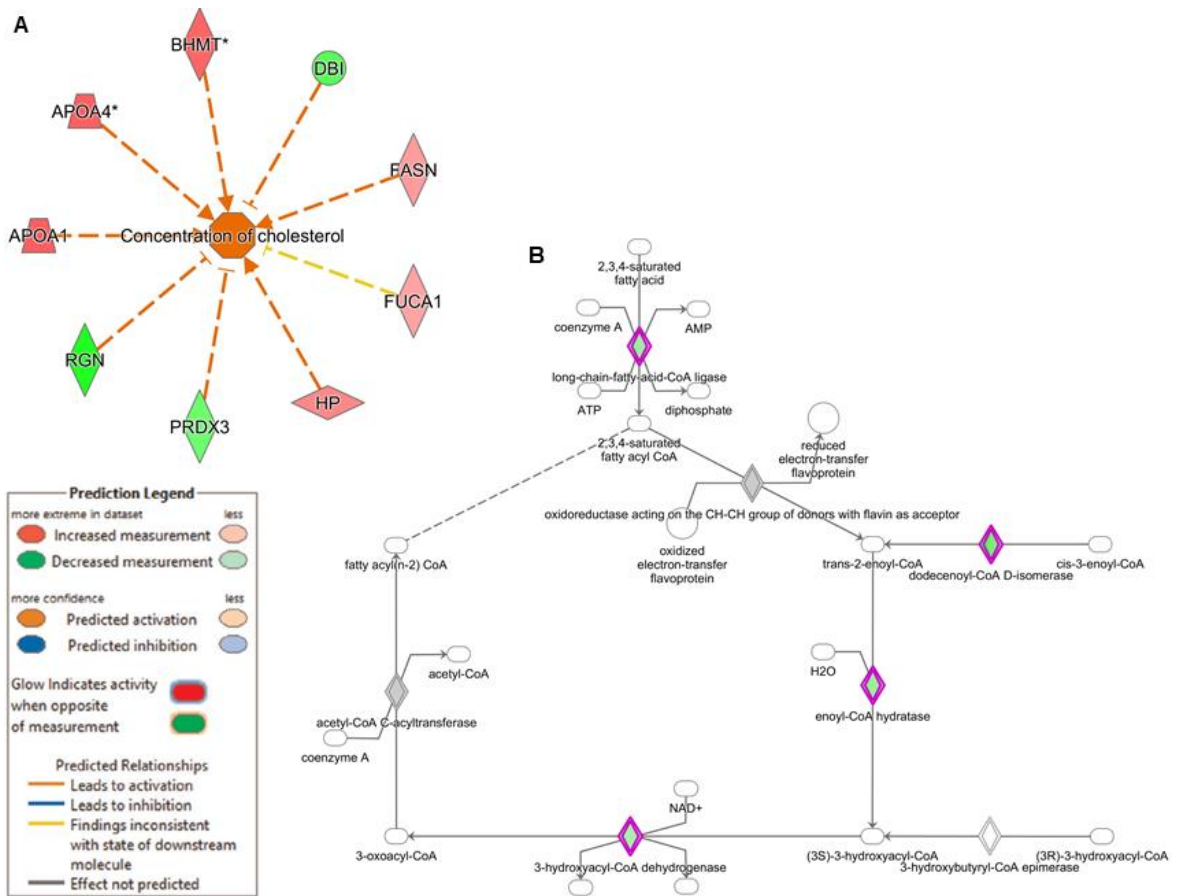
375 The label-free quantitative proteomic allowed the identification and  
376 quantification of 2535 proteins in renal tissue and, 1947 proteins in cardiac  
377 tissue. The comparison HSF vs Control presented 81 up-regulated and 87  
378 down-regulated proteins in renal tissue and the effect of  $\gamma$ Oz changed it  
379 into 156 up-regulated and 216 down-regulated. The cardiac tissue showed  
380 a remarkably high number of differentially expressed proteins, 351 up-  
381 regulated and 182 down-regulated in the comparison HSF vs Control. The  
382 HSF +  $\gamma$ Oz compared to HSF presented 200 up-regulated and 371 down-



383 regulated proteins. The pattern of differential expression of proteins for  
384 both tissue and for all the comparisons can be visualized by the volcano  
385 plot (Supplementary Figures S1 and S2).

386 The functional enrichment analysis revealed significant processes  
387 affected by CRMS and  $\gamma$ Oz effect, in both tissues. The HSF group showed  
388 changes in the expression of proteins related to concentration of  
389 cholesterol and  $\beta$ -oxidation in the kidney (Figure 2) and, changes in lipid  
390 synthesis, fibrosis pathway, cardiac contractility and oxidative fosforilation  
391 in the heart (Figure 3). The compound acted on the expression of protein  
392 associated with oxidative stress and up-regulateing proteins of  
393 mitochondrial electron transport chain in kidney (Figure 4), while in the  
394 heart prevented all the processes affected by the CRMS (Figure 5). To see  
395 the protein names related to each abbreviation, please check the  
396 supplementary tables (S1, S2, S3 and S4).

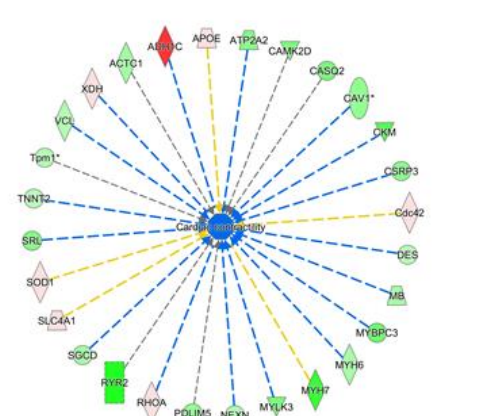
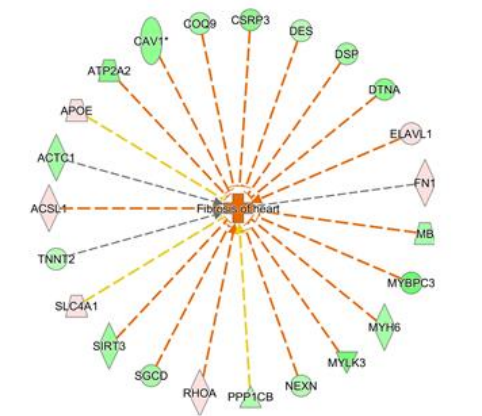
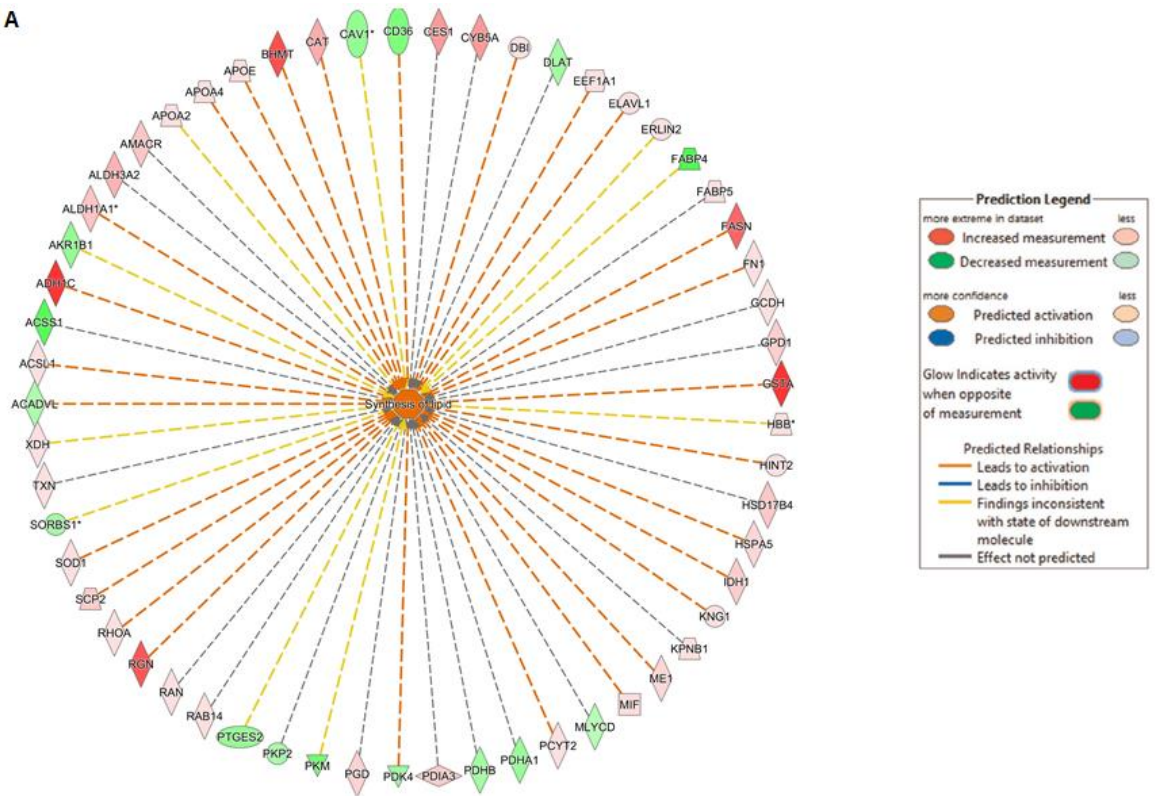
397



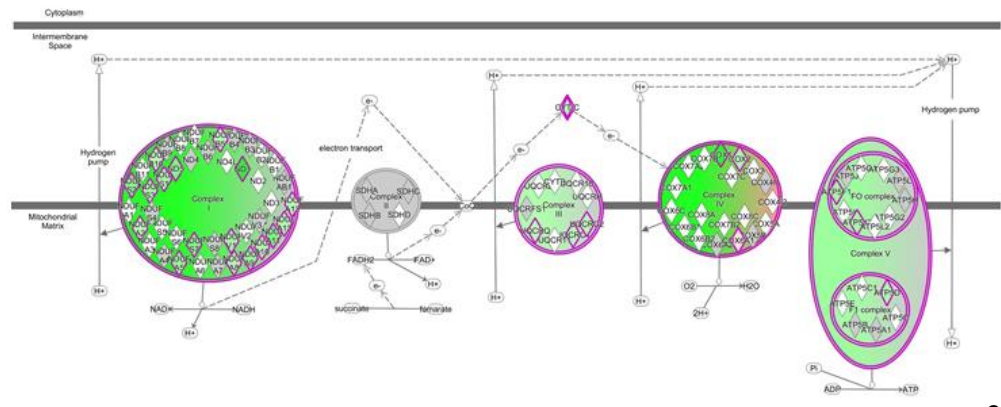
398  
399  
400  
401

**Figure 2.** Biological processes affected by CRMS in renal tissue. (A) concentration of cholesterol and (B)  $\beta$ -oxidation pathway. Up-regulated proteins are displayed in red and down-regulated in green.

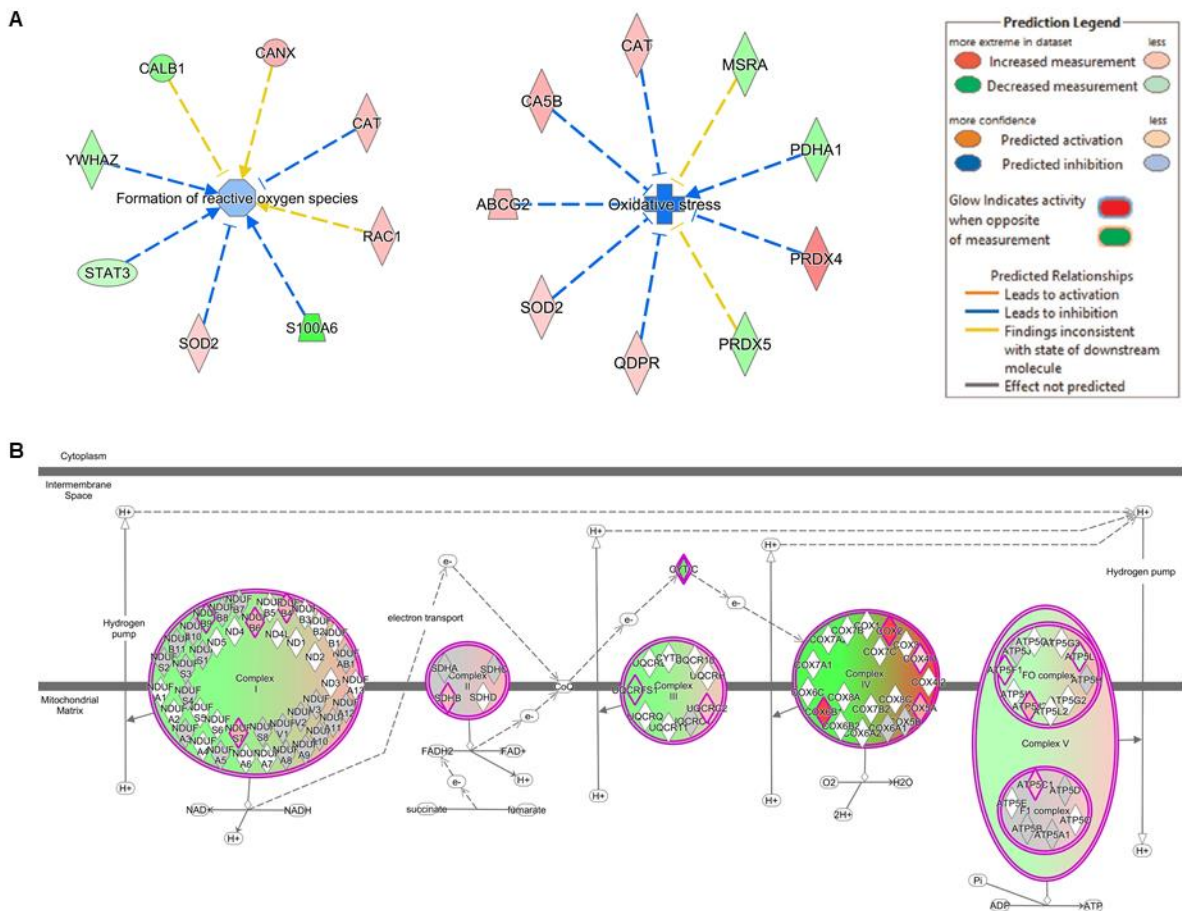
A



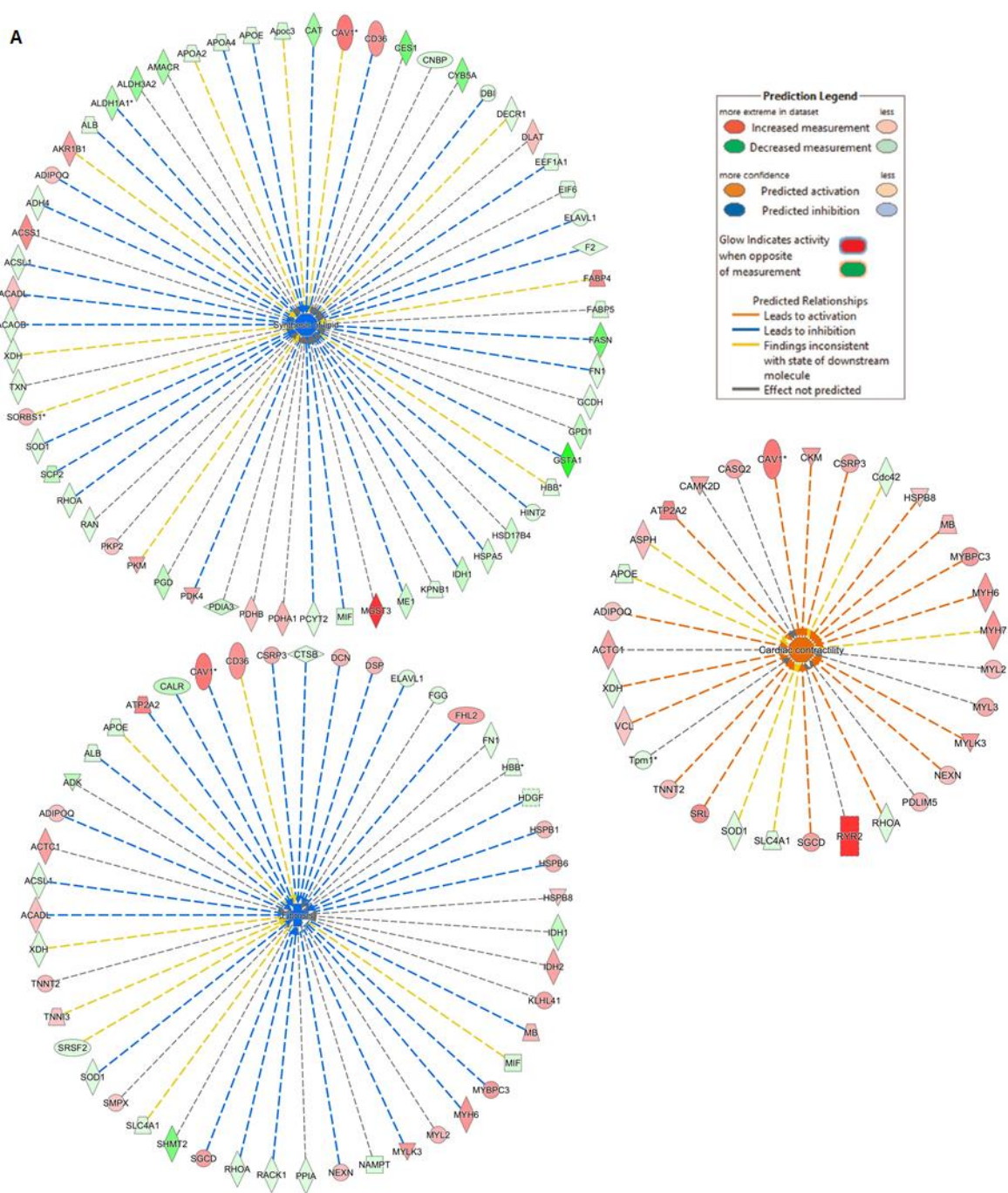
B



403 **Figure 3.** Biological processes affected by CRMS in cardiac tissue. (A)  
 404 lipid synthesis, fibrosis and cardiac contractility and (B) representation of  
 405 mitochondrial electron transport chain and the proteins involved in  
 406 oxidative fosforilation. Up-regulated proteins are displayed in red and  
 407 down-regulated in green.  
 408



409  
 410 **Figure 4.** Effect of  $\gamma$ Oz on biological processes in renal tissue. (A)  
 411 formation of reactive oxygen species and oxidative stress, (B)  
 412 representation of mitochondrial electron transport chain and the proteins  
 413 involved in oxidative fosforilation. Up-regulated proteins are displayed in  
 414 red and down-regulated in green.



416 **Figure 5.** Effect of  $\gamma$ Oz on biological processes in cardiac tissue. (A) lipid  
417 synthesis, fibrosis and cardiac contractility, (B) representation of  
418 mitochondrial electron transport chain and the proteins involved in  
419 oxidative fosforilation. Up-regulated proteins are displayed in red and  
420 down-regulated in green.

421

#### 422 **4 Discussion**

423 In recent years, alternatives therapies with bioactive compounds  
424 have been extensively investigated due its beneficial effects to health (21).  
425 The  $\gamma$ Oz features highlighted it as a potential agent to prevent and treat  
426 chronic diseases, especially the ones linked to metabolic disorders (22).  
427 The CRMS is a complex interaction in which heart and kidney are  
428 simultaneously affected by the obesity-related complications. The co-  
429 existence of dysfunction in both organs negatively affect morbidity and  
430 mortality (23). Proteomics is powerful approach that can reveal  
431 mechanisms involved in pathological processes, as well as targets for  
432 therapy (24). In this context, this study aimed to test the hypothesis that  
433  $\gamma$ Oz acts on the proteomic profile of the SMCR target organs, preventing  
434 the deleterious effect from the HSF diet. The results revealed that  $\gamma$ Oz  
435 prevented the CRMS development ameliorating obesity and the  
436 complications related protecting the target organs from the dysfunction by  
437 modulating a cluster of biological processes and proteins expression.

438 The excessive intake of a diet rich in sugar and fat exceeding  
439 energy expenditure leads to the expansion of adipose tissue and metabolic  
440 complications (25,26). The experimental model in this study promoted the  
441 increase of weight and adiposity, hypertriglyceridemia, hyperglycemia,  
442 glucose tolerance impairment, hyperinsulinemia, insulin resistance and  
443 hypertension, characterizing obesity and the risk factors for CRMS. The  
444 effect of  $\gamma$ Oz preveting obesity and hypertriglyceridemia is well known in  
445 the literature which reports the increase of fecal fat elimination and

446 decrease of intestinal absorption, contributing to lower adiposity gain and  
447 lipid profile changes (27). The compound was not effective in preventing  
448 the increase of blood glucose, insulin and SBP levels. Hyperglycemia and  
449 hyperinsulinemia is a direct effect of a high sugar diet. Although glucose  
450 and insulin levels remained elevated, the compound prevented the glucose  
451 tolerance impairment and insulin resistance. One of the insulin resistance  
452 mechanisms is the action of the pro-inflammatory cytokine tumoral necrosis  
453 factor alpha (TNF- $\alpha$ ) on the insulin receptor, impairing phosphorylation and  
454 signaling. The literature reports the anti-inflammatory effect of  $\gamma$ Oz  
455 preventing adipose tissue dysfunction and the chronic inflammation state,  
456 including the increase of TNF- $\alpha$  levels (28).

457 Hyperinsulinemia is pointed as a key factor to hypertension,  
458 increasing sympathetic nervous system (SNS) and renin-angiotensin-  
459 aldosterone activities leading to increased renal tubular sodium  
460 reabsorption, mechanisms that do not seem to be affected by  $\gamma$ Oz (29).

461 The renal and cardiac dysfunction induced by the model were  
462 prevented by  $\gamma$ Oz, despite the persistence of hypertension, a main  
463 aggressor and connecting factor in the pathophysiology of CRMS. Thus, it is  
464 possible to attribute the direct effect on the organs to the compound. A  
465 total of 2535 and 1947 proteins were quantified in renal and cardiac tissue,  
466 respectively and, there were several significant differentially expressed  
467 proteins. The changes observed in the proteomes of CRMS target organs  
468 and the effect of  $\gamma$ Oz reflects on the modulation of proteins associated with  
469 important biological processes.

470 The abnormal utilization of metabolic substrates by the organs in  
471 obesity condition is reported by literature (30,31). As expected, the HSF  
472 group presented upregulation of enzymes involved in lipid synthesis. The  
473 greater uptake of glucose and fructose by the cells and their catabolism  
474 generating acetyl-coenzyme A (CoA) is substrate for *de novo* lipogenesis  
475 (32). Upregulated in renal and cardiac tissue, Fatty acid synthase (FASN)

476 catalyzes the biogenesis of fatty acids from acetyl-CoA, leading fat storage  
477 and plays a central role in the pathogenesis of metabolic diseases  
478 connected to insulin resistance (33). In addition to upregulation of lipid  
479 synthesis, there was downregulation in kidney of long-chain-fatty-acid-CoA  
480 ligase (ACSL1), enoyl-CoA hydratase (ECHS1) and enoyl-CoA delta  
481 isomerase (ECI3), all three proteins of  $\beta$ -oxidation pathway and, several  
482 proteins of mitochondrial electron transport chain in heart (subunits of the  
483 complexes I, III, IV and V), indicating mitochondrial function impairment.  
484 Changes in fatty acid transport and uptake proteins and reduced  
485 mitochondrial function underlie the intracellular lipid accumulation in non-  
486 adipose tissue (34).

487 Lipotoxicity is an extremely harmful condition, characterized by the  
488 ectopic lipid accumulation and toxic lipid intermediates (palmitate,  
489 ceramides, and saturated non-esterified fatty acids) in the tissue  
490 parenchyma, promoting the increase of reactive oxygen species (ROS)  
491 production, lipid peroxidation, mitochondrial damage and tissue  
492 inflammation. As result, lipotoxicity induces cellular damage being  
493 detrimental to the function of both organ (30,35). The  $\gamma$ Oz acted preventing  
494 the lipid metabolism disturbance in heart and mainly the oxidative stress in  
495 renal tissue, conditions related to lipotoxicity.

496 In kidneys, the modulation of proteins related to oxidative stress  
497 includes the upregulation of antioxidant enzymes as catalase (CAT) and  
498 superoxide dismutase (SOD). The increase of antioxidant enzymes activity  
499 in kidney by  $\gamma$ Oz was previously reported in an obesity model (17). The  
500 antioxidant activity of the compound is demonstrated by the scavenging  
501 ROS and activation of nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway,  
502 an intrinsic mechanism of defence against oxidative stress which results in  
503 the induction of antioxidant response elements (ARE) genes transcription,  
504 as CAT and SOD enzymes (22,36,37). In the same tissue, it was observed  
505 the upregulation of subunits of all mitochondrial complexes, showing the



506 protective effect of the compound on proteins of mitochondrial function.

507         The preventive effect of  $\gamma$ Oz was very expressive in cardiac tissue  
508 evidenced by protection against fibrosis, contractility and mitochondrial  
509 impairment. Renal and cardiac tissue presented upregulation of the  
510 respiratory chain proteins. The mitochondrial dysfunction is defined as the  
511 incapacity of the mitochondria to generate and sustain ATP levels;  
512 however, it is also used to define maladaptative responses to metabolic  
513 perturbations, including changes in substrate catabolism, ROS production  
514 and apoptosis (38). The excess of nutrients supply can overwhelm the  
515 Krebs cycle and the mitochondrial respiratory chain, causing the  
516 mitochondrial dysfunction, and higher ROS formation leading to oxidative  
517 stress (38,39). The increase of ROS can compromise mitochondrial  
518 integrity releasing damage-associated molecular patterns which can also  
519 trigger inflammation (40).

520         Our results suggest that  $\gamma$ Oz acted directly in the CRMS target  
521 organs modulating proteins associated with oxidative stress and the  
522 mitochondrial function. Consistent with these findings, it was reported the  
523 effect of rice bran extract in improving mitochondrial dysfunction in models  
524 of age-related neurodegenerative diseases and the effect of the isolated  
525 compound it was expected, however theoretical in obesity-related  
526 complications (40-42).

527         In the present study, obese animals developed renal and cardiac  
528 dysfunction featuring the CRMS and related complications. This disease is  
529 a highly complex interaction integrating many factors and the magnitude of  
530 differentially expressed proteins was extensive. Considering this  
531 panorama, it is clear that the pathophysiological process happens  
532 differently in each organ according to its particularities, as well as its  
533 adaptive responses and the evolution of kidney and heart disease. The  
534 proteomic profiling of CRMS target organs revealed a cluster of biological  
535 processes on which  $\gamma$ Oz acted, and common key points were found. This

536 study also provide basis for further studies to explore these hallmarks  
537 aiming therapeutics purposes.

538

## 539 **5 Conclusion**

540 This data allows us to conclude that yOz can be considered a  
541 potential protective agent for CRMS, as it prevented changes in the kidney  
542 and heart proteome related to oxidative stress and mitochondrial function,  
543 key mechanisms for the development of the disease.

544

545 **Funding:** This work was financially supported by the São Paulo Research  
546 Foundation –FAPESP (grant 2018/15294-3). Coordenação de  
547 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (process number  
548 88887.466951/2019-00) and National Council for Scientific and  
549 Technological Development – CNPq (grant 167750/2018-6)

550

## 551 **References**

552

- 553 1 Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev*  
554 *Endocrinol.* 2019;15(5):288–98.
- 555 2 World Health Organization. Fact sheets: obesity and overweight  
556 [Internet]. Geneva: WHO; 2021 [citado 27 Set 2021]. Disponível em:  
557 [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight)  
558 [overweight](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight)
- 559 3. Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden.  
560 *Am J Manag Care.* 2016 Jun;22(7 Suppl):s176-85.
- 561 4. Mehrabani J. Overweight and Obesity: A Brief Challenge on  
562 Prevalence, Complications and Physical Activity among Men and  
563 Women. *Women’s Health.* 2018 Jan 17;7(1).
- 564 5. Whaley-Connell A, Sowers JR. Basic science: Pathophysiology: the  
565 cardiorenal metabolic syndrome. *J Am Soc Hypertens.* 2014

- 566 Aug;8(8):604–6.
- 567 6. Chaudhary K, Malhotra K, Sowers J, Aroor A. Uric acid-key  
568 ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome.  
569 CardioRenal Med. 2013;3(3):208–20.
- 570 7. Masuzaki H, Kozuka C, Okamoto S, Yonamine M, Tanaka H,  
571 Shimabukuro M. Brown rice-specific  $\gamma$ -oryzanol as a promising  
572 prophylactic avenue to protect against diabetes mellitus and obesity  
573 in humans. J Diabetes Investig. 2019 Jan;10(1):18–25.
- 574 8. Młodzińska-Michta E, Korzeniowska W. Gamma-oryzanol as an  
575 example of a complex of phytosterol esters and ferulic acid with  
576 broad biological activity. Postepy Biochem. 2021;67(3):205–11.
- 577 9. Ramazani E, Akaberi M, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Biological  
578 and Pharmacological Effects of Gamma-oryzanol: An Updated  
579 Review of the Molecular Mechanisms. Curr Pharm Des.  
580 2020;27(19):2299–316.
- 581 10. Francisqueti F, Minatel I, Ferron A, Bazan S, Silva V, Garcia J, et al.  
582 Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent  
583 Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals Submitted to High  
584 Sugar-Fat Diet. Nutrients. 2017;9(12):1299.
- 585 11. Cifani P, Kentsis A. Towards comprehensive and quantitative  
586 proteomics for diagnosis and therapy of human disease.  
587 Proteomics. 2017;17(1–2).
- 588 12. Choi J-W, Wang X, Joo JI, Kim DH, Oh TS, Choi DK, et al. Plasma  
589 proteome analysis in diet-induced obesity-prone and obesity-  
590 resistant rats. Proteomics. 2010 Dec;10(24):4386–400.
- 591 13. Kim EY, Kim WK, Oh K-J, Han BS, Lee SC, Bae K-H. Recent  
592 advances in proteomic studies of adipose tissues and adipocytes.  
593 Int J Mol Sci. 2015 Feb 27;16(3):4581–99.
- 594 14. Vileigas DF, Harman VM, Freire PP, Marciano CLC, Sant’Ana PG,  
595 de Souza SLB, et al. Landscape of heart proteome changes in a

- 596 diet-induced obesity model. *Sci Rep.* 2019;9(1):18050.
- 597 15. Zembroski AS, Buhman KK, Aryal UK. Proteome and  
598 phosphoproteome characterization of liver in the postprandial state  
599 from diet-induced obese and lean mice. *J Proteomics.*  
600 2021;232:104072.
- 601 16. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG.  
602 Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines  
603 for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):6–10.
- 604 17. Francisqueti FV, Junio A, Ferron T, Hasimoto FK, Henrique P, Alves  
605 R, et al. Gamma Oryzanol Treats Obesity-Induced Kidney Injuries  
606 by Modulating the Adiponectin Receptor 2 / PPAR-  $\alpha$  Axis.  
607 2018;2018.
- 608 18. De Mattei L, Francisqueti-Ferron FV, Garcia JL, Ferron AJT, Silva  
609 CCVA, Gregolin CS, et al. Antioxidant and anti-inflammatory  
610 properties of gamma-oryzanol attenuates insulin resistance by  
611 increasing GLUT- 4 expression in skeletal muscle of obese animals.  
612 *Mol Cell Endocrinol.* 2021;537:111423.
- 613 19. Santos PP Dos, Rafacho BPM, Gonçalves ADF, Jaldin RG,  
614 Nascimento TB Do, Silva MAB, et al. Vitamin D Induces increased  
615 systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical  
616 properties. *PLoS One.* 2014;9(6):1–9.
- 617 20. Vileigas DF, Marciano CL de C, Mota GAF, Souza SLB de,  
618 Sant'Ana PG, Okoshi K, et al. Temporal Measures in Cardiac  
619 Structure and Function During the Development of Obesity Induced  
620 by Different Types of Western Diet in a Rat Model. *Nutrients.* 2019  
621 Dec 26;12(1):68.
- 622 21. González S. Dietary Bioactive Compounds and Human Health and  
623 Disease. *Nutrients.* 2020 Jan 29;12(2):348.
- 624 22. Minatel IO, Francisqueti FV, Corrêa CR, Pereira Lima GP.  
625 Antioxidant activity of  $\gamma$ -oryzanol: A complex network of interactions.

- 626 Int J Mol Sci. 2016;17(8).
- 627 23. Song MK, Davies NM, Roufogalis BD, Huang TH-W. Management of  
628 Cardiorenal Metabolic Syndrome in Diabetes Mellitus: A  
629 Phytotherapeutic Perspective. J Diabetes Res. 2014;2014:1–12.
- 630 24. Moulder R, Schwartz D, Goodlett DR, Dayon L. Proteomics of  
631 Diabetes, Obesity, and Related Disorders. PROTEOMICS - Clin  
632 Appl. 2018 Jan;12(1):1600134.
- 633 25. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et  
634 al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-  
635 Associated Metabolic Complications. Int J Mol Sci. 2019 May  
636 13;20(9).
- 637 26. Jung UJ, Choi M-S. Obesity and its metabolic complications: the role  
638 of adipokines and the relationship between obesity, inflammation,  
639 insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease.  
640 Int J Mol Sci. 2014 Apr 11;15(4):6184–223.
- 641 27. Bhaskaragoud G, Rajath S, Mahendra VP, Kumar GS, Gopala  
642 Krishna AG, Kumar GS. Hypolipidemic mechanism of oryzanol  
643 components- ferulic acid and phytosterols. Biochem Biophys Res  
644 Commun. 2016 Jul;476(2):82–9.
- 645 28. Francisqueti-Ferron FV, Garcia JL, Ferron AJT, Nakandakare- Maia  
646 ET, Gregolin CS, Silva JP das C, et al. Gamma-oryzanol as a  
647 potential modulator of oxidative stress and inflammation via PPAR- $\gamma$   
648 in adipose tissue: a hypothetical therapeutic for cytokine storm in  
649 COVID-19? Mol Cell Endocrinol. 2021 Jan;520:111095.
- 650 29. Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D,  
651 et al. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular  
652 risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the  
653 American Society of Hypertension. J Clin Hypertens. 2013  
654 Jan;15(1):14–33.
- 655 30. Sletten AC, Peterson LR, Schaffer JE. Manifestations and

- 656 mechanisms of myocardial lipotoxicity in obesity. *J Intern Med.* 2018  
657 Nov;284(5):478–91.
- 658 31. Gai Z, Wang T, Visentin M, Kullak-Ublick GA, Fu X, Wang Z. Lipid  
659 Accumulation and Chronic Kidney Disease. *Nutrients.* 2019 Mar  
660 28;11(4).
- 661 32. Song Z, Xiaoli A, Yang F. Regulation and Metabolic Significance of  
662 De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients.* 2018 Sep  
663 29;10(10):1383.
- 664 33. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Ortega FJ, Fernandez-Real JM.  
665 Fatty Acid Synthase: Association with Insulin Resistance, Type 2  
666 Diabetes, and Cancer. *Clin Chem.* 2009;55(3):425–38.
- 667 34. Engin AB. What Is Lipotoxicity?. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:197-  
668 220.
- 669 35. Opazo-Ríos L, Mas S, Marín-Royo G, Mezzano S, Gómez-Guerrero  
670 C, Moreno JA, et al. Lipotoxicity and Diabetic Nephropathy: Novel  
671 Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci.*  
672 2020 Apr 10;21(7).
- 673 36. Rungratanawanich W, Abate G, Serafini MM, Guarienti M,  
674 Catanzaro M, Marziano M, et al. Characterization of the Antioxidant  
675 Effects of  $\gamma$ -Oryzanol: Involvement of the Nrf2 Pathway. *Oxid Med*  
676 *Cell Longev.* 2018;2018:2987249.
- 677 37. Sari YP, Santoso U, Supriyadi, Raharjo S. Determination of singlet  
678 oxygen quenching rate and mechanism of  $\gamma$ -oryzanol. *Heliyon.*  
679 2021;7(5):e07065.
- 680 38. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial  
681 dysfunction in obesity. *Life Sci.* 2018;192:26–32.
- 682 39. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of  
683 Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metab.*  
684 2013;17(4):491–506.
- 685 40. Hagl S, Grewal R, Ciobanu I, Helal A, Khayyal MT, Muller WE, et al.

686 Rice bran extract compensates mitochondrial dysfunction in a  
687 cellular model of early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*  
688 2015;43(3):927–38.

689 41. Hagl S, Berresse D, Grewal R, Sus N, Frank J, Eckert GP. Rice  
690 bran extract improves mitochondrial dysfunction in brains of aged  
691 NMRI mice. *Nutr Neurosci.* 2016;19(1):1–10.

692 42. Hagl S, Kocher A, Schiborr C, Eckert SH, Ciobanu I, Birringer M, et  
693 al. Rice bran extract protects from mitochondrial dysfunction in  
694 guinea pig brains. *Pharmacol Res.* 2013 Oct;76:17–27.

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718 **Effect of gamma-oryzanol on the proteome profile of the target**  
719 **organs of cardiorenal metabolic syndrome in obesity model**

720

721 Jéssica Leite Garcia <sup>1,\*</sup>, Alfonsina D'Amato <sup>2</sup>, Fabiane Valentini  
722 Francisqueti-Ferron, Cristina Schmitt Gregolin<sup>1</sup>, Silmeia Garcia Zanati  
723 Bazan, Artur Junio Togneri Ferron <sup>1</sup>, Fernando Moreto <sup>1</sup>, Igor Otavio  
724 Minatel <sup>3</sup>, Giancarlo Aldini <sup>2</sup>, Camila Renata Correa<sup>1</sup>

725

726 <sup>1</sup> Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP),  
727 Botucatu, SP, Brazil

728 <sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Milan, Italy

729 <sup>3</sup> Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São  
730 Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

731

732

733

734

## 735 **Supplementary information**

736

737

738

739

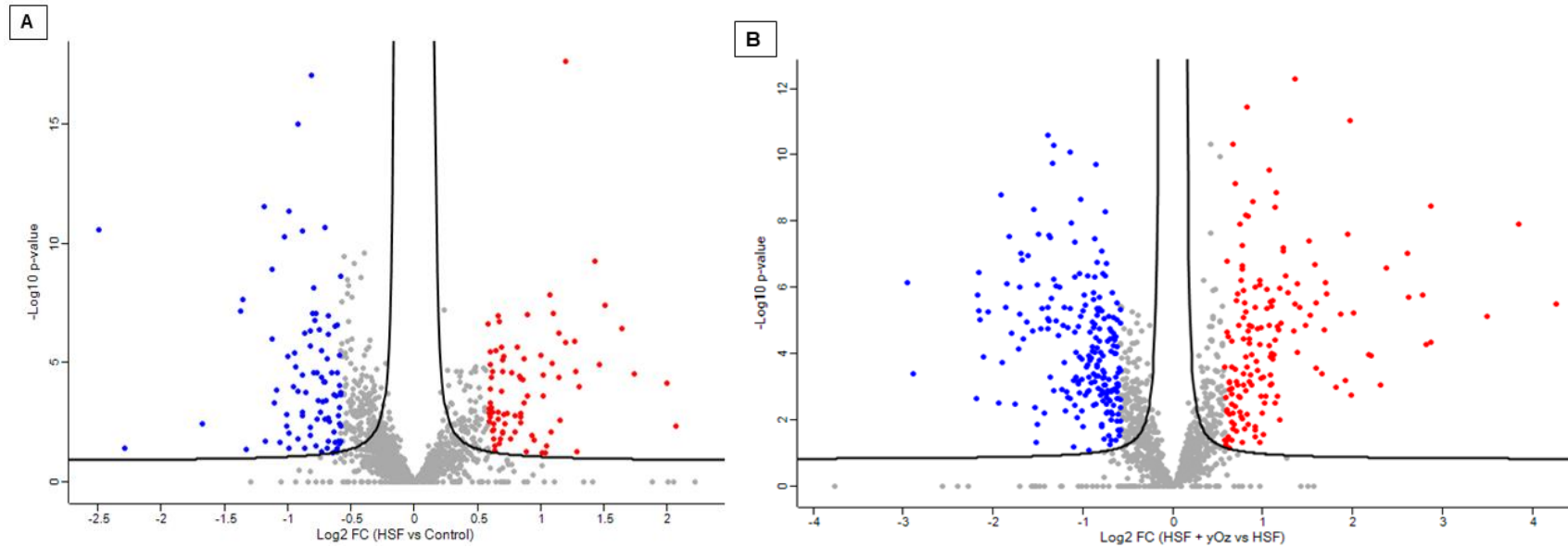
740

### 741 **Supplementary figures and tables**

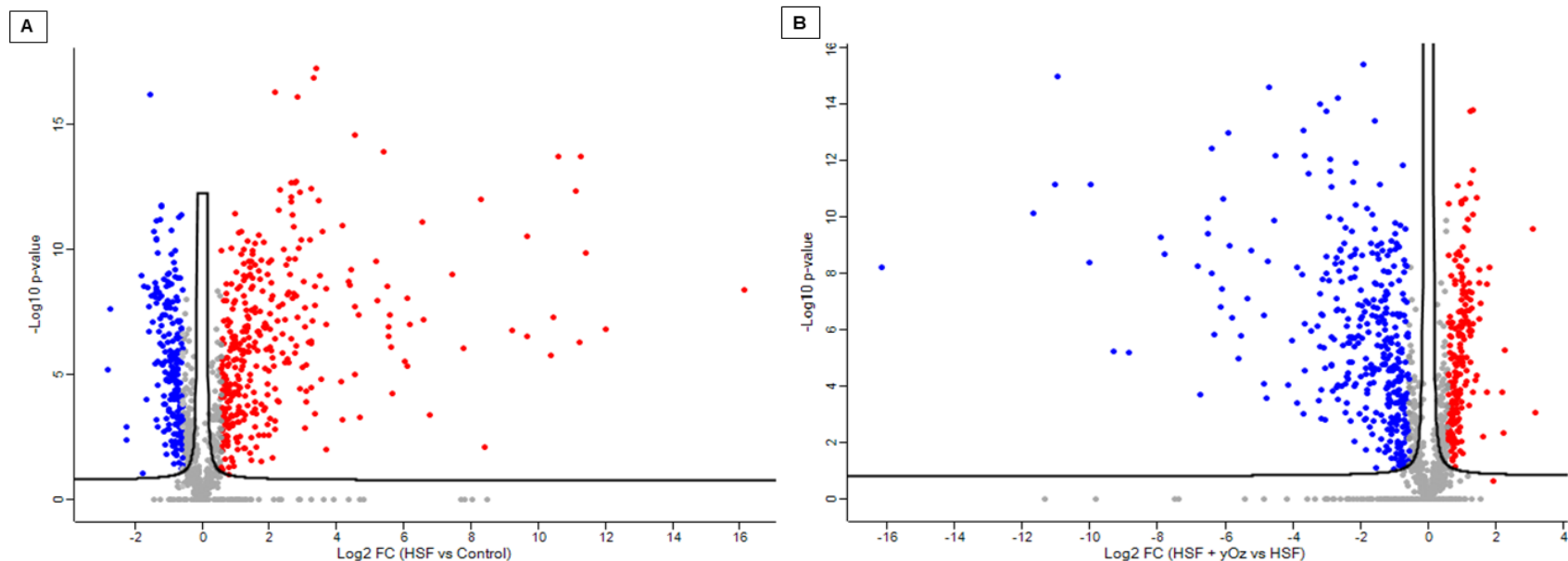
742

743 The pattern of differential expression of proteins for renal tissue is  
744 presented in Figure S1 and for cardiac tissue in Figure S2. The  
745 supplementary tables S1, S2, S3 and S4 show the list of proteins related to  
746 each biological process for each tissue and group comparison.





**Figure S1.** Differentially expressed proteins in CRMS in renal tissue. (A) HSF x Control group and (B) HSF +  $\gamma$ Oz x HSF group. FC: fold change; HSF: high sugar-fat and  $\gamma$ Oz: gamma-oryzanol. The volcano plot presents the statistical difference ( $\log_{10}$  p-value) and the difference of abundance ( $\log_2$  fold change) for each group comparison. The  $\log_2$  FC was  $<-0.58$  and  $>0.58$  for up and down-regulation, respectively. Red dots represent up-regulated proteins and blue dots represent down-regulated.



**Figure S2.** Differentially expressed proteins in CRMS in cardiac tissue. (A) HSF x Control group and (B) HSF +  $\gamma$ Oz x HSF group. FC: fold change; HSF: high sugar-fat and  $\gamma$ Oz: gamma-oryzanol. The volcano plot presents the statistical difference ( $\text{log}_{10}$  p-value) and the difference of abundance ( $\text{log}_2$  fold change) for each group comparison. The  $\text{log}_2$  FC was  $<-0.58$  and  $>0.58$  for up and down-regulation, respectively. Red dots represent up-regulated proteins and blue dots represent down-regulated.

**Table S1.** Differentially proteins expressed in biological processes affected by CRMS in renal tissue.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Concentration of cholesterol</b>	Apoa1	Apolipoprotein A-1
	Apoa4	Apolipoprotein A-4
	Bhmt	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1
	Dbi	Acyl-CoA-binding protein
	Fasn	Fatty acid synthase
	Fuca1	Alpha-L-fucosidase 1
	Hp	Haptoglobin
Rgn	Regucalcin	
<b><math>\beta</math>-oxidation</b>	Acs11	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1
	Ech1	Enoyl-CoA delta isomerase
	Echs1	Enoyl-CoA hydratase
	Had	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase

**Table S2.** Differentially proteins expressed in biological processes affected by CRMS in cardiac tissue.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Lipid sythesis</b>	Acadvl	Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase
	Acs1	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1
	Acss1	Acetyl-coenzyme A synthetase
	Adh1c	Aldehyde dehydrogenase
	Akr1b1	Aldose reductase
	Aldh1a1	Retinal dehydrogenase 1
	Aldh3a2	Fatty aldehyde dehydrogenase
	Amacr	Alpha-methylacyl-CoA racemase
	Apoa2	Apolipoprotein A-2
	Apoa4	Apolipoprotein A-4
	Apoe	Apolipoprotein E
	Bhmt	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1
	Cat	Catalase
	Cav1	Caveolin-1
	Cd36	Platelet glycoprotein 4
	Ces1	Carboxylic ester hydrolase
	Cyb5a	Cytochrome b5
	Dbi	Acyl-CoA-binding protein
	Dlat	Dihydrolipoyl transacetylase
	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha
	Elav1	ELAV-like protein
	Erlin2	Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2
	Fabp4	Fatty acid-binding protein 4
	Fabp5	Fatty acid-binding protein 5
	Fasn	Fatty acid synthase
	Fn1	Fibronectin
	Gcdh	Glutaryl-CoA dehydrogenase
	Gpd1	Isocitrate dehydrogenase

**Table S2.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Lipid sythesis</b>	Gsta	Glutathione S-transferase
	Hbb	Hemoglobin Subunit Beta
	Hint2	Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 2
	Hsd17b4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2
	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein
	Idh1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
	Kng1	Kininogen-1
	Kpnb1	Importin subunit beta-1
	Me1	Malic enzyme
	Mif	Macrophage migration inhibitory factor
	Mlycd	Malonyl-CoA decarboxylase
	Pcyt2	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase
	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase subunit alpha
	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase subunit beta
	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3
	Pdk4	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4
	Pgd	6-phosphogluconate dehydrogenase
	Pkm	Pyruvate kinase
	Pkp2	Plakophilin 2
	Ptges2	Prostaglandin E synthase 2
	Rab14	Ras-related protein Rab-14
	Ran	GTP-binding nuclear protein Ran
	Rgn	Regucalcin
	Rhoa	Transforming protein RhoA
	Scp2	Non-specific lipid-transfer protein
	Sod1	Superoxide dismutase 1
Sorbs1	Sorbin	
Txn	Thioredoxin	

**Table S2.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Fibrosis of heart</b>	Acs1	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1
	Actc1	Actin
	Apoe	Apolipoprotein E
	Atp2a2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
	Cav1	Caveolin-1
	Coq9	Ubiquinone biosynthesis protein
	Csrp3	Cysteine and glycine-rich protein 3
	Des	Desmin
	Dsp	Desmoplakin
	Dtna	Dystrobrevin Alpha
	Elav1	ELAV-like protein
	Fn1	Fibronectin
	Mb	Myoglobin
	Mybpc3	Myosin-binding protein C
	Myh6	Apha-myosin heavy chain
	Mylk3	Myosin light chain kinase 3
	Ppp1cb	Serine/threonine-protein
	Rhoa	Transforming protein RhoA
	Sgcd	Sarcoglycan delta
	Sirt3	Sirtuin-3
Slc4a1	Anion exchange protein	
Tnnt2	Troponin T	
<b>Cardiac contractility</b>	Actc1	Actin
	Adh1c	Aldehyde dehydrogenase
	Apoe	Apolipoprotein E
	Atp2a2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
	Camk2d	Calmodulin-dependent protein kinase

**Table S2.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Cardiac contractility</b>	Casq2	Calsequestrin-2
	Cav1	Caveolin-1
	Ckm	Creatine kinase
	Csrp3	Cysteine and glycine-rich protein 3
	Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
	Des	Desmin
	Mb	Myoglobin
	Mybpc3	Myosin-binding protein C
	Myh6	Apha-myosin heavy chain
	Myh7	Myosin-7
	Mylk3	Myosin light chain kinase 3
	Rhoa	Transforming protein RhoA
	Ryr2	Ryanodine receptor 2
	Sgcd	Sarcoglycan delta
	Slc4a1	Anion exchange protein
	Sod1	Superoxide dismutase
	Srl	Sarcalumenin
	Tnnt2	Troponin T
	Tpm1	Tropomyosin alpha-1 chain
Vcl	Vinculin	
Xdh	Xanthine oxidase	
<b>Mitochondrial respiration</b>	Atp5d	ATP synthase subunit delta
	Atp5g1	ATP synthase lipid-binding protein
	Atp5j2	ATP synthase subunit f
	Mt-Co1	Cytochrome c oxidase subunit 1
	Mt-Co2	Cytochrome c oxidase subunit 2

**Table S2.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Mitochondrial respiration</b>	Cox6a1	Cytochrome c oxidase subunit 6A1
	Nd1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1
	Nd5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5
	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10
	Ndufa11	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11
	Ndufa12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12
	Ndufa13	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13
	Ndufa2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2
	Ndufa5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5
	Ndufa8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8
	Ndufa9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9
	Ndufb5	Complex I-SGDH
	Ndufs1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 1
	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2
	Ndufs3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3
	Ndufs7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7
	Ndufv1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1
	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2
	Uqcrq	Cytochrome b-c1 complex subunit 8



**Table S3.** Effect of  $\gamma$ Oz differentially proteins expressed in renal tissue.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Formation of reactive oxygen species</b>	Calb1	Calbindin
	Canx	Calnexin
	Cat	Catalase
	Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
	S100a6	Protein S100-A6
	Sod2	Superoxide dismutase 2
	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	
<b>Oxidative stress</b>	Abcg2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
	Ca5b	Carbonic anhydrase 5B
	Cat	Catalase
	Msra	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase
	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha
	Prdx4	Peroxiredoxin-4
	Prdx5	Peroxiredoxin-5
	Qdpr	Dihydropteridine reductase
	Sod2	Superoxide dismutase 2
<b>Mitochondrial respiration</b>	Atp5c1	ATP synthase subunit gamma
	Atp5i	ATP synthase subunit e
	Atp5j2	ATP synthase subunit f
	Atp5l	ATP synthase subunit g
	Mt-Cox2	Cytochrome c oxidase subunit 2
	Cox4i1	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1
	Cox5a	Cytochrome c oxidase subunit 5A
	Cox6b1	Cytochrome c oxidase subunit 6B1
	Cytc	Cytochrome c
	Ndufb6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6
Ndufb9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	

**Table S3.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Mitochondrial respiration</b>	Ndufs7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7
	Sdhb	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit
	Uqcrc2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2
	Uqcrcs1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske

**Table S4.** Effect of  $\gamma$ Oz differentially proteins expressed in cardiac tissue.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Lipid sythesis</b>	Acacb	Acetyl-CoA carboxylase beta
	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase
	Acs1	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1
	Acss1	Acetyl-coenzyme A synthetase
	Adh4	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase
	Adipoq	Adiponectin
	Akr1b1	Aldose reductase
	Alb	Albumin
	Aldh1a1	Retinal dehydrogenase 1
	Aldh3a2	Fatty aldehyde dehydrogenase
	Amacr	Alpha-methylacyl-CoA racemase
	Apoa2	Apolipoprotein A-2
	Apoa4	Apolipoprotein A-4
	ApoE	Apolipoprotein E
	Cat	Catalase
	Cav1	Caveolin-1
	Cd36	Platelet glycoprotein 4
	Ces1	Carboxylic ester hydrolase
	Cnbp	Cellular nucleic acid-binding protein
	Cyb5a	Cytochrome b5
	Dbi	Acyl-CoA-binding protein
	Decr1	2,4-dienoyl-CoA reductase
	Dlat	Dihydrolipoyl transacetylase
	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha
	Eif6	Eukaryotic translation initiation factor 6
	Elavl1	ELAV-like protein
	F2	Prothrombin
	Fabp4	Fatty acid-binding protein 4
	Fabp5	Fatty acid-binding protein 5

**Table S4.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Lipid synthesis</b>	Fasn	Fatty acid synthase
	Fn1	Fibronectin
	Gcdh	Glutaryl-CoA dehydrogenase
	Gpd1	Isocitrate dehydrogenase
	Gsta1	Glutathione S-transferase
	Hbb	Hemoglobin Subunit Beta
	Hint2	Histidine Triad Nucleotide Binding Protein 2
	Hsd17b4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2
	Hspa5	78 kDa glucose-regulated protein
	Idh1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
	Me1	Malic enzyme
	Mgst3	Microsomal glutathione S-transferase 3
	Mif	Macrophage migration inhibitory factor
	Pcyt2	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase
	Pdha1	Pyruvate dehydrogenase subunit alpha
	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase subunit beta
	Pdia3	Protein disulfide-isomerase A3
	Pdk4	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4
	Pgd	6-phosphogluconate dehydrogenase
	Pkm	Pyruvate kinase
	Pkp2	Plakophilin 2
	Ran	GTP-binding nuclear protein Ran
	Rhoa	Transforming protein RhoA
	Scp2	Non-specific lipid-transfer protein
	Sod1	Superoxide dismutase 1
	Sorbs1	Sorbin
Txn	Thioredoxin	
Xdh	<b>Xanthine oxidase</b>	

**Table S4.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Fibrosis</b>	Acadl	<b>Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase</b>
	Acs1	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1
	Actc1	Actin
	Adipoq	Adiponectin
	Adk	Adenosine kinase
	Alb	Albumin
	Apoe	Apolipoprotein E
	Atp2a2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
	Calr	Calreticulin
	Cav1	Caveolin-1
	Cd36	Platelet glycoprotein 4
	Csrp3	Cysteine and glycine-rich protein 3
	Ctsb	Cathepsin B
	Dcn	Decorin
	Dsp	Desmoplakin
	Elav1	ELAV-like protein
	Fgg	Fibrinogen gamma chain
	Fhl2	Four and a half LIM domains protein 2
	Fn1	Fibronectin
	Hbb	Beta-globin
	Hdgf	Heparin-binding protein
	Hspb1	Heat shock protein beta-1
	Hspb6	Heat shock protein beta-6
	Hspb8	Heat shock protein beta-8
	Idh1	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1
	Idh2	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 2
	Klhl41	Kelch-like protein 41

**Table S4.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Fibrosis</b>	Mb	Myoglobin
	Mif	Macrophage migration inhibitory factor
	Mybpc3	Myosin-binding protein C
	Myh6	Apha-myosin heavy chain
	Myl2	Myosin regulatory light chain 2
	Mylk3	Myosin light chain kinase 3
	Nampt	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
	Ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
	Rack1	Receptor For Activated C Kinase 1)
	Rhoa	Transforming protein RhoA
	Sgcd	Sarcoglycan delta
	Shmt2	Serine hydroxymethyltransferase
	Slc4a1	Anion exchange protein
	Smpx	Small muscle protein X-Linked
	Sod1	Superoxide dismutase
	Srsf2	Serine/arginine-rich splicing factor 2
	Tnnt2	Troponin T cardiac muscle
Tnnt3	Troponin T skeletal muscle	
Xdh	Xanthine oxidase	
<b>Cardiac contractility</b>	Actc1	Actin
	Adipoq	Adiponectin
	Apoe	Apolipoprotein E
	Asph	Aspartate-beta-hydroxylase
	Atp2a2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
	Camk2d	Calmodulin-dependent protein kinase
	Casq2	Calsequestrin-2
	Cav1	Caveolin-1
	Ckm	Creatine kinase

**Table S4.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Cardiac contractility</b>	Csrp3	Cysteine and glycine-rich protein 3
	Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
	Hspb8	Heat shock protein beta-8
	Mb	Myoglobin
	Mybpc3	Myosin-binding protein C
	Myh6	Apha-myosin heavy chain
	Myh7	Myosin-7
	Myl2	Myosin light chain 2
	Myl3	Myosin light chain 3
	Mylk3	Myosin light chain kinase 3
	Pdlim5	PDZ and LIM domain protein 5
	Rhoa	Transforming protein RhoA
	Ryr2	Ryanodine receptor 2
	Sgcd	Sarcoglycan delta
	Slc4a1	Anion exchange protein
	Sod1	Superoxide dismutase
	Srl	Sarcalumemin
Tnnt2	Troponin T	
Tpm1	Tropomyosin alpha-1 chain	
Vcl	Vinculin	
Xdh	Xanthine oxidase	
<b>Mitochondrial respiration</b>	Nd1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1
	Nd5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5
	Ndufa2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2
	Ndufa5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5
	Ndufa8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8

**Table S4.** Continued.

<b>Biological process</b>	<b>Gene names</b>	<b>Protein names</b>
<b>Mitochondrial respiration</b>	Ndufa9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9
	Ndufa10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10
	Ndufa11	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11
	Ndufa12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12
	Ndufa13	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13
	Ndufab1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex
	Ndufb3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3
	Ndufb4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 4
	Ndufb5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5
	Ndufb6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6
	Ndufb9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9
	Ndufb10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10
	Ndufs1	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit 1
	Ndufs2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit 2
	Ndufs3	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit 3
	Ndufs4	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit 4



*Capítulo III*  
*Conclusão*

Em resumo, o modelo experimental utilizado neste estudo induziu obesidade e complicações metabólicas relacionadas, bem como a SMCR, caracterizada pela presença de disfunção renal e cardíaca. O composto bioativo  $\gamma$ Oz, preveniu a disfunção em ambos os órgãos alvos e apresentou efeito positivo sobre processos biológicos alterando a expressão de proteínas associadas ao estresse oxidativo e a função mitocondrial. Dessa forma, o  $\gamma$ Oz demonstra potencial como agente terapêutico na prevenção da SMCR.

*Anexo*

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
FACULDADE DE MEDICINA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

### CERTIFICADO Nº 1309/2019-CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Influência da intervenção com  $\gamma$ -orizanol na prevenção da síndrome metabólica cardiorenal de ratos obesos: participação da carbonilação proteica"**, conduzido pela Pesquisadora: **Jéssica Leite Garcia** – Orientadora: Profa. Dra. Camila Renata Correa Camacho, registrada com o nº **1309/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião extraordinária de 07 de agosto de 2019.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	28 de janeiro de 2022
<b>Espécie/Linhagem/Raça</b>	Ratos Wistar
<b>Nº de animais</b>	48
<b>Idade/Peso</b>	21 dias – 50 gr
<b>Sexo</b>	Machos
<b>Origem</b>	Biotério Central

Sara Rosa Stanley Sampaio  
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Profa. Assistente Bertha Furian Polegato  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP