



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

Mariane Róvero Costa

**EFEITOS DA OLEORRESINA DE TOMATE SOBRE O
METABOLOMA HEPÁTICO DE RATOS PORTADORES
DE SÍNDROME METABÓLICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Moreto
Coorientadora: Profa. Dra. Camila Renata Corrêa

**Botucatu
2023**

Mariane Róvero Costa

EFEITOS DA OLEORRESINA DE TOMATE
SOBRE O METABOLOMA HEPÁTICO DE
RATOS PORTADORES DE SÍNDROME
METABÓLICA

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Moreto
Coorientadora: Profa.Dra. Camila Renata Corrêa

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Costa, Mariane Róvero.

Efeitos da oleorresina de tomate sobre o metaboloma
hepático de ratos portadores de síndrome metabólica /
Mariane Róvero Costa. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Fernando Moreto

Coorientador: Camila Renata Corrêa

Capes: 40500004

1. Fígado - Doenças. 2. Metabolômica. 3. Licopeno. 4.
Tomate. 5. Hepatopatia gordurosa não alcoólica.

Palavras-chave: Metabolômica; Licopeno; NAFLD;
Oleorresina de tomate.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao Cristiano, meu marido, que sempre se mostrou extremamente compreensivo e afetuoso em meus piores momentos. E, com certeza a pessoa que mais me incentivou a trilhar esse caminho. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Dedico aos meus pais José Carlos e, principalmente, à minha mãe Lucélia, meu exemplo de determinação e superação, e à minha amada irmã Ana Paula.

Obrigada por terem acreditado e investido em mim, sem o apoio de vocês jamais alcançaria meus objetivos. A presença de vocês me deu a força para seguir, pois sabia não estar sozinha. Não há meios de colocar em palavras o amor que sinto por vocês.

Dedico ainda aos amigos do laboratório, sempre dispostos a ajudar.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Moreto, pela oportunidade, orientação, disposição e paciência para comigo. Expresso minha admiração e gratidão pela oportunidade em tê-lo como orientador durante o Mestrado, e agora no Doutorado.

Agradeço a minha coorientadora, Profa. Dra. Camila Renata Corrêa. Pessoa maravilhosa que me acolheu em seu grupo e me inspirou em muitos momentos.

À Prof^a. Dr^a Ana Lúcia dos Anjos Ferreira.

*Aos parceiros de pesquisa:
Cristina Gregolin, aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Patologia,
Carol Cristina Vágula, aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica,
Dra. Jéssica Leite Garcia,
Dra. Fabiane Valentini Francisqueti,
Dr. Artur Junio Togneri Ferron,
Aos alunos de Iniciação Científica que sempre estiveram dispostos a ajudar.
A todos, obrigada pelo apoio, ensinamentos e, principalmente, pela amizade.*

*A coordenadora do Programa de Pós-graduação em Patologia Prof^a.
Dr^a. Márcia Guimarães da Silva.*

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Patologia, especialmente à secretária Vânia do Amaral Soler, sempre gentil e prestativa.

A todos os funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte concedido.

Epígrafe

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.”

— Marie Curie

Resumo

RESUMO

Introdução: A síndrome metabólica (SM) é uma condição caracterizada pela presença de um grupo de fatores de risco que englobam a obesidade abdominal, hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão. A interação dos mecanismos fisiopatológicos da SM desencadeia o desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica. No contexto das doenças metabólicas, a busca por alternativas terapêuticas como a suplementação com compostos que apresentam efeitos protetores tem sido muito explorada. O licopeno é um carotenoide que possui potente atividade antioxidante e anti-inflamatória, cujos efeitos sobre a SM e suas consequências no fígado tem sido investigados.

Objetivo: Verificar o efeito da suplementação com o licopeno sobre o metaboloma hepático de ratos portadores de SM.

Métodos: Ratos *Wistar* (oito semanas de idade) foram distribuídos em dois grupos e alimentados com diferentes dietas: dieta controle (n=12) e dieta rica em gordura e açúcar (n=12). Após vinte semanas foram encontradas mudanças no peso corporal, glicemia de jejum e triglicerídeos plasmáticos. Para o tratamento com suplementação de oleorresina de tomate, os animais foram redistribuídos em quatro grupos: controle (Co, n=6), controle suplementado com oleorresina de tomate (Co+Lyc, n=6), síndrome metabólica (MetS, do inglês *metabolic syndrome*, n=6) e MetS suplementado com oleorresina de tomate (MetS+Lyc, n=6). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética.

Resultados: A suplementação com licopeno diminuiu os níveis plasmáticos de triglicérides, e aumentou os níveis de lipoproteína de alta densidade. Além disso, atenuou os níveis de triglicérides no tecido hepático. A análise de metabolômica revelou alteração do perfil de metabólitos induzidos pela MetS e efeito do licopeno sobre esse perfil, incluindo os metabólitos ácido úrico, biliar e cólico, glicolato, calcitriol, farnesil difosfato, all-trans hexaprenil difosfato, xantosina, xantina, s-adenosyl-L-metionina, L-homocisteína, esfingosina-1-fosfato, L-leucina, D-leucina e L-isoleucina.

Conclusão: O composto apresentou efeito protetor em relação à parâmetros característicos da SM, assim como para indicador de esteatose hepática. A suplementação com licopeno restaurou níveis dos aminoácidos de cadeia ramificada, L-leucina, D-leucina e L-isoleucina, depletados nos animais portadores de SM.

Abstract

ABSTRACT

Introduction: Metabolic syndrome (MetS) is a condition characterized by the presence of a group of risk factors that include abdominal obesity, hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia and hypertension. The interaction of the pathophysiological mechanisms of MetS triggers the development of non-alcoholic fatty liver disease. In the context of metabolic diseases, the search for therapeutic alternatives such as the use of supplementation with compounds that presents beneficial effects has been explored. Lycopene is a carotenoid with potent antioxidant and anti-inflammatory activity, whose effects on MetS and consequences on the liver have been investigated. *Aim:* To verify the effect of lycopene supplementation on the hepatic metabolome of rats with MetS. *Methods:* Eight weeks old male Wistar rats were randomly distributed in two groups and fed with different diets for induction of metabolic changes seen in the metabolic syndrome: control diet (n=12) and high sugar fat diet (HSFD) (n=12). After twenty weeks of the induction protocol, significant changes in body weight, fast blood glucose, and plasma triglycerides were found. Thus, for the study of the treatment with tomato oleoresin supplementation, the animals were redistributed into four groups: control (Co, n=6), control supplemented with tomato oleoresin (Co+Lyc, n=6), metabolic syndrome (MetS, n=6) and metabolic syndrome supplemented with tomato oleoresin (MetS+Lyc, n=6). The experimental protocol was approved by the Ethical Committee. *Results:* Supplementation with lycopene promoted a decrease in plasma levels of triglycerides and an increase in high-density lipoprotein levels. In addition, the compound attenuated hepatic content of triglyceride. The metabolomics analysis revealed alteration in the profile of metabolites induced by MetS and also the effect of lycopene supplementation on this profile, including the metabolites uric acid, glycolate, bile acid, cholic acid, calcitriol, farnesyl diphosphate, all-trans sexaprenyl diphosphate, xanthosine, xanthine, s-adenosyl-L-methionine, L-homocysteine, sphingosine-1-phosphate, L-leucine and L-isoleucine. *Conclusion:* The compound showed a protective effect on MetS features, as well as an indicator of hepatic steatosis. Lycopene supplementation restored levels of branched-chain amino acids, L-leucine and L-isoleucine, depleted in animals with MetS.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Anatomia hepática.....	30
Figura 2 – Visão tridimensional do lóbulo hepático.....	31
Figura 3 – Divisão do lóbulo hepático em zonas	32
Figura 4 – Interação entre o metabolismo da glicose e da frutose.....	35
Figura 5 – Progressão da NAFLD.....	38
Figura 6 – Representação esquemática da formação de espécies reativas e do sistema de defesa antioxidante.....	41
Figura 7 – Inflamação e produção de espécies reativas do oxigênio.....	44
Figura 8 – Fórmula estrutural e molecular do licopeno.....	50
Figura 9 – Absorção, transporte e metabolismo do licopeno.....	53
Figura 10 – Hipótese do trabalho.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica.....27

Tabela 2 – Quantidade de licopeno presente em suas principais fontes.....51

Tabela 3 – Conteúdo de licopeno em produtos à base de tomate.....51

*Lista de Abreviaturas e
Siglas*

4-HNE	4-hidroxinonenal
AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACR	Acroleína
AGEs	Produtos da glicação avançada, do inglês <i>advanced glycation end-products</i>
ANOVA	Análise de variância
ALEs	Produtos da lipoxidação avançada, do inglês <i>advanced lipoxidation end-products</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATP III	Adult Treatment Panel III
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada, do inglês <i>branched chain amino acids</i>
BCAT	Transaminase de aminoácidos de cadeia ramificada, do inglês <i>branched chain amino acids transaminase</i>
BCKA	α -cetoácido de cadeia ramificada, do inglês <i>branched chain α-keto acids</i>
BCKD	Desidrogenase de α -cetoácido de cadeia ramificada, do inglês <i>branched chain α-keto acid dehydrogenase</i>
BCO1	β -carotene 15,15'-oxygenase
BCO2	β -carotene-9',10'-oxygenase
CAT	Catalase
CD36	Receptor grupamento de diferenciação, do inglês <i>cluster of differentiation</i>
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento de resposta à carboidratos, do inglês <i>carbohydrate response element-binding protein</i>
CK	Círculo de Krebs
Co	Controle, do inglês <i>control</i>
CYPs	Citocromo P450
DAMPS	Padrões moleculares associados à danos, do inglês

	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGIR	European Group for Study of Insulin Resistance
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FBG	Glicemia de jejum, do inglês <i>fasting blood glucose</i>
FIE-HRMS	Espectrometria de massas com ionização por
FID	<i>eletrospray</i> , do inglês <i>flow infusion electrospray ionization high-resolution mass spectrometry</i> (FIE-HRMS)
	Federação Internacional de Diabetes
GLUT2	Transportador de glicose 2, do inglês <i>glucose transporter</i>
GO	Glioxal
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSR	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>high density lipoprotein</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance, do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i>
HSFD	Dieta rica em açúcar e gordura, do inglês <i>high sugar-fat diet</i>
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low density lipoprotein</i>)
LPL	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeo

Lyc	Licopeno
MDA	Malondialdeído
MetS	Metabolic Syndrome
MEV	Mudança de Estilo de Vida
MGO	Metilglioxal
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica, do inglês <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NAPDH oxidase	Adenina dinucleótido fosfato oxidase
NASH	Esteatohepatite não alcoólica, do inglês non-alcoholic steatohepatitis
NCEP	National Cholesterol Education Program
NF-kB	fator nuclear kappa B, do inglês nuclear factor kappa b
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
OH•	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos, do inglês <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PLS-DA	Análises discriminantes de mínimos quadrados parciais, do inglês <i>partial least squares-discrimant analyses</i>
RAGE	Receptor para produtos da glicação avançada
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Espécies reativas do oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SBP	Pressão arterial sisólica, do inglês <i>systolic blood pressure</i>
SD	Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i> (SD)
SGLT	Transportador de glicose dependente de sódio, do inglês sodium-dependent glucose co-transporter

SM	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido dismutase
SphK 1	Esfingosina quinase 1, do inglês <i>sphingosine kinase 1</i>
SphK 2	Esfingosina quinase 2, do inglês <i>sphingosine kinase 2</i>
SR-BI	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I, do inglês <i>scavenger receptor class B type I</i>
SREPB1c	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1c, do inglês <i>sterol regulatory element-binding protein 1c</i>
S1P	Sphinganine 1-phosphate
TA	Tecido adiposo
TG	Triglicerídeos
TNF- α	Necrose tumoral-alfa
TRLs	Receptores do tipo Toll, do inglês <i>toll-like receptors</i>
UPR	Resposta à proteína mal envelopada, do inglês <i>unfolded protein response</i>
VIP	Variáveis de importância em projeção, do inglês <i>variable importance in projection</i>
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade, do inglês <i>very low density lipoprotein</i>

Sumário

SUMÁRIO

Capítulo I – Revisão de Literatura

1 Introdução.....	24
2 Síndrome Metabólica.....	26
3 O fígado.....	28
3.1 Morfofisiologia Hepática.....	29
3.2 Funções do Fígado.....	33
3.2.1 Metabolismo de Carboidratos.....	33
3.2.2 Metabolismo de Lipídeos.....	35
4 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica.....	36
4.1 Fatores Dietéticos.....	39
4.2 Estresse Oxidativo.....	40
4.3 Estresse do Reticulo Endoplasmático.....	42
4.4 Inflamação.....	43
4.5 Disbiose	45
4.6 Disfunção do Tecido Adiposo.....	46
5 Intervenção.....	48
6 O Licopeno.....	49
6.1 Fontes de Licopeno.....	50
6.2 Absorção, Transporte e Metabolismo.....	51
6.3 Biodisponibilidade.....	53
6.4 Distribuição nos Tecidos.....	54
6.5 Oleorresina de Tomate	55
7 Justificativa.....	55
8 Objetivos.....	57
8.1 Objetivo Geral.....	57
8.2 Objetivos Específicos.....	57
Referências Bibliográficas.....	57

Capítulo II – Artigo Científico

Metabolomic analysis reveals novel functions of tomato oleoresin

supplementation in the liver of rats with diet-induced metabolic syndrome.....	68
--	----

Capítulo III – Conclusão

Conclusão.....	96
----------------	----

ANEXO	99
--------------------	----

Capítulo 1
Revisão de Literatura

1 Introdução

As mudanças sociais, econômicas e tecnológicas que ocorreram em todo o mundo décadas atrás, resultaram em intensas transformações nos hábitos alimentares e níveis de atividade física vivenciados pela população (1). Esse evento é denominado transição nutricional, termo que caracteriza modificações significantes do padrão alimentar concomitantes a modificações no cenário epidemiológico. Isto é, houve uma diminuição de doenças infectocontagiosas e aumento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) em diferentes faixas etárias e em todas as classes socioeconômicas, entretanto, ainda é observado a coexistência de extremos, a presença de desnutrição e o aumento de sobrepeso e obesidade (2).

Na década de 70, há cerca de 50 anos, iniciou-se principalmente nos países desenvolvidos, o aumento da disponibilidade e consumo de produtos ultraprocessados¹ ricos em açúcares, sódio e gorduras, alimentos de origem animal, óleos e bebidas açucaradas, como os refrigerantes (3, 4). Decorrente do aumento do consumo desses alimentos, houve uma diminuição da ingestão de alimentos *in natura* e minimamente processados², como frutas, legumes, verduras e grãos. Padrão alimentar que se tornou conhecido como Dieta Ocidental (do inglês, *Western diet*) (5). O nível de atividade física por sua vez, sofreu redução devido a mudanças nas formas de locomoção, transporte, lazer e trabalho, culminando em aumento do sedentarismo (3).

Essa transição foi intensificada no início da década de 90, sendo então de fato reconhecida quando as consequências para a saúde começaram a ser notadas, e permanece até os dias atuais (3). O consumo excessivo desses alimentos representa maior ingestão calórica devido à alta densidade energética que possuem, provocando um desequilíbrio entre o consumo e o

¹ Ultra-processados: alimentos que passam por processos industriais que alteram suas características, modificações químicas, adição de ingredientes sintéticos. Exemplo: adição de flavorizantes e emulsificantes, aumentando tempo de prateleira, palatabilidade, aroma e condições de empacotamento (7);

² Minimamente-processados: alimentos que passam por algum processo, porém não sofre acréscimo de aditivos. Exemplos: limpeza, moagem e pasteurização (8).

gasto calórico, gerando um estado de balanço energético positivo, condição que resulta em ganho de peso e adiposidade. Além disso, o consumo desses alimentos conduz à hiperglicemia e hiperlipidemia e, conseqüentemente, a efeitos metabólicos deletérios. Fatores que são considerados riscos metabólicos para surgimento de DCNT (6).

As DCNT são responsáveis atualmente por 41 milhões de mortes por ano, compreendendo 74% das mortes globais, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) do ano de 2022, e os números continuam em ascensão (6). Dentre as DCNT, destacam-se as doenças crônicas metabólicas, como a obesidade e o diabetes. A obesidade, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, pode ser entendida como uma doença base para o desenvolvimento de outras doenças crônicas, e acometia, em 2016, 650 milhões de adultos. Em 2020, dados mais recentes da OMS mostravam que 39 milhões de crianças abaixo de 5 anos já apresentavam obesidade ou sobrepeso (9). No Brasil, pesquisa divulgada pelo Ministério da Saúde em 2019 apontou que a prevalência de obesidade aumentou de 11,8% em 2006 para 20,3% em 2019 o que representa um aumento de 72% em 13 anos (10). Projeções para 2030 estimam que 38% da população mundial adulta apresentará sobrepeso e 20% obesidade (9).

Os danos da obesidade, entretanto, não estão associados apenas ao total de gordura corporal, mas também ao padrão de deposição desta gordura. O excesso de gordura visceral, conhecido como obesidade central, reflete em maior circunferência da cintura e tem uma forte associação com doenças cardiovasculares e está especialmente associada à resistência à insulina e diabetes tipo 2 (DM2) (11).

Fundamentada neste contexto, encontra-se a Síndrome Metabólica (SM), Síndrome da Resistência à Insulina ou Síndrome-X, termos que designam um grupo de alterações metabólicas que compartilham seus mecanismos fisiopatológicos e estão associadas ao desenvolvimento do DM2, doenças cardiovasculares e doença hepática (11, 12, 13).

2 Síndrome Metabólica

A SM pode ser definida como uma condição patológica caracterizada por obesidade abdominal, resistência à insulina, hipertensão e hiperlipidemia, dessa forma, não é uma doença por si só, mas sim um conjunto de fatores que promovem um risco aumentado de doença cardiovascular. Esses fatores associados a SM atuam sinergicamente conduzindo a um maior o risco para desfechos negativos para saúde do que a presença desses fatores isoladamente (11). Atualmente, a SM representa um preocupante problema de saúde mundialmente reconhecido, afetando mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo e sua incidência³, frequentemente, caminha paralelamente às incidências da obesidade e de DM2 (11). No Brasil, a prevalência⁴ de SM em adultos atualmente é de 29,6%, subindo para 40% em maiores de 60 anos de idade (14).

Na literatura, o conceito de SM pode ser bem variável dentre os diferentes autores e organizações, assim como os critérios para o diagnóstico clínico. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (FID), para o diagnóstico de SM é necessário a presença de circunferência da cintura aumentada em somatória a dois fatores dentre os quatro seguintes: hipertrigliceridemia, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês high density lipoprotein), hipertensão arterial ou hiperglicemia ou, então, diagnóstico prévio de DM2 (15). Para a National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III) 2005 a presença de pelo menos 3 dos fatores acima citados já caracterizam a SM. Há ainda, as definições da OMS, European Group for Study of Insulin Resistance (EGIR) e da American Association of Clinical Endocrinologists (AACE). Sendo o ATP III frequentemente utilizado em estudos clínicos (tabela 1) (16).

³ Incidência: casos novos durante um período específico em uma população;

⁴ Prevalência: casos novos e casos já existentes da doença em uma população (17).

Tabela 1. Critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica.

Critérios	ATP III (quaisquer 3 de 5)
Circunferência abdominal	> 102 cm para homens e 88 cm para mulheres
Glicemia	≥ 100 mg/dl ou em tratamento medicamentoso
Pressão arterial	≥ 130/85 mmHg ou em tratamento medicamentoso
Nível de triglicérides	≥ 150 mg/dl ou em tratamento medicamentoso
Nível de colesterol HDL	< 40 mg/dl para homens e < 50 mg/dl para mulheres ou em tratamento medicamentoso

Embora exista variações entre os critérios da SM, de acordo com todas as definições mencionadas, a presença de hiperglicemia, hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia mostram-se claramente relacionadas entre si. Para o estudo da SM e suas consequências, muitos modelos experimentais tem sido desenvolvidos. Adotam-se aqueles capazes de desencadear as alterações acima mencionadas, ou parte delas, no entanto, sem a atribuição dos valores de referência estipulados para humanos. Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos por meio de diferentes métodos de indução, como mutação genética, indução química ou modelos dietéticos (18).

Os principais modelos genéticos utilizados são os camundongos *ob/ob*, que possuem uma deleção no gene que codifica a leptina e os camundongos *db/db* e ratos Zucker *fa/fa*, que possuem uma mutação no gene que codifica o receptor de leptina. Esses animais apresentam hiperfagia e, portanto, se tornam obesos. De modo geral, esses modelos desenvolvem alterações metabólicas compatíveis à SM (19). Os modelos de indução química são aqueles que induzem os fatores da síndrome através do uso de drogas, como por exemplo, o uso de estreptozotocina e aloxana para o desenvolvimento de DM2 (20,21). Em relação aos modelos dietéticos, são encontrados na literatura a indução da SM através de dietas rica em açúcares ou gorduras e dietas ricas em ambos os nutrientes (22-24). Em determinados modelos dietéticos, além da SM em si, também foi observada a presença de doenças cardiovasculares, renais e hepáticas (25, 26).

O desenvolvimento da SM não é totalmente compreendido, mas a

obesidade central e a resistência à insulina estão certamente envolvidas em sua etiologia. Diversos mecanismos hipotéticos buscam explicar a sua fisiopatologia e o mais amplamente aceito é a resistência à insulina associada ao fluxo aumentado de ácidos graxos. Outros mecanismos muito explorados na literatura incluem inflamação crônica de baixo grau e estresse oxidativo (27).

O excesso de gordura, principalmente na região abdominal aumenta substancialmente o risco de resistência à insulina e outros fatores da SM, e também se associa a um metabolismo de ácidos graxos prejudicado. Os adipócitos hipertrofiados e em maior número, apresentam maior atividade lipolítica e resistem ao efeito anti-lipolítico da insulina, resultando em aumento do fluxo de ácidos graxos para o fígado afetando o metabolismo hepático e contribuindo para o acúmulo de gordura no fígado (28). Havendo, uma correlação entre a obesidade abdominal e uma maior liberação portal de ácidos graxos para o fígado (29).

O acúmulo de gordura nos hepatócitos é conhecido como doença gordurosa não alcoólica do fígado (NAFLD, do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*), considerada por muitos autores como uma manifestação hepática da SM (30). Neste cenário, a NAFLD vem ganhando atenção sendo a SM um importante fator preditor para seu desenvolvimento. Dessa forma, o fígado é um importante alvo de estudo relacionado às consequências da SM.

3 O Fígado

O fígado é um órgão volumoso, maciço e vital, classificado como o maior órgão interno do corpo humano atingindo cerca de 1,5 kg em um indivíduo adulto, o que representa aproximadamente 2 a 3% do peso corporal total. É considerado como a maior glândula do corpo humano devido a sua atividade exócrina e endócrina, apresentando um papel primordial para a manutenção da homeostase corporal (31, 32).

Esse órgão também representa a ligação entre o sistema digestório e o

circulatório. Aproximadamente 80% do suprimento sanguíneo hepático deriva da veia porta que transporta o sangue pouco oxigenado, porém rico em nutrientes, oriundo da digestão. O restante, 20%, deriva da artéria hepática que conduz o sangue rico em oxigênio. Sendo altamente irrigado e com capacidade de expansão, o fígado pode atuar como reservatório de sangue armazenando 10% do volume corporal total em seus vasos sanguíneos (32).

3.1 Morfofisiologia Hepática

O fígado localiza-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal com uma pequena porção no quadrante esquerdo, logo abaixo do diafragma e apresenta um formato que se assemelha a uma pirâmide ou cunha. É envolvido pelo peritônio, uma membrana serosa que recobre as paredes do abdome e a superfície dos órgãos digestivos, exceto onde se adere ao diafragma e a outros órgãos (33).

Duas faces são descritas no fígado, a diafragmática relacionado ao diafragma; e a visceral, relacionada as demais vísceras abdominais em proximidade. Na face visceral é possível distinguir quatro lobos denominados lobos direito, esquerdo, quadrado e caudado. Na face diafragmática, por sua vez, os lobos direito e esquerdos identificados encontram-se separados por uma prega do peritônio, o ligamento falciforme. A partir dessa distinção, pode-se observar que entre o lobo direito e o lobo quadrado está situada a vesícula biliar. Assim como entre os lobos direito e caudado observa-se um sulco que aloja a veia cava superior e, entre os lobos quadrado e caudado, há uma fenda transversal por onde passam as estruturas que constituem a porta hepática ou hilo, formadas pela artéria hepática, veia porta, ducto hepático, plexo nervoso hepático e vasos linfáticos. Nessa região a cápsula de tecido conjuntivo denso modelado que envolve o fígado, mais internamente ao peritônio, se torna mais espessa e adentra o órgão conduzindo as estruturas do hilo ou porta do fígado, conforme ilustrado na figura 1 (32,33).

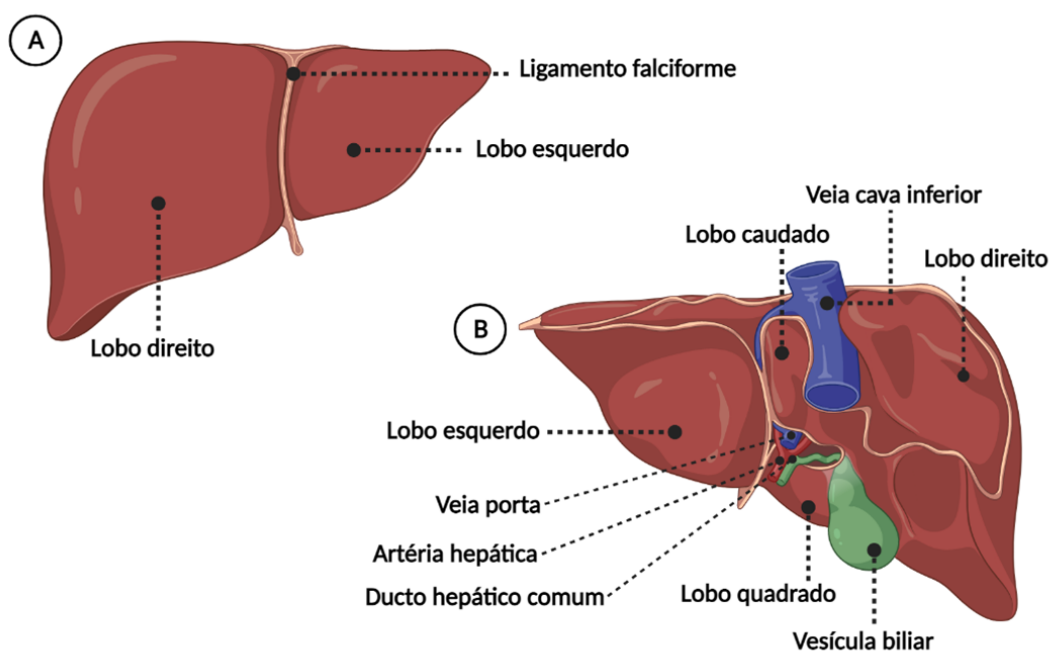


Figura 1. Anatomia hepática. **(A)** vista anterior do fígado, na qual observa-se a face diagramática e estão representados os lobos direito e esquerdo e o ligamento falciforme; **(B)** vista posterior do fígado, observando-se a face visceral onde estão representados os quatro lobos hepáticos e o hilo hepático contendo a veia porta, artéria hepática e ducto hepático comum juntamente à vesícula biliar. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 14 de setembro de 2022).

A unidade funcional básica do fígado é o lóbulo hepático, uma estrutura cilíndrica cujo tamanho compreende alguns milímetros de comprimento e até dois milímetros de diâmetro. O número de lóbulos pode variar de 50.000 a 100.000 unidades em um fígado humano adulto. O parênquima hepático é constituído por hepatócitos que se dispõem radialmente ao redor da veia central ou centrolobular nos lóbulos hepáticos. A veia central realiza a drenagem para as veias hepáticas e, destas, para a veia cava. Nos vértices dos lóbulos hepáticos, o conjunto de tecido conjuntivo, ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos é denominado espaço porta ou tríade portal. A junção dos hepatócitos forma uma placa hepática, em geral, com a espessura de duas células. Entre uma placa e as células adjacentes se situam

os canalículos biliares que fazem a drenagem para os ductos biliares presentes nos septos fibrosos que separam um lóbulo do outro (Figura 2) (33,34).

Os espaços entre as placas de hepatócitos contêm os sinusóides hepático que demarcam o espaço de Disse. Para além das células endoteliais, os sinusóides apresentam as células de Kupffer, macrófagos responsáveis por processos imunológicos e destruição de hemácias. Ainda no espaço de Disse estão presentes as células estreladas hepáticas, que contêm inclusões lipídicas ricas em vitamina A e possuem um importante papel no desenvolvimento da fibrose em condições patológicas (32, 34).

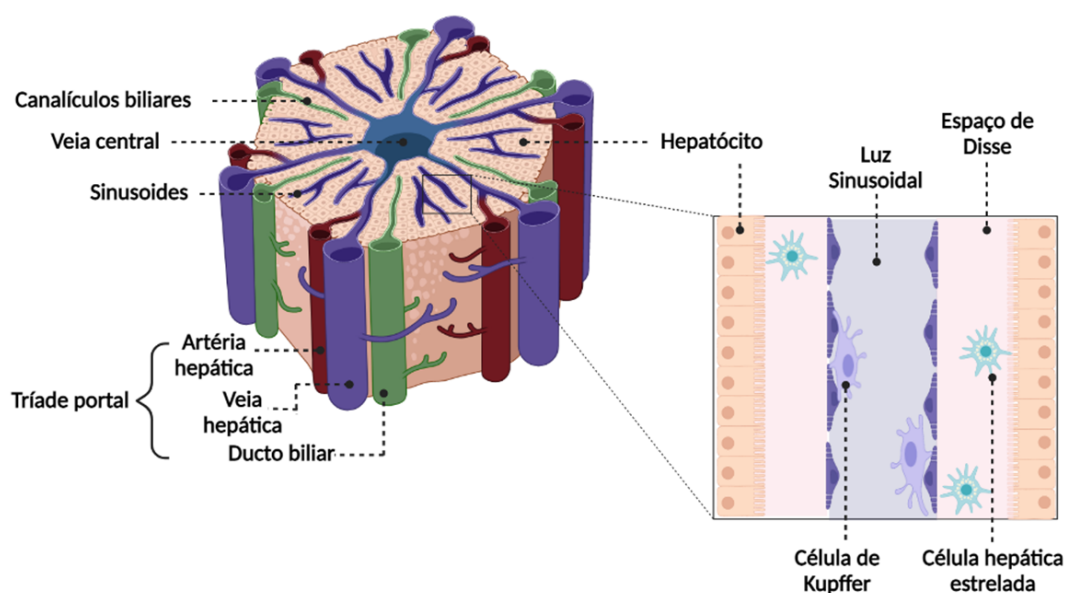


Figura 2. Visão tridimensional do lóbulo hepático. No centro do lóbulo hepático encontra-se a veia central. Nos vértices, a tríade portal, formada pela veia porta, artéria hepática e ducto biliar. Observar as células endoteliais fenestrados do capilar sinusóide, células de Kupffer na luz sinusoidal e as células hepáticas estreladas no espaço de Disse. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 14 de setembro de 2022).

Nos lóbulos hepáticos o sangue, quer arterial ou quer venoso, flui da periferia para a região central. Os hepatócitos à medida que se distanciam do espaço porta apresentam diferenças quanto as suas características

estruturais, histoquímicas e bioquímicas o que permite a divisão do lóbulo hepático em 3 zonas distintas. A zona 1 inclui as células da periferia, região perilobular, que corresponde a zona mais oxigenada, o que explica o fato de os hepatócitos desta zona apresentarem mais enzimas do metabolismo oxidativo. A zona 2 corresponde aos hepatócitos intermediários. As células localizadas nas adjacências da veia central configuram a zona 3, região centrolobular que recebe menor concentração de nutrientes e de oxigênio (Figura 3). Essa divisão em zonas representa a heterogeneidade da dinâmica estrutural e funcional do lóbulo hepático e é apontada como o pré-requisito para a realização das diversas e simultâneas funções necessárias para manter a homeostase metabólica do organismo em condições fisiológicas (34,35).

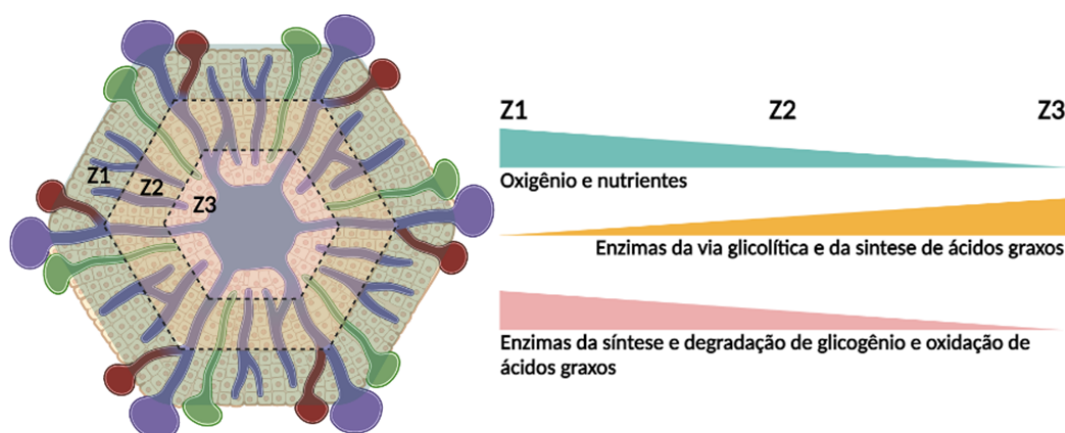


Figura 3. Divisão do lóbulo hepático em zonas: Zona 1 (Z1), perilobular; Zona 2 (Z2), intermediária; Zona 3 (Z3), centrolobular. Os hepatócitos apresentam heterogeneidade de acordo com a região que estão localizados nos lóbulos: hepatócitos dispostos na Z1 recebem maior aporte de oxigênio e nutrientes o que explica a maior presença de enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio e oxidação de ácidos graxos; hepatócitos presentes na Z3 diferem-se pela maquinaria enzimática relacionada à via glicolítica e a síntese de ácidos graxos. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 14 de setembro de 2022).

3.2 Funções do Fígado

O fígado desempenha uma grande diversidade de funções, como previamente citado. Essas funções estão inter-relacionadas, o que é evidenciado quando o órgão é acometido por anomalias ou patologias, quando suas funções são afetadas de forma simultânea. As funções hepáticas incluem o metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídeos e hormônios, desintoxicação, produção de bile, armazenamento de vitaminas e ferro, formação de fatores de coagulação e síntese de proteínas plasmáticas (32).

Dentre essas funções, pode-se destacar o papel de orquestrar o metabolismo energético, processando e sintetizando substratos que são transportados para outras áreas e integrando as funções metabólicas (36). Esse tópico será brevemente abordado a seguir com ênfase no metabolismo dos carboidratos e lipídios intimamente relacionados ao processo fisiopatológico de doenças metabólicas.

3.2.1 Metabolismo de Carboidratos

Após o processo de digestão, no intestino, ocorre a absorção da glicose através de 2 mecanismos: o co-transporte com o sódio através do transportador de glicose dependente de sódio (SGLT, do inglês sodium-dependent glucose co-transporter) e o transporte facilitado mediado pelo transportador de glicose 2 (GLUT2, do inglês glucose transporter) (37). Uma vez na circulação, os carboidratos são encaminhados para o fígado através da veia porta. Por meio do GLUT2, a glicose adentra o hepatócito e pode percorrer os seguintes destinos: 1) ser oxidada através da glicólise gerando o piruvato, que na mitocôndria, é oxidado para gerar adenosina trifosfato (ATP) através do Ciclo de Krebs (CK) ou do Ácido Cítrico e da fosforilação oxidativa; 2) a glicose-6-fosfato, um metabólito da via glicolítica, também pode ser metabolizado através da via das pentoses fosfato gerando ribose-5-fosfato, para a síntese de ácidos nucleicos, e nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato (NADPH), requerido por processos biossintéticos; 3) a glicose por ser armazenada na forma de glicogênio; 4) ou ainda, pode ser utilizada para a síntese de polímeros estruturais.

A ativação de vias oxidativas ou de armazenamento é dependente do estado energético da célula e, em frente à abundância de substrato a acetil coenzima A (acetil-CoA), formada a partir do piruvato, ao invés de seguir para a oxidação via CK, segue para a síntese de ácidos graxos via lipogênese *de novo*. Os ácidos graxos formados podem ser armazenados na forma de triglicerídeos (38).

Outro monossacarídeo que merece atenção é a frutose. Carboidrato que tem sido amplamente adicionado a alimentos e bebidas industrializadas por tornar esses produtos mais palatáveis. Atualmente, o açúcar tem sido associado às morbidades, em especial à NAFLD, devido às características de seu metabolismo. A absorção luminal da frutose pelos enterócitos se dá através do GLUT5 e desses para a circulação através do GLUT2 (39). Uma vez na circulação portal a frutose é extensamente absorvida pelo fígado através dos GLUT 2, 5 e 8 (40). No fígado, a frutoquinase inicia o catabolismo da frutose (frutólise) formando a frutose-1-fosfato que é metabolizada a diidroxietona fosfato e gliceraldeído que são o ponto em comum entre o metabolismo da glicose e da frutose (Figura 4). Esses compostos podem ser metabolizados à glicose, gerar energia na forma de ATP através das vias oxidativas ou formar ácidos graxos via lipogênese *de novo* de acordo com o estado energético da célula. Considerando que o catabolismo da frutose ignora os mecanismos regulatórios da glicólise, seu elevado consumo rapidamente gera substrato para a via lipogênica o que possibilita o armazenamento na forma de triglicerídeos (41).

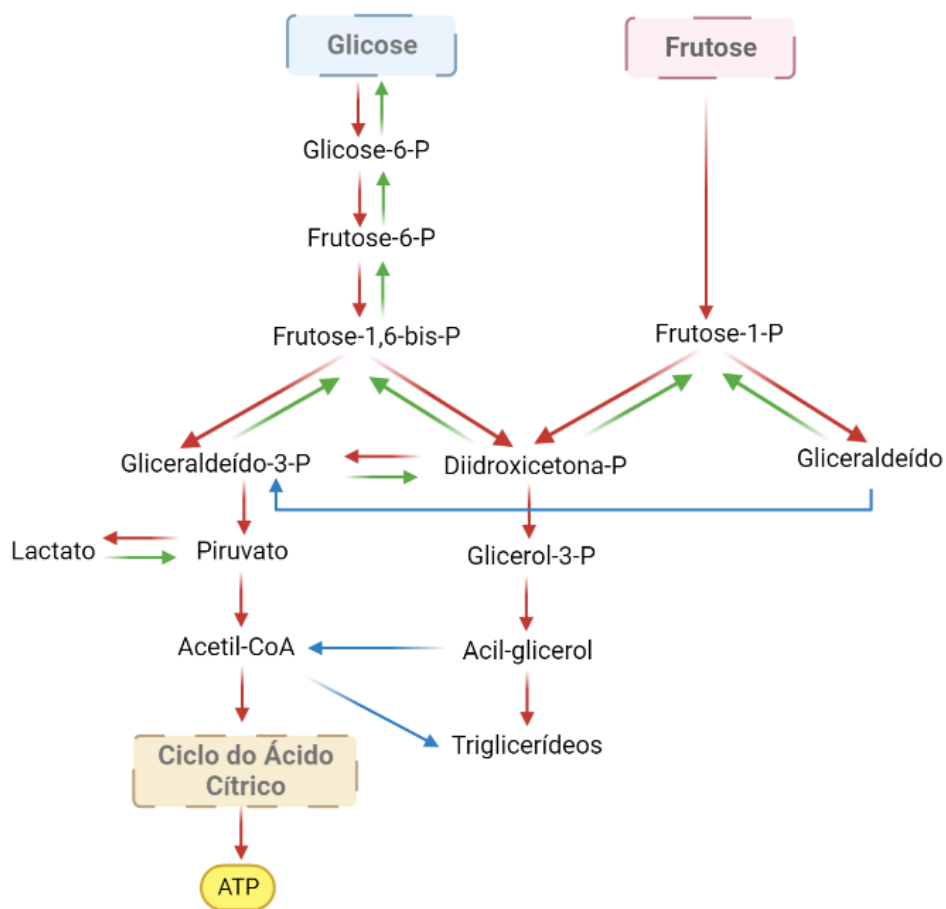


Figura 4. Interação entre o metabolismo da glicose e da frutose. Observa-se que o metabolismo de ambos monossacarídeos, glicose e frutose, pode contribuir para a produção de energia (ATP), ao fornecer substrato para as vias oxidativas. Entretanto, de acordo com o estado energético celular, triglicerídeos podem ser formados. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 03 de outubro de 2022).

3.2.2 Metabolismo de Lipídeos

Os lipídios dietéticos são emulsificados por ácidos biliares no lúmen intestinal após sua hidrólise principalmente pela lipase pancreática e então absorvidas pelos enterócitos. Após a absorção deixam o intestino sob a forma de quilomícrons através do sistema linfático, alcançam a circulação sanguínea. A apolipoproteína CII, presente nos quilomícrons, ativa a lipase lipoproteica

(LPL) nos capilares do tecido adiposo, coração e músculo esquelético levando a saída de ácidos graxos livres para esses tecidos. Os quilomícrons remanescentes são captados pelo fígado (42). Nos hepatócitos, os ácidos graxos podem ser oxidados através da β -oxidação gerando energia (32).

Quando os ácidos graxos da dieta superam a necessidade energética do fígado, são exportados, na forma de triglicerídeos, através da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*), ou mediante a saturação desse mecanismo podem ser armazenados em gotículas lipídicas. Do fígado, as VLDLs são transportadas pelo sangue para o músculo e tecido adiposo onde, novamente, através da LPL os ácidos graxos livres são liberados. A perda de triglicerídeos pela VLDL a converte na lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*) que transporta colesterol para os tecidos extra-hepáticos. Através do receptor de LDL as lipoproteínas são incorporadas pelo hepatócito e seu conteúdo convertido em ácidos biliares (42). O fígado e também o intestino produzem a HDL, responsável pelo chamado transporte reverso do colesterol, captando o colesterol dos tecidos extra-hepáticos e encaminhando-os para o fígado (43).

Neste cenário, o fígado representa um órgão chave no controle do metabolismo de nutrientes adaptando-se a situações de carência e excesso (44). Nesta última situação, a abundância de macronutrientes, em especial açúcares e gorduras, está associada a um prejuízo na função hepática de administrar o volume de triglicerídeos formado, levando ao seu acúmulo e desenvolvimento da NAFLD (44,45).

4 Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

A NAFLD tornou-se recentemente a doença hepática crônica mais comum no mundo, representando a principal causa de dano hepático e uma das manifestações emergentes mais importantes da SM (46). Estima-se que mais de 25% da população mundial apresente NAFLD, ou seja, uma prevalência de 2 bilhões de pessoas afetadas, sendo as regiões do Oriente

Médio e América do Sul de maior prevalência e a África de menor (47). Projeções estimam que o custo para os cuidados de pacientes portadores de NAFLD, no Estados Unidos, aumentará em 18% de 2000 para 2035 (48). Além disso, é previsto que se torne a indicação mais frequente para transplante de fígado até 2030 (49).

Caracterizada clinicamente como o acúmulo de triglicerídeos no citoplasma dos hepatócitos (esteatose) sem o consumo de álcool, a NAFLD é um termo que engloba distúrbios hepáticos em associação a um grupo de anormalidades metabólicas, incluindo obesidade abdominal, resistência à insulina, DM2 e dislipidemia ou, como um todo, a SM. Para o diagnóstico clínico da NAFLD, a presença de esteatose hepática deve exceder 5% do peso do fígado. O diagnóstico diferencial deve excluir hepatites virais, e outras doenças hepáticas crônicas como doença de Wilson, hemocromatose, hepatite autoimune e doença colestática do fígado além de lipodistrofia, doença celíaca, doença de Cushing, uso de alguns medicamentos e consumo excessivo de álcool (48).

A NAFLD é uma doença com potencial de progressão, com um espectro histológico variando desde simples esteatose para uma forma mais agressiva, a esteatohepatite não alcoólica (NASH, do inglês non-alcoholic steatohepatitis), em que ocorre inflamação crônica e fibrose tecidual, processos que causam dano celular podendo levar ao desfecho de cirrose hepática e/ou hepatocarcinoma (Figura 5) (50,51). Considerando a gravidade do acometimento hepático, sua elevada prevalência e as consequências do acúmulo lipídico, pesquisas devem ser conduzidas para o entendimento de sua fisiopatologia e tratamento.

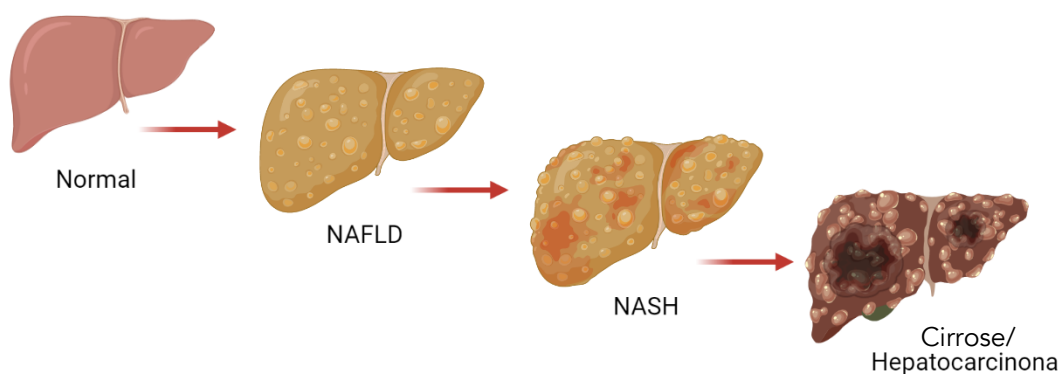


Figura 5. Progressão da NAFLD. O elevado consumo de açúcares e gorduras visto na dieta ocidental está associado ao comprometimento do metabolismo energético no fígado que leva ao acúmulo intra-hepático de gordura e estabelecimento da esteatose. Mediante a persistência do insulto, a doença pode progredir, iniciando um processo inflamatório (esteatohepatite) e fibrose tecidual. Por fim, pode levar a cirrose e/ou hepatocarcinoma. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 06 de outubro de 2022).

Embora não totalmente esclarecida algumas teorias foram postuladas no sentido de explicar a patogênese da NAFLD. Uma delas é a hipótese “two hit” na qual o acúmulo hepático de gordura ocorre por meio de dois insultos (hit) ao órgão. O primeiro é caracterizado por um desbalanço no metabolismo lipídico em que o influxo de ácidos graxos representado pela importação, síntese *de novo* e fonte dietética, excede o efluxo hepático, ou seja, o catabolismo de ácidos graxos e a exportação de lipoproteínas (52). Um estudo realizado com marcador, curiosamente demonstrou a contribuição de cada fonte para o acúmulo intra-hepático de lipídios. Dos triglicerídeos intra-hepáticos dos pacientes portadores de NAFLD que participaram do experimento ~59% foram derivados de ácidos graxos circulantes, ~26% da lipogênese *de novo* e ~15% da gordura dietética (53). Esse desequilíbrio entre influxo e efluxo resulta no acúmulo lipídico pelo hepatócito. O segundo hit envolve um processo inflamatório e estresse oxidativo levando a danos à células e componentes celulares associados a progressão à NASH (52).

Entretanto, atualmente sabe-se que o desenvolvimento da NAFLD é complexo e envolve uma série de fatores, sendo postulada a hipótese de múltiplos insultos (“multiple hit”). De acordo com esta teoria, a NAFLD seria resultado de uma complexa interação entre mecanismos genéticos e epigenéticos, fatores comportamentais, nutricionais, estresse oxidativo e inflamação (54). Independentemente da teoria três importantes aspectos reciprocamente dependentes desempenham um papel central no desenvolvimento da NAFLD: hábitos alimentares, estresse oxidativo e inflamação. Nos tópicos seguintes serão descritos importantes aspectos da patogênese da NAFLD no contexto da SM.

4.1 Fatores Dietéticos

Como relatado anteriormente, a constelação de fatores que compõem a SM é disparada, principalmente, por hábitos alimentares. O elevado consumo de gorduras e carboidratos, em especial a frutose, está associado à deposição hepática de lipídios. Uma recente revisão reforçou uma relação positiva entre o padrão de dietético ocidental e o risco de NAFLD (55). A influência do consumo alimentar e alterações hepáticas é tão clara que a mudança no estilo de vida é um importante tratamento encontrado em guidelines para NAFLD (56).

A presença de combustível metabólico além das necessidades energéticas, ou seja, quando o consumo de macronutrientes supera a necessidade de ATP do organismo, o excesso será armazenado na forma de triglicerídeos. Nesta situação, os macronutrientes são convertidos em acetil-coA, molécula comum ao metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. O acetil-coA, além de ser substrato para a produção de energia é precursor da síntese de ácidos graxos. Os ácidos graxos formados podem ser exportados do fígado na forma de triglicerídeos através da VLDL, culminando no aumento dos níveis de VLDL circulantes (42). Como mencionado anteriormente, a saturação desse mecanismo de exportação, ou seja, ácidos graxos não

exportados para a circulação como VLDL, resultam no acúmulo de triglicerídeos no hepatócito, evento conhecido como esteatose hepática.

Outros mecanismos contribuem para o desenvolvimento da esteatose. O metabolismo da frutose 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 para genes envolvidos na síntese de triglicerídeos. Outro fator de transcrição para genes da lipogênese é a proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol 1c (SREBP1c, do inglês *sterol regulatory element-binding protein 1c*) fortemente estimulado pela insulina. A SM, plano de fundo da NAFLD, comumente está associada à resistência à insulina e hiperinsulinemia, o que promove a hiperativação do SREBP1c e consequente síntese hepática de lipídios (57). Adicionalmente, na condição de resistência à insulina o tecido adiposo torna-se resistente ao efeito antilipolítico da insulina o que impulsiona o fluxo de ácidos graxo derivados da lipólise do tecido para o fígado contribuindo para a esteatose hepática (28).

4.2 Estresse Oxidativo

A maior disponibilidade de acetil-coA decorrente da oxidação de carboidratos e lipídios disponíveis para participar do ciclo do CK e da fosforilação oxidativa leva à uma excessiva estimulação da mitocôndria (58). Durante esse processo, elétrons escapam da cadeia transportadora de elétrons reagindo com o oxigênio (O_2) formando o superóxido (O_2^-) que é impermeável a 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 (H_2O) (59). Em excesso, o H_2O_2 pode deixar a mitocôndria e ser reduzido pelas reações de Fenton ou Haber-Weiss formando o radical hidroxil ($OH^\bullet$). Esta é uma molécula altamente reativa que pode levar à danos oxidativos importantes (Figura 6) (60).

A produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) pela mitocôndria representa um ciclo contínuo contrabalanceado pelas enzimas antioxidantes (61). Entretanto, a estimulação excessiva pela abundância de substrato leva à superprodução de EROs e depleção dos mecanismos antioxidantes resultando em um desbalanço entre a produção de oxidantes e o sistema de defesa antioxidante o que compreende o estresse oxidativo (60).

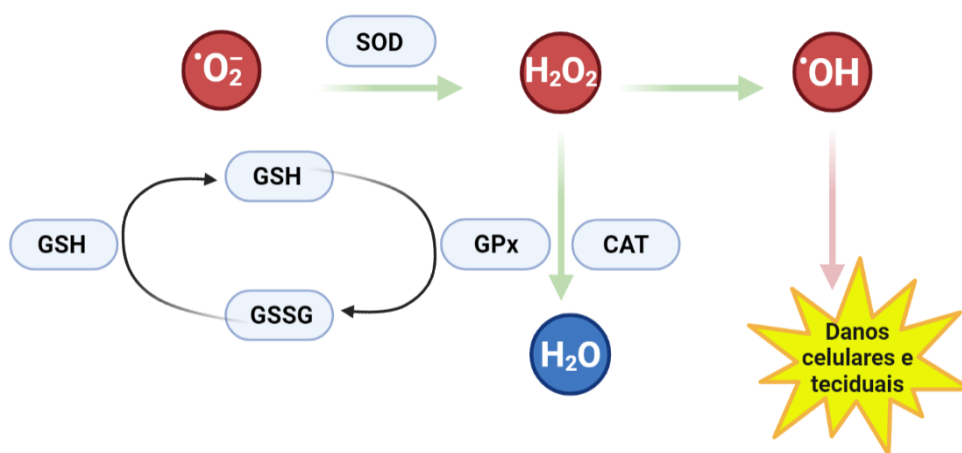


Figura 6. Representação esquemática da formação de espécies reativas e do sistema de defesa antioxidante. Elétrons podem escapar da cadeia transportadora de elétrons e reagir com o oxigênio formando espécies reativas do oxigênio. As enzimas SOD, CAT e GPx são responsáveis pela redução das espécies reativas em água. Em excesso, o peróxido de hidrogênio pode reagir com o superóxido ou metais formando o radical hidroxil que está associado a danos celulares e teciduais. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GSSG: glutathione oxidada; GSR glutathione reductase; GSH: glutathione reduzida. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 25 de outubro de 2022).

As EROs podem interagir com moléculas funcionais e estruturais como o ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios, carboidratos e proteínas modificando sua estrutura e formando produtos que também apresentam capacidade reativa (62). A oxidação de lipídios gera como produtos o 4-hidroxinonenal (4-HNE), acroleína (ACR) e malondialdeído (MDA), já a

oxidação de carboidratos forma o metilglioxal (MGO) e glioxial (GO). Esses subprodutos são denominados, respectivamente, produtos da lipoxidação avançada (ALEs, do inglês *advanced lipoxidation end-products*) e produtos da glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end-products*) (63).

O estresse oxidativo está associado a danos no DNA mitocondrial além de alterações estruturais da organela o que contribui para a progressão da NAFLD (64). Estas alterações são acompanhadas por um prejuízo das funções metabólicas e bioenergéticas da mitocôndria incluindo a, anteriormente discutida, superprodução de EROs e diminuição da produção de ATP, características da disfunção mitocondrial (65). Em adição, a cardiolipina, um fosfolípido exclusivamente encontrado na membrana mitocondrial interna e necessário para a adequada formação da crista mitocondrial, é suscetível a danos oxidativos. A oxidação da cardiolipina induz a ativação de mecanismos apoptóticos levando à morte celular (66). Além do mais, anormalidades mitocondriais conduzem ao acúmulo de ácidos graxos não metabolizados no citosol (67). A oxidação ineficiente leva ao acúmulo de intermediários lipotóxicos como o diacilglicerol e as ceramidas. Estes produtos podem prejudicar a sinalização da insulina e mediar a inflamação no hepatócito (68,69).

4.3 Estresse do Retículo Endoplasmático

O ácido graxo dietético pode interferir no equilíbrio do retículo endoplasmático (RE) levando ao seu estresse por mecanismos ainda investigados (70). Por sua vez, o estresse do RE pode induzir à esteatose hepática através de efeitos sobre a síntese lipídica e inflamação (71). No fígado, além de sua conhecida função no controle de qualidade das proteínas, o RE está envolvido na síntese e metabolismo lipídico. Em condições estressoras ocorre ativação da via de sinalização denominada resposta à proteína mal envelopada (UPR, do inglês *unfolded protein response*), com o objetivo de restaurar a homeostase do RE (67). A ativação da UPR leva a

indução da sinalização inflamatória através da ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB, do inglês *nuclear factor kappa b*), um importante fator envolvido na sinalização de citocinas inflamatórias (71).

Tanto o estresse do RE quanto a carbonilação de proteínas relacionados ao ambiente celular pró-oxidante estão associados às alterações estruturais de proteínas. A apolipoproteína B, essencial para a formação do VLDL, é uma das moléculas passíveis de danos o que pode prejudicar a exportação de lipídios do fígado e, conseqüentemente, exacerbar a esteatose no órgão (58).

4.4 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 (72). Entretanto, a ativação crônica do processo inflamatório está relacionada com a maciça produção de citocinas e promoção do estresse oxidativo (73).

As citocinas secretadas pelas células imunes atuam como mensageiros intracelulares recrutando e ativando células fagocíticas contribuindo para a exacerbação do processo inflamatório. A ativação de fagócitos em resposta aos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) e padrões moleculares associados à danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*), e a ligação de citocinas a seus receptores são responsáveis pela produção de espécies reativas através da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH oxidases ou Nox) e mieloperoxidase (MPO). Esta produção ocorre por reações de oxidoredução com o objetivo de ampliar a resposta inflamatória e destruir micro-organismos e debris celulares. Entretanto, dada a estimulação excessiva

dessas células ocorre danos ao tecido hepático (Figura 7) (74).

AGEs e ALEs interagem com o receptor para produtos da glicação avançada (RAGE), que atende ao padrão DAMP de reconhecimento molecular, contribuindo para o processo inflamatório. Já que ao ser ativado o RAGE estimula a translocação do NF- κ B para o núcleo levando a transcrição e expressão de citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (75). Portanto, pode-se estabelecer uma relação de retroalimentação positiva entre o estresse oxidativo e a inflamação.

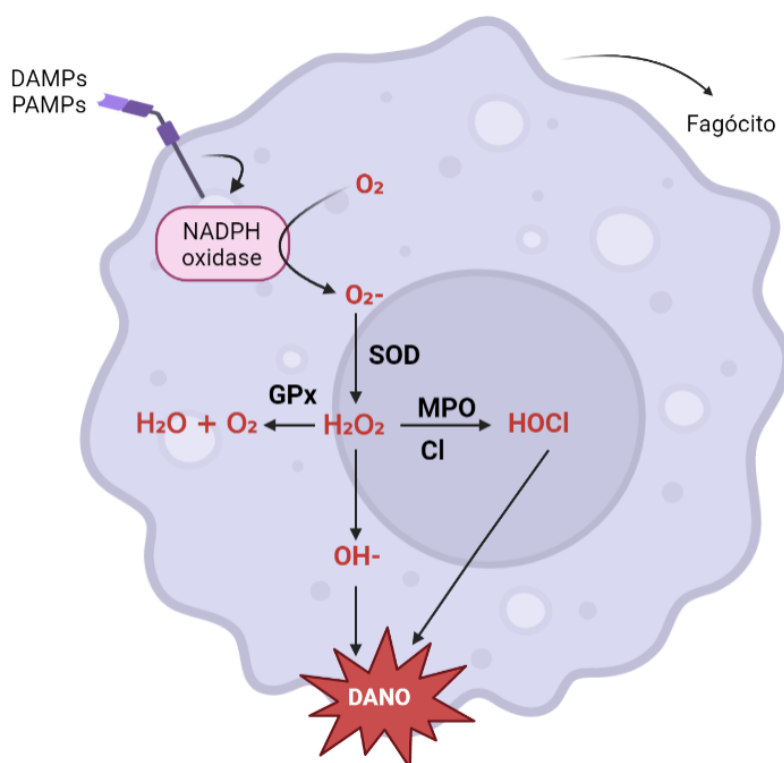


Figura 7. Inflamação e produção de espécies reativas do oxigênio. Moléculas DAMPs e PAMPs ativam fagócitos por meio da ligação a seus receptores. Em seguida, a NADPH oxidase produz o superóxido (O_2^-) que ao sofrer a ação da superóxido dismutase (SOD) é convertido em peróxido de hidrogênio que, por sua vez, pode ser convertido em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Porém, com o intuito de neutralizar o agente agressor a mieloperoxidase (MPO) converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HOCl). Este ácido além de atuar no fagossomo é lançado para o meio extracelular. Diante de um

estímulo contínuo ou exacerbado esse mecanismo leva à danos celulares e teciduais devido a produção aumentada de espécies reativas e ácido hipocloroso. PAMPs: do inglês pathogen-associated molecular patterns; DAMPs: damage-associated molecular patterns; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 25 de outubro de 2022).

4.5 Disbiose

A disbiose da microbiota intestinal tem sido apontada como um fator fundamental na fisiopatologia da NAFLD induzida pela SM (76). 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 (77). Essas funções incluem a proteção contra patógenos, melhora do sistema imune, auxílio na digestão e metabolismo e influência sobre a secreção de insulina. Um conjunto de fatores genéticos e ambientais determinam a variabilidade da microbiota intestinal de cada indivíduo, no entanto, há alguns enterotipos mais comuns e predominantes na população humana, como *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (78).

Dentre os fatores ambientais que determinam a composição da microbiota, a dieta tem um grande 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 ao desequilíbrio conhecido como disbiose (79). 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 (79,80).

Em decorrência, no fígado há ativação da resposta inflamatória através da ligação de antígenos aos receptores do tipo Toll (TRLs, do inglês *toll-like receptors*) com consequente, produção de citocinas inflamatórias e EROs (81). Além do mais, esta via inflamatória também pode ser ativada por ácidos graxos saturados presentes na dieta que, devido a estrutura similar ao LPS são capazes de ativar o TLR4 o que contribui para a lesão hepática (82).

4.6 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, estando envolvido em processos fisiológicos e patológicos (83). 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 (84).

O TA é altamente sensível a alterações no suprimento de nutrientes contribuindo para homeostase energética do organismo. Em frente ao excesso de nutrientes TA responde através da hiperplasia e hipertrofia de seus adipócitos (85). Essa expansão está associada à hipóxia, morte celular, inflamação e comprometimento do fluxo de ácidos graxos podendo desencadear alterações metabólicas como resistência à insulina e dislipidemia (86). Alterações caracterizam o TA disfuncional, condição que participa da patogênese da SM e da NAFLD.

O TA disfuncional implica em um padrão alterado do conjunto de substâncias secretadas pelo tecido, denominadas adipocinas. A leptina é uma

adipocina anorexígena que atua no sistema nervoso central suprimindo o apetite e estimulando o gasto energético (87). A adiponectina também atua centralmente influenciando o gasto energético além de reconhecidamente favorecer a sensibilização sistêmica à insulina e possuir efeitos anti-inflamatórios (88). A secreção da leptina aumenta de acordo com o aumento da massa adiposa, entretanto, apesar de elevados níveis da adipocina a obesidade abdominal está associada à uma resistência a sua ação. Já a secreção de adiponectina encontra-se reduzida nesta condição. Essa alteração no padrão de secreção de adipocinas visto em obesos sem comprometimento hepático também é encontrado em pacientes portadores da NAFLD (89).

Em resposta às adipocinas e fatores quimiotáticos liberados há infiltração de macrófagos no TA. Os macrófagos podem exibir diferentes fenótipos de acordo com o estímulo que recebem. Macrófagos M1 são conhecidos por secretar um padrão de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-6 e 2, já os macrófagos M2 secretam citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e 12. Adicionalmente ao aumento do número dos macrófagos no TA, ocorre uma mudança do perfil dessas células em direção ao perfil M1 (90). O TNF- α secretado em grandes quantidades pelos macrófagos estimula a lipólise, aumentando o fluxo de ácidos graxos para a circulação, e conseqüentemente, para o fígado (89). No órgão, esses ácidos graxos são captados através do receptor grupamento de diferenciação (CD36, do inglês cluster of differentiation) (91). podendo ser acumulados na forma de triglicerídeos ou ainda serem reconhecidos pelo TLR4, ativando o NF-kB e perpetuando a resposta inflamatória (92). É digno de nota que ambas as conseqüências do influxo de ácidos graxos para fígado podem contribuir para a extensão e progressão da NAFLD.

Considerando o volume de tecido adiposo e o seu padrão de secreção de citocinas inflamatórias presentes na SM, é prenunciado que a inflamação no tecido, além do efeito local contribua para a inflamação, estresse oxidativo e deposição de gordura hepática (93).

5 Intervenção

Atualmente as opções terapêuticas para a SM são limitadas ao tratamento individual dos fatores que a caracterizam, ou seja, tratamentos isolados para hipertensão, hiperglicemia e hipertrigliceridemia através do uso de fármacos (27). Uma outra importante recomendação, preconizada pela OMS, é a mudança de estilo de vida (MEV) que engloba a alimentação saudável aliada ao exercício físico regular. 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% (94). A Dieta do Mediterrâneo se enquadra nessas características apresentando um baixo consumo de carne vermelha, consumo moderado de vinhos e tendo como fonte principal de gordura, azeite de oliva e peixes (95). 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 (95,96). Os resultados de vários estudos observacionais transversais destacam o efeito protetor exercido pela adesão à dieta do mediterrâneo sobre os diferentes componentes da SM, seja como prevenção ou tratamento (97).

A MEV tem sido defendida como fundamental para o tratamento e prevenção da SM e, conseqüentemente, da NAFLD e sua evolução (98). Algumas recomendações nutricionais incluem redução do consumo de açúcar, em especial da frutose, além de gordura total, saturada e *trans* (99,100). Musso e colegas em sua meta análise concluíram que a perda de peso é segura em comparação aos fármacos e ainda contribui para a melhora da histologia hepática. A perda de pelo menos 3 a 5% do peso corporal já é acompanhada de uma melhora, entretanto, uma perda maior, de 7 a 10%, está associada a melhora histológica da NAFLD (101). Ademais, a combinação de uma dieta equilibrada associada a prática de exercícios físicos de moderada intensidade é a melhor opção para a manutenção do peso corporal e adiposidade e,

consequente, continuidade dos benefícios a longo prazo (100).

Atualmente a ciência tem se debruçado na busca por alternativas terapêuticas, sendo que o uso de protetores hepáticos como agentes antioxidantes tem se mostrado eficazes no controle da doença (102). Nesse contexto, compostos naturais oriundos de alimentos, denominados compostos bioativos, têm sido bastante explorados por serem capazes de modular a ativação de genes e proteínas envolvidos na gênese da esteatose, representando, portanto, uma atrativa abordagem para a terapia desta condição. Dentre esses compostos pode-se destacar o licopeno, um carotenoide reconhecido por seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (103).

6 O Licopeno

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis que fornecem a coloração laranja, amarela e vermelha à vegetais, bactérias, algas e fungos (104). Estão divididos em subgrupos de acordo com os átomos presentes em sua composição química, sendo classificados como carotenoides hidrocarbonetos (carotenos) os que possuem átomos de carbono e hidrogênio, e como oxicarotenoides (xantofilas), os que são compostos por átomos de hidrogênio e pelos menos um oxigênio. Alguns dos carotenoides podem, ainda, ser classificados de acordo com o desempenho nutricional, pois apresentam atividade provitamina A, ou seja, são precursores da vitamina A (*i.e.*, retinol) (105).

O licopeno é um carotenoide sem atividade provitamina A, encontrado alimentos como o tomate, mamão e melancia. O composto exibe uma estrutura simétrica e acíclica, contendo onze duplas ligações conjugadas e duas ligações não conjugadas (Figura 8). Geometricamente, o licopeno pode apresentar-se na forma *cis* e *trans*, fator influente na sua biodisponibilidade (106).

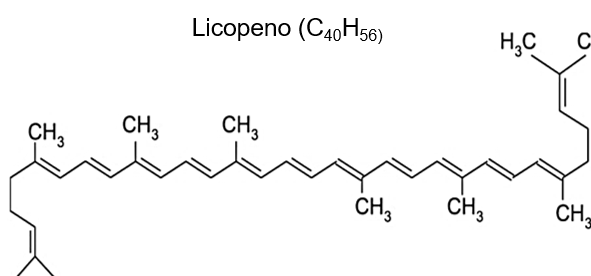


Figura 8. Fórmula estrutural e molecular do licopeno. O licopeno é composto por átomos de hidrogênio e de carbono, apresentando onze duplas ligações conjugadas e duas ligações não conjugadas.

A capacidade antioxidante dos carotenoides está relacionada ao seu número de duplas ligações conjugadas. Tal relação torna o licopeno um dos antioxidantes mais potentes dentre os carotenoides (107), apresentando especial habilidade em se ligar ao oxigênio *singlet* além de interagir com as EROs, como o H₂O₂ (108). Somado ao caráter antioxidante o licopeno tem se mostrado um agente anti-inflamatório que contribui para o controle de diversas doenças. O consumo de tomates e seus subprodutos estão associados a limitação do risco de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares. Sendo que os níveis séricos e teciduais de licopeno são inversamente relacionados à incidência dos cânceres de próstata e de mama (109). Para mais, tem-se observado o potencial terapêutico do licopeno no tratamento da NAFLD (103).

6.1. Fontes de licopeno

Os carotenoides estão presentes em organismos fotossintéticos de modo que o organismo humano não é capaz de produzi-los. Assim, devem ser consumidos através da dieta. O tomate apesar de não ser o alimento com maior fonte de licopeno (Tabela 2), caracteriza-se como principal, por ser extensamente consumido (110).

Tabela 2. Quantidade de licopeno presente em suas principais fontes (111).

Alimentos	Quantidade de Licopeno (µg/g)
Melancia	23 a 72
Goiaba	54
Toranja	33
Mamão papaya	20 a 53
Tomate	8,8 a 42

O conteúdo de licopeno presente nos tomates, como pode ser observado na Tabela 1, sofre variações de acordo com o tipo e o estágio de amadurecimento. Quanto mais maduro e vermelho for o tomate maior será o seu conteúdo de licopeno (112). Os alimentos à base de tomate também são importantes fontes de licopeno na dieta. O conteúdo do carotenoide de alguns desses produtos pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Conteúdo de licopeno em produtos à base de tomate (111).

Produtos	Quantidade de Licopeno (µg/g)
Tomate cozido	37
Molho de tomate	62
Sopa de tomate	79
Tomate em pó	1126,3 a 1264,9
Suco de tomate	56 a 116
Ketchup	99 a 134,4

O consumo de licopeno varia de acordo com a população estudada. Considerando os tomates uma fonte significativa de licopeno, é esperado que o licopeno represente a maior proporção de carotenoides consumidos através da dieta entre os italianos, aproximadamente 7,4mg/dia. Isso devido a típica culinária do país. Já a média de ingestão diária na Espanha é de 3,8mg, 4,8mg na França, e no Reino Unido é de 1,1mg (113).

6.2 Absorção, Transporte e Metabolismo

A absorção intestinal do licopeno inclui diversas etapas. Primeiramente,

o licopeno é liberado da matriz alimentar através da ação mecânica do trato digestório e, então emulsificado através dos sais biliares na luz intestinal (113). Durante esse processo é possível que ocorra a isomerização da molécula, alterando sua configuração *trans* para *cis*-licopeno, isômero encontrado nos tecidos corporais (114). Posteriormente, o licopeno é incorporado às micelas e passivamente captado pelos enterócitos. Esse processo pode ser facilitado através do transportador de membrana de colesterol receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI, do inglês *scavenger receptor class B type I*). No interior dos enterócitos o licopeno é incorporado aos quilomícrons juntamente com os lipídios dietéticos seguindo o mesmo destino destes, ou seja, entrando no sistema linfático e, posteriormente, a circulação sanguínea e tecidos (113, 115).

Nessa rota, parte do licopeno pode ser absorvido pelos tecidos periféricos conforme a LPL degrada os quilomícrons. O quilomícron remanescente é levado ao fígado via receptores LDL, onde o licopeno pode ser também estocado nos hepatócitos. Ainda, parte das moléculas de licopeno podem ser reincorporada em lipoproteínas e voltar à circulação (116). Enzimas expressas nos tecidos, incluindo o trato gastrointestinal e o fígado são responsáveis pela clivagem do licopeno. Parte do composto ingerido na alimentação é absorvida em sua forma intacta, enquanto outra parte é clivada nos enterócitos. Os metabólitos atingem a circulação e chegam ao fígado. Tanto no trato gastrointestinal quanto nos tecidos, o licopeno sofrerá ação das enzimas β -carotene 15,15'-oxygenase (BCO1) e β -carotene-9',10'-oxygenase (BCO2), a primeira é responsável pela clivagem central da molécula e, a segunda, é responsável pela clivagem das extremidades (Figura 9) (116). Os metabólitos originados pela clivagem podem apresentar atividade biológica específicas e não específicas, *in vivo* e *in vitro*, assim como a molécula intacta de licopeno (117).

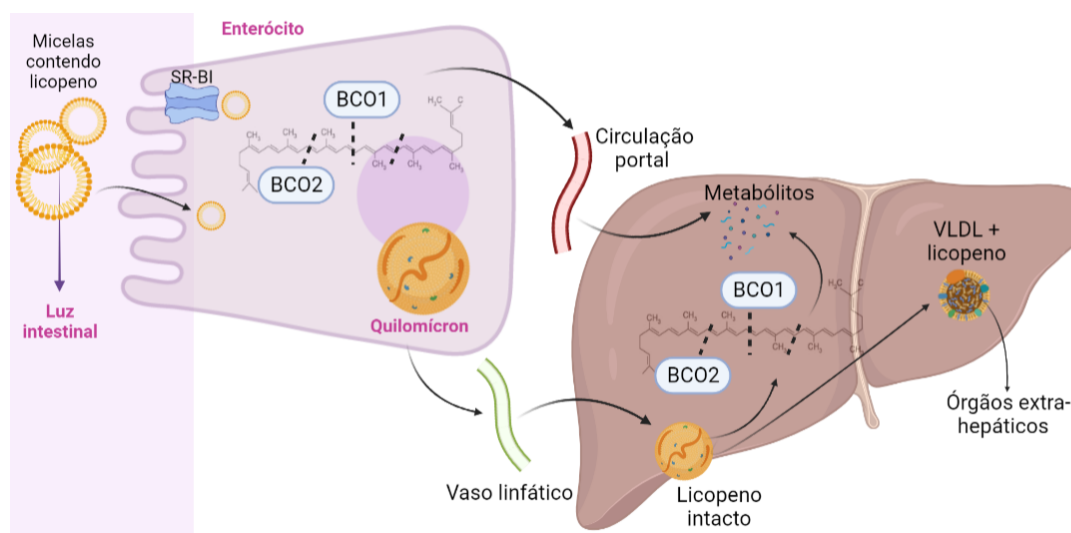


Figura 9. Absorção, transporte e metabolismo do licopeno. O licopeno é incorporado às micelas na luz intestinal e adentra o enterócitos passivamente e via SR-BI. Parte do licopeno é mantida intacta e parte é clivada por enzimas. Moléculas intactas são incorporados aos quilomícrons e direcionados para os vasos linfáticos e chegam ao fígado, os metabólitos atingem a circulação portal e depois ao chegam ao fígado. No fígado, moléculas intactas podem ser clivadas. Metabólitos podem apresentar atividade biológica no órgão, e o licopeno intacto é transportado via lipoproteínas para outros tecidos. SR-BI: receptor *scavenger* classe B tipo I, BCO1: β -carotene 15,15'-oxygenase e BCO2: β -carotene-9',10'-oxygenase. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 08 de novembro de 2022).

6.3 Biodisponibilidade

A biodisponibilidade do licopeno é influenciada por vários aspectos incluindo a composição da dieta e o processamento do alimento. O carotenoide é um composto lipossolúvel, por conseguinte, o seu consumo associado a uma fonte de gordura potencializa sua biodisponibilidade. Brown e colegas (118) avaliaram a biodisponibilidade do licopeno após a ingestão de salada contendo espinafre, alface, tomate e cenoura acrescida de 0, 6 ou 28g de óleo de canola. Foi observado que a presença de licopeno nos quilomícrons plasmáticos foi

proporcional à quantidade de óleo presente no molho das saladas. O licopeno derivado de tomates frescos e não processados é pobremente absorvido. A absorção é maior a partir de alimentos processados como molho de tomate aquecido em óleo (119). Isto pois, além de seu caráter lipossolúvel o licopeno está localizado nos cloroplastos ou cromoplastos das células vegetais. O processamento, quer térmico quer mecânico, é capaz de romper a parede celular vegetal tornando o licopeno disponível para ser absorvido (120).

As plantas usualmente apresentam o isômero *trans*-licopeno. Entretanto, as formas *cis*-licopeno são mais facilmente absorvidas pelas células intestinais por serem mais lipossolúveis e, portanto, preferencialmente empacotadas em micelas no momento da absorção. A cocção, ou seja, a exposição à energia térmica, além da exposição à luz e ácidos são responsáveis pela isomerização do licopeno, *trans* para *cis*-licopeno, favorecendo sua absorção (106). Nos tecidos de humanos, quando mensurado a concentração de licopeno, de 35 a 79% corresponde a forma *cis* (121). Além da isomeria geométrica, outro fator que pode interferir na biodisponibilidade do licopeno de frutas e vegetais *in natura* é a presença de fibras dietéticas. Alguns tipos de fibras, como a pectina, podem reduzir a biodisponibilidade do licopeno, prejudicando a sua absorção devido ao aumento da viscosidade (122).

6.4 Distribuição para os Tecidos

Uma vez absorvido o licopeno é transportado pela corrente sanguínea à diversos órgãos onde pode ser armazenado. Na circulação, enquanto outros carotenoides são primariamente carregados como colesterol HDL, o licopeno circula majoritariamente como colesterol LDL, sendo que do conteúdo de licopeno consumido 58 a 73% é carregado pela LDL, 17 a 26% pela HDL e 10 a 16% pela VLDL (116,123). Os receptores SR-BI estão expressos em diversos tecidos além dos enterócitos, dessa forma, medeiam essa transferência de carotenoides/licopeno entre lipoproteínas e tecidos, assim como o CD36 (121).

A distribuição do licopeno nos tecidos é heterogênea o que está

relacionado com seus efeitos biológicos em alguns tecidos em detrimento de outros. As maiores concentrações de licopeno são encontradas no fígado, testículos, glândulas adrenais, tecido adiposo e próstata (109). Sendo que o fígado se caracteriza como principal órgão de depósito de licopeno o que justifica sua ação sobre processos fisiopatológicos relacionados a patologias como a NAFLD (124).

6.5 Oleorresina de Tomate

Atingir as elevadas dosagens de licopeno propostas na literatura, através de seus alimentos fontes, é uma alternativa inviável (125, 126). Portanto, faz-se necessária a utilização de extratos, como a oleorresina de tomate. Nestes complexos de licopeno de tomate, também são encontrados, em menores concentrações, carotenoides, tocoferóis e fitosteróis (127). Pesquisas tem demonstrado inúmeros benefícios da utilização da oleoresina de tomate em componentes da SM, podendo-se considerar que a atividade do licopeno pode ser aprimorada por meio de sua relação sinérgica com os demais antioxidantes que ocorrem naturalmente no tomate (15, 16, 128, 129).

7 Justificativa

O consumo excessivo da dieta ocidental está associado a alterações metabólicas que caracterizam a SM. Nesse trabalho, foi adotado um modelo de indução dietético baseado em uma dieta que mimetiza a dieta ocidental, composta por uma dieta rica em carboidratos simples e gordura, acrescida de 25% de sacarose na água de beber. Esse padrão dietético é capaz de promover alterações ponderais, elevação de glicose e triglicerídeos séricos, hipertensão e acúmulo hepático de gordura, compondo a constelação de fatores que integram a SM.

Avanços metodológicos permitiram a análise de metabólitos, abordagem chamada de metabolômica, que tem sido particularmente útil e

muito explorada para o estudo de doenças metabólicas crônicas com fisiopatologias complexas devido as múltiplas interações entre fatores que as causam. Assim, espera-se que o emprego dessa abordagem forneça informações e *insights* adicionais sobre os mecanismos dos processos e funções biológicas, aumentando o conhecimento sobre o desenvolvimento e a progressão da doença.

Considerando a importância do impacto da SM e sua consequência hepática, a NAFLD, para a saúde coletiva, esse trabalho verificou o papel da oleoresina de tomate sobre tal condição, uma vez que o potencial terapêutico do carotenoide está relacionado à importantes processos vinculados ao desenvolvimento da patologia. Dessa forma, esse projeto tem como hipótese que a suplementação com oleoresina de tomate é capaz de impactar o perfil metabolômico hepático de ratos portadores de SM. Já que o licopeno parece modular importantes processos metabólicos do organismo, diminuindo a gravidade de fatores de risco para complicações futuras da SM, restabelecendo a funcionalidade de órgãos vitais (Figura 10).

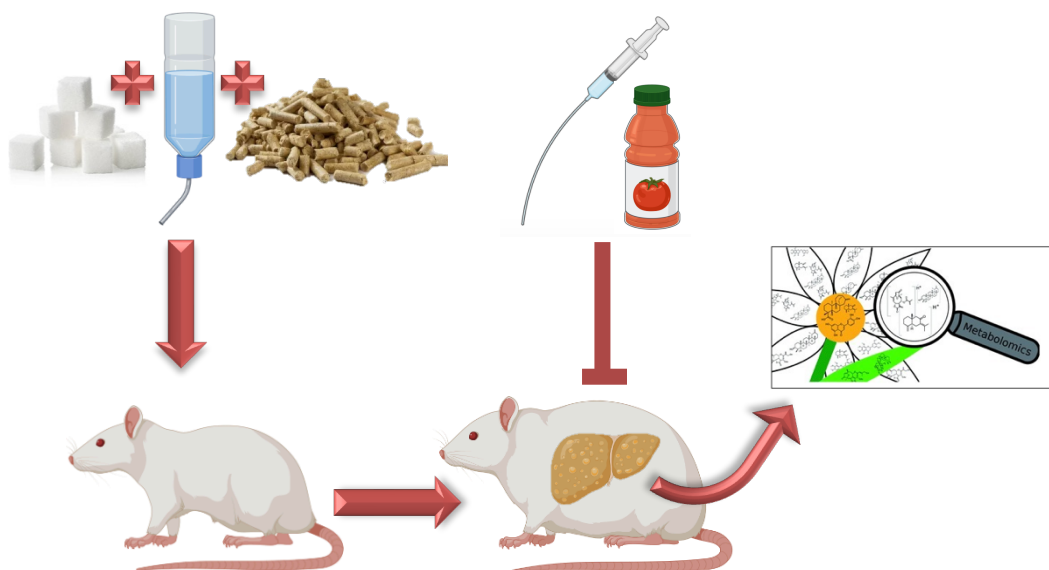


Figura 10. Hipótese do trabalho. Considerando que o licopeno está envolvido em importantes processos metabólicos do organismo, esse trabalho hipotetiza que a oleoresina de tomate altera o perfil metabolômico hepático de ratos portadores de síndrome metabólica induzida por uma dieta rica em açúcar e

gordura. Figura criada com ilustrações disponíveis em <https://biorender.com/> (acesso em 04 de abril de 2023)

8 Objetivos

8.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito da suplementação com o licopeno sobre o metaboloma hepático de ratos portadores de síndrome metabólica.

8.2 Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar a presença da síndrome metabólica;
- 2) Avaliar a presença de triglicerídeos hepáticos;
- 3) Verificar a biodisponibilidade tecidual do licopeno.

Referências Bibliográficas

1. Popkin BM. Nutrition Transition and the Global Diabetes Epidemic. *Curr Diab Rep.* 2015;15(9):64.
2. 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.
3. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Now and then: the global nutrition transition: the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev.* 2012;70(1):3-21.
4. Baker P, Machado P, Santos T, Sievert K, Backholer K, Hadjikakou 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.
5. Myles IA. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. *Nutr J.* 2014;13(1):61.

6. World Health Organization. Noncommunicable diseases [Internet]. Geneva: WHO; 2017 [citado em 14 de setembro de 2022]. (Fact sheet; 355). 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>
7. Monteiro CA, Cannon G, Levy RB, Moubarac JC, Louzada ML, Rauber F, et al. Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public Health Nutr.* 2019;22(5):936–41.
8. Gibney MJ, Forde CG, Mullally D, Gibney ER. Ultra-processed foods in human health: a critical appraisal. *Am J Clin Nutr.* 106(3):717-24.
9. World Health Organization. Obesity and overweight [Internet]. Geneva: WHO; 2021 [citado em 14 de setembro de 2022]. (Fact sheet; 311). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/#>
10. Brasil. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2016 [Internet]. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2019 [citado em 22 de março de 2023]. Available from: https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2021/07/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco-1-2.pdf
11. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 2018;20(2):12.
12. Silveira Rossi JL, Barbalho SM, Reverete de Araujo R, Bechara MD, Sloan KP, Sloan LA. Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: going beyond traditional risk factors. *Diabetes Metab Res Rev.* 2022;38(3):e3502.
13. Muzurović E, Mikhailidis DP, Mantzoros C. Non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance, metabolic syndrome and their association with vascular risk. *Metabolism.* 2021;119:154770.
14. Oliveira LVA, Santos BNS, Machado ÍE, Malta DC, Velasquez-Melendez G, Felisbino-Mendes MS. Prevalência da Síndrome Metabólica e seus componentes na população adulta brasileira. *Cien Saude Colet.* 2020;25(11):4269–80.
15. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Brussels: IDF; 2006.
16. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005;112(17):2735-52.
17. Merchán-Hamann E, Taui PL, Costa MP. Terminologia das medidas e indicadores em epidemiologia: subsídios para uma possível padronização da nomenclatura. *Inf Epidemiol Sus.* 2000;9(4):276-84.

18. Benchoula K, Khatib A, Jaffar A, Ahmed QU, Sulaiman WMAW, Wahab RA, et al. The promise of zebrafish as a model of metabolic syndrome. *Exp Anim*. 2019;68(4):407–16.
19. Aleixandre de Artiñano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 2009;102(9):1246–53.
20. Bulboacă A, D Bolboacă S, Suci S. Protective effect of curcumin in fructose-induced metabolic syndrome and in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2016;19(6):585–93.
21. Ermolenko E, Simanenkova A, Voropaeva L, Lavrenova N, Kotyleva M, Minasian S, et al. Metformin influence on the intestinal microbiota and organism of rats with metabolic syndrome. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12):6837.
22. Moreno-Fernández S, Garcés-Rimón M, Vera G, Astier J, Landrier J, Miguel M. High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients*. 2018;10(10):1502.
23. Buyco DG, Martin J, Jeon S, Hooks R, Lin C, Carr R. Experimental models of metabolic and alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2021;27(1):1–18.
24. Zhou X, Li Z, Qi M, Zhao P, Duan Y, Yang G, et al. Brown adipose tissue-derived exosomes mitigate the metabolic syndrome in high fat diet mice. *Theranostics*. 2020;10(18):8197–210.
25. Albrahim T, Alonazi MA. Lycopene corrects metabolic syndrome and liver injury induced by high-fat diet in obese rats through antioxidant, anti-inflammatory, and antifibrotic pathways. *Biomed Pharmacother*. 2021; 141: 111831.
26. Siqueira JS, Vieira TA, Nakandakare-Maia ET, Palacio TLN, Sarzi F, Garcia JL, et al. Bergamot leaf extract treats cardiorenal metabolic syndrome and associated pathophysiological factors in rats fed with a high sugar fat diet. *Mol Cell Endocrinol*. 2022; 556: 111721.
27. McCracken E, Monaghan M, Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*. 2018;36(1):14–20.
28. Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):881–7.
29. Jensen MD. Is visceral fat involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome? Human model. *Obesity*. 2006;14 Suppl 1:20S-4.
30. Buyco DG, Martin J, Jeon S, Hooks R, Lin C, Carr R. Experimental models of metabolic and alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*.

2021;27(1):1–18.

31. Juza RM, Pauli EM. Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians. *Clin Anat*. 2014;27(5):764–9.
32. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 13a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2017.
33. Dângelo JG, Fattini CA. *Anatomia humana sistêmica e segmentar*. 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2011.
34. Junqueira LCCJ. *Histologia básica*. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
35. Gebhardt R. Liver zonation: novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(26):8491.
36. Corless JK. Normal liver function. A basis for understanding hepatic disease. *Arch Intern Med*. 1983;143(12):2291–4.
37. Chen L, Tuo B, Dong H. Regulation of intestinal glucose absorption by ion channels and transporters. *Nutrients*. 2016;8(1):43.
38. Adeva-Andany MM, Pérez-Felpete N, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pazos-García C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci Rep*. 2016;36(6):e00416.
39. Softic S, Stanhope KL, Boucher J, Divanovic S, Lanaspá MA, Johnson RJ, et al. Fructose and hepatic insulin resistance. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57(5):308–22.
40. DeBosch BJ, Chen Z, Saben JL, Finck BN, Moley KH. Glucose Transporter 8 (GLUT8) mediates fructose-induced de novo lipogenesis and macrosteatosis. *J Biol Chem*. 2014;289(16):10989–98.
41. Legeza B, Marcolongo P, Gamberucci A, Varga V, Bánhegyi G, Benedetti A, et al. Fructose, glucocorticoids and adipose tissue: implications for the metabolic syndrome. *Nutrients*. 2017;9(5):426.
42. Alves-Bezerra M, Cohen DE. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 2017;8(1):1-8.
43. Zandoni P, Velagapudi S, Yalcinkaya M, Rohrer L, von Eckardstein A. Endocytosis of lipoproteins. *Atherosclerosis*. 2018; 275: 273–95.
44. Jackson AA. Nutrition and liver health. *Dig Dis*. 2017;35(4):411–7.
45. Moschen AR, Tilg H. Nutrition in pathophysiology and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.

2008;11(5):620–5.

46. Raza S. Current treatment paradigms and emerging therapies for NAFLD/NASH. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021;26(2):206-37.
47. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64(1):73–84.
48. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23(47):8263–76.
49. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015;62(1):S47–64.
50. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(1):11–20.
51. Lazarus JV, Colombo M, Cortez-Pinto H, Huang TTK, Miller V, Ninburg M, et al. NAFLD — sounding the alarm on a silent epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(7):377–9.
52. Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, et al. Fructose and sugar: a major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018;68(5):1063–75.
53. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343–51.
54. Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. 2016;65(8):1038–48.
55. Mirmiran P, Amirhamidi Z, Ejtahed HS, Bahadoran Z, Azizi F. Relationship between diet and non-alcoholic fatty liver disease: a review article. *Iran J Public Health*. 2017;46(8):1007–17.
56. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67(1):328–57.
57. Serlie M. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2017;9(9):981.
58. 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.

59. 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.
60. Ježek J, Cooper KF, Strich R. reactive oxygen species and mitochondrial dynamics: the yin and yang of mitochondrial dysfunction and cancer progression. *Antioxidants (Basel)*. 2018;7(1):13.
61. Long Q, Yang K, Yang Q. Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. *Am J Cardiovasc Dis*. 2015;5(1):19–32.
62. Semchyshyn HM. Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects. *Sci World J*. 2014:417842.
63. 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.
64. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015;21(5):739–46.
65. Eirin A, Lerman A, Lerman LO. Enhancing mitochondrial health to treat hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(10):89.
66. 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.
67. Masarone M, Rosato V, Dallio M, Gravina AG, Aglitti A, Loguercio C, et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 9547613.
68. Patterson RE, Kalavalapalli S, Williams CM, Nautiyal M, Mathew JT, Martinez J, et al. Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;310(7): E484-94.
69. Petersen MC, Shulman GI. Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(7):649–65.
70. Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res*. 2013;52(1):165–74.

71. Grootjans J, Kaser A, Kaufman RJ, Blumberg RS. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(8):469–84.
72. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428–35.
73. Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*. 2014;395(2):203–30.
74. Paiva CN, Bozza MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(6):1000–37.
75. Kosaka T, Fukui R, Matsui M, Kurosaka Y, Nishimura H, Tanabe M. RAGE, receptor of advanced glycation end-products negatively regulates chondrocytes differentiation. *PLoS One*. 2014;9(9): e108819.
76. Wang PX, Deng XR, Zhang CH, Yuan HJ. Gut microbiota and metabolic syndrome. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(7):808–16.
77. 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.
78. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020;113(12):2019–40.
79. Weiss GA, Hennot T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci* 2017;74(16):2959–77.
80. Tilg H, Zmora N, Adolph TE, Elinav E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(1):40–54.
81. Brenner DA, Paik YH, Schnabl B. Role of gut microbiota in liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2015;49 Suppl 1: S25–7.
82. Huang S, Rutkowski JM, Snodgrass RG, Ono-Moore KD, Schneider DA, Newman JW, et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res*. 2012;53(9):2002–13.
83. Choi CHJ, Cohen P. Adipose crosstalk with other cell types in health and disease. *Exp Cell Res*. 2017;360(1):6–11.
84. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(2):216–29.
85. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2094–101.

86. 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.
87. Kelesidis T. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med*. 2010;152(2):93-100.
88. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(2):101-9.
89. Parker R. The role of adipose tissue in fatty liver diseases. *Liver Res*. 2018;2(1):35-42.
90. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.
91. Wilson CG, Tran JL, Erion DM, Vera NB, Febbraio M, Weiss EJ. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-Fed mice. *Endocrinology*. 2016;157(2):570-85.
92. Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, et al. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor- κ B pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*. 2009;126(2):233-45.
93. Stolarczyk E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Curr Opin Pharmacol*. 2017; 37:35-40.
94. World Health Organization. Fact sheets: cardiovascular disease. Geneva: WHO; 2021 [citado em 01 de novembro de 2022]. (Fact sheet; Cardiovascular diseases CVDs). Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
95. Giugliano D, Esposito K. Mediterranean diet and metabolic diseases. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(1):63-8.
96. 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.
97. Finicelli M, Squillaro T, di Cristo F, di Salle A, Melone MAB, Galderisi U, et al. Metabolic syndrome, Mediterranean diet, and polyphenols: evidence and perspectives. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5807-26.
98. Smolle E, Kessler SM, Golob N, Haybaeck J. Nonalcoholic fatty liver disease. In: *Metabolic syndrome*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 641-57.

99. Hazlehurst JM, Woods C, Marjot T, Cobbold JF, Tomlinson JW. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism*. 2016;65(8):1096–108.
100. ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2017;9(9):981.
101. Musso G, Cassader M, Rosina F, Gambino R. Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Diabetologia*. 2012; 55(4):885–904.
102. Adams LA. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Postgrad Med J*. 2006;82(967):315–22.
103. Ferramosca A, di Giacomo M, Zara V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: new insights and updates. *World J Gastroenterol*. 2017;23(23):4146.
104. Saini RK, Prasad P, Lokesh V, Shang X, Shin J, Keum YS, et al. Carotenoids: dietary sources, extraction, encapsulation, bioavailability, and health benefits—A review of recent advancements. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(4):795.
105. Langi P, Kiokias S, Varzakas T, Proestos C. Carotenoids: from plants to food and feed industries. *Methods Mol Biol*. 2018; 1852:57-71.
106. van het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JGAJ. Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr*. 2000;130(3):503–6.
107. Sies H, Stahl W. Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human. *Exp Biol Med*. 1998;218(2):121–4.
108. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*. 2003;24(6):345–51.
109. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ*. 2000;163(6):739–44.
110. Bramley PM. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry*. 2000;54(3):233–6.
111. Rao AV, Agarwal S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr Res*. 1999;19(2):305–23.
112. Moritz B, Tramonte VLC. Biodisponibilidade do licopeno. *Rev Nutr*. 2006;19(2):265–73.
113. Story EN, Kopec RE, Schwartz SJ, Harris GK. An update on the health

- effects of tomato lycopene. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2010;1(1):189–210.
114. During A, Harrison EH. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys*. 2004;430(1):77–88.
115. Parker RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J*. 1996;10(5):542–51.
116. Wang XD. Lycopene metabolism and its biological significance. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(5):1214S–22S.
117. Ford NA, Erdman JW. Are lycopene metabolites metabolically active? *Acta Biochim Pol*. 2012;59(1):1–4.
118. Brown MJ, Ferruzzi MG, Nguyen ML, Cooper DA, Eldridge AL, Schwartz SJ, et al. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(2):396–403.
119. Gärtner C, Stahl W, Sies H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr*. 1997;66(1):116–22.
120. Richelle M, Bortlik K, Liardet S, Hager C, Lambelet P, Baur M, et al. A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. *J Nutr*. 2002;132(3):404–8.
121. Moran NE, Mohn ES, Hason N, Erdman JW, Johnson EJ. Intrinsic and extrinsic factors impacting absorption, metabolism, and health effects of dietary carotenoids. *Adv Nutr*. 2018;9(4):465–92.
122. Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev Nutr*. 2004;17(2):227–36.
123. Moran NE, Erdman JW, Clinton SK. Complex interactions between dietary and genetic factors impact lycopene metabolism and distribution. *Arch Biochem Biophys*. 2013;539(2):171–80.
124. Jiang W, Guo MH, Hai X. Hepatoprotective and antioxidant effects of lycopene on non-alcoholic fatty liver disease in rat. *World J Gastroenterol*. 2016;22(46):10180.
125. Wang W, Yang W, Shen Z, Wen S, Hu M. The Dose–Response Effect of Lycopene on Cerebral Vessel and Neuron Impairment Induced by Hyperlipidemia. *J Agric Food Chem*. 2018 Dec 19;66(50):13173–82.
126. Wang Y, Cui R, Xiao Y, Fang J, Xu Q. Effect of Carotene and Lycopene on the Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS One*. 2015 Sep 15;10(9):e0137427.

127. Lycored. Lycomato®. Disponível em: <https://www.lycored.com/lycomato/>. Acesso em: 26 de março de 2023.
128. Mariane R, Garcia L, Cristina C, Silva DA, Junio A, Ferron T, et al. Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(8):276.
129. Ferron AJT, Francisqueti-Ferron FV, Silva CCVA, Bazan SGZ, Campos DHS, Garcia JL, et al. Tomato-Oleoresin Anti-Inflammatory Effect Recovers Obesity-Induced Cardiac Dysfunction by Modulating Myocardial Calcium Handling. *Cell Physiol Biochem*. 2020 Oct 7;54(5):1013-1025.

Capítulo 2
Artigo Científico

Metabolomic analysis reveals novel functions of tomato oleoresin supplementation in the liver of rats with diet-induced metabolic syndrome

Mariane Róvero Costa¹, Jéssica Leite Garcia¹, Artur Junio Togneri Ferron¹, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron¹, Rachel Paes de Araujo³, Carol Cristina Vágula de Almeida Silva¹, Cristina Schmitt Gregolin¹, Luciana Ghiraldeli¹, Luís A. J. Mur³, Ana Lúcia dos Anjos Ferreira¹, Camila Renata Correa¹ and Fernando Moreto¹

¹ Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil; marianerovero@gmail.com; jessleitegarcia@gmail.com; artur.ferron@gmail.com; fabianevf@gmail.com; carolvagula@gmail.com; cristina.s.gregolin@gmail.com; lughiraldeli@fmb.unesp.br; ferreira@fmb.unesp.br; correa.camila9@gmail.com; fer_moreto@yahoo.com.br

² University of Wales, Aberystwyth, United Kingdom; rap23@aber.ac.uk; lum@aber.ac.uk

* Correspondence: marianerovero@gmail.com; Tel.: +55-14-3880-1722, Botucatu 18618, Brazil

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: MetS features are drivers for the development of liver consequences. Lycopene is an antioxidant whose protective potential on MetS-related liver disorders has been investigated. Aim: The aim was to verify the effects of lycopene supplementation, offered through tomato oleoresin, on the hepatic metabolomic profile in a diet-induced metabolic syndrome model. Methods: Wistar rats were distributed into two experimental groups. Control (Co, n = 12) and high sugar-fat diet (HSFD, n = 12). After 20 weeks, the animals were redistributed into the control (Co, n = 6), control supplemented with lycopene (Co+Lyc, n = 6), Metabolic Syndrome (MetS, n = 6), and MetS

supplemented with lycopene (MetS+Lyc, n = 6). Animals received lycopene solution (10 mg/kg/day) or vehicle (corn oil) via gavage for 10 weeks. Results: Supplementation with tomato oleoresin promoted a decrease in plasma levels of glucose and triglycerides, and an increase in HDL levels. The compound attenuated triglyceride levels in liver tissue. Metabolic analysis revealed increased levels of two branched-chain amino acids (BCAA, L-leucine, and L-Isoleucine) by lycopene. Conclusion: Tomato oleoresin supplementation treated MetS features and their consequences in the liver and increased Sphinganine 1-phosphate and restored L-leucine, D-leucine and L-isoleucine hepatic levels.

Keywords: lycopene, tomato oleoresin, high sugar-fat diet, metabolomic, NAFLD, metabolic syndrome.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is a relevant public health challenge strongly correlated to genetic and environmental factors including socioeconomic status, eating habits, and restricted physical activity [1,2]. Currently, this condition affects more than 1 billion people worldwide and its incidence often rises alongside the incidences of obesity and type 2 diabetes mellitus [1]. MetS is a pathologic condition characterized by abdominal obesity, hyperglycemia, insulin resistance, hypertension, and dyslipidemia (3). Not being considered a disease itself, is a term that highlights traits that promote an increased risk of chronic diseases. MetS features act synergistically leading to a greater risk of negative health outcomes than the presence of these factors alone [1,4].

The cluster of metabolic abnormalities found in MetS confers important pathophysiological aspects that lead to liver impairment. The liver is the site of metabolism of key MetS components, such as glucose and circulating lipids influenced by dietary factors [3]. Patients with MetS often have an increase in triglyceride accumulation

in the liver and hepatic insulin resistance, which contributes to the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [5]. NAFLD is a spectrum of changes ranging from simple steatosis to biochemical and functional abnormalities in the liver, which may result in an inflammatory process known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH), and may progress to hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma [6]. It is hypothesized that these liver disorders are the result of multiple insults including an imbalance of hepatic lipid flux, insulin resistance, inflammation, oxidative stress, genetic and epigenetic mechanisms, environmental elements, and microbiota changes [7]. Therefore, it is clear that MetS play a central role in the genesis of NAFLD.

The current approach to the MetS treatment is based on pharmacological drugs for the individual treatment of the manifestations, in other words, isolated treatments for hypertension, hyperglycemia, and hypertriglyceridemia [8]. Another approach is a lifestyle change, improving eating habits and the physical activity level. Therefore, the investigation of alternative therapeutic strategies could be an interesting advantage, as well as the use of bioactive compounds [9].

Lycopene is a carotenoid without provitamin A activity, which gives red colors to vegetables such as tomatoes, red grapefruit, watermelon, and apricots [10]. This carotenoid is a powerful antioxidant with anti-inflammatory activity [10,11], which has been shown to modulate important metabolic processes in the body, attenuating risk factors for metabolic diseases and restoring liver function, mediating the mechanisms that underlying MetS and its consequences [12]. Lycopene is a liposoluble compound depending on dietary lipids to be absorbed and is preferentially accumulated in the liver, being one of the main storage organs of lycopene [13], thus, from this point of view, the investigation of the effects of lycopene on hepatic metabolites can unveil a panorama of therapeutic targets. There by, this study aimed to verify the effects of lycopene

supplementation, offered through tomato oleoresin, on the hepatic metabolomic profile in a diet-induced metabolic syndrome model.

2. Materials and Methods

2.1 Experimental Design

Eight-week-old male Wistar rats were randomized into two groups, fed different diets to induce the metabolic changes seen in metabolic syndrome: control diet (n=12) and high sugar fat diet (HSFD) (n=12). The diets were developed by our research group and the composition has been described previously by Francisqueti et al., [14]. Briefly, both diets are nutritionally balanced for micronutrients, but with differences in macronutrient quality. The control diet is composed by soybean meal, sorghum, soybean peel, dextrin, soybean oil, vitamins and minerals. The HSFD was designed to mimic the development of MetS associated with western dietary habits, being composed of soybean meal, sorghum, soybean peel, dextrin, sucrose, fructose, lard, vitamins and minerals and addition of 25% sucrose in drinking water.

The animals were kept in a controlled environment of temperature (22 ± 3 °C), humidity (relative humidity of $60\pm5\%$), and luminosity (12h light-dark cycle) with feed and water ad libitum. After twenty weeks, the MetS was determined by changes in body weight, fast blood glucose, and plasma triglycerides. As animals submitted to different diet models do not always present the expected response, which can lead to errors in the classification, a separation point based on body weight, plasma triglycerides and glucose was established. A 95% confidence interval was built for body weight, fasting glucose and plasmatic triglycerides for the control and HSFD groups. It was adopted as the point of separation between the groups, the midpoint between the upper limit of the control group and the lower limit of the HSF group. From the data the MetS was characterized and the animals that didn't developed MetS were excluded from the experiment. For the study of the treatment with tomato oleoresin supplementation, the

animals were redistributed into four experimental groups: control (Co, n=6), control supplemented with tomato oleoresin (Co+Lyc, n=6), metabolic syndrome (MetS, n=6) and metabolic syndrome supplemented with tomato oleoresin (MetS+Lyc, n=6). This procedure was performed over a period of 10 weeks to verify the effect of lycopene treatment on MetS parameters.

2.2 Tomato Oleoresin Supplementation

The tomato oleoresin (Lyc-O-Mato® 6% dewaxed; LycoRed Natural Products Industries, Beersheba, Israel) was mixed with corn oil and stored in a dark place at 4 °C. Before the use of the mixture of tomato oleoresin and corn oil was placed in the water bath for 20 minutes at 54 °C. The lycopene desired concentration and stability were checked by diode-array spectra at 450nm [15]. The animals received the tomato oleoresin (10mg/kg/day) via gavage for 10 weeks, the content of lycopene was 5mg/ml [16]. The non-tomato oleoresin-supplemented groups received corn oil as a vehicle via gavage. To ensure the same energy supply, the four groups received the same corn oil amount (2 ml/kg/day).

2.3 Euthanasia and Samples Collection

All the experimental protocol were approved by Ethics Committee on Animal Experiments of the Botucatu Medical School, UNESP (protocol number 1266/2018) and conducted following the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [17]. After 30 weeks of the experiment, following the systolic blood pressure (SBP) evaluation, the animals were fasted for 8 hours, fasting blood glucose was evaluated and then the animals were anesthetized (thiopental 120 mg/kg/i.p.) and euthanized by decapitation after verification of the absence of foot reflex. Blood samples were collected, and the plasma was separated by centrifugation (800 × g at 4 °C for 10 min) for metabolic analyzes. The adipose tissue was isolated, dissected, and weighted for adiposity

index calculation. For further analysis, blood and liver tissue were collected and frozen at -80°C in sterile cryotubes.

2.4 Nutritional Profile

The nutritional profile of the animals was assessed by caloric intake, final body weight, and weight gain. Food and water intake were daily calculated from the individual leftovers of each animal, and after 30 weeks of experiment the average caloric intake was determined by multiplying the energy value of each diet ($g \times Kcal$) by the daily food consumption. The caloric intake for the groups fed with HSFD also included the calories from 25% sucrose added to drinking water. The following formulas were used for the calculation:

1. Control diet: caloric intake (kcal/day) = chow intake (g) $\times$ energy value of the diet (3.59 kcal/g);
2. HSFD: caloric intake (kcal/day) = [chow intake (g) $\times$ energy value of diet (4.35 kcal/g)] + [water intake (mL) $\times$ 0.25 $\times$ 4 kcal per gram of carbohydrate].

The body weight was measured weekly. The weight gain was calculated by subtracting the initial weight from the final weight of the animals [weight gain (g) = final weight (g) - initial weight (g)] [18].

2.5 Metabolic Syndrome Characterization

The adiposity index was calculated by the sum of fat deposits normalized by body weight and multiplied by 100 (adiposity index (%) = (epididymal (g) + visceral (g) + retroperitoneal (g))/final weight (g) $\times$ 100).

The SBP was measured in conscious rats by a non-invasive tail-cuff method using an electro-sphygmomanometer (Narco BioSystems® Inc., Austin, TX, USA) [19]. The animals were kept in a wooden box (50 $\times$ 40 cm) between 38 and 40 °C for 4–5 min to stimulate arterial vasodilation. A cuff with a pneumatic pulse sensor was attached to the tail of each animal. The cuff was inflated to 200 mmHg pressure and subsequently deflated. The blood pressure values were recorded on a Gould RS 3200 polygraph (Gould Instrumental, Valley

View, OH, USA). The mean of three SBP readings was obtained for each animal.

The fasting blood glucose evaluation was performed by glucometer (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostics Indianapolis, IN, USA). The plasma concentrations of triglycerides and HDL cholesterol were performed with colorimetric enzymatic detection kits (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brazil) in an automatic enzymatic analyzer system (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China).

2.6 Lycopene Bioavailability Evaluation

The presence of lycopene was determined in hepatic tissue homogenate [18]. Briefly, the samples were incubated with internal standard (equinenone) and chloroform/methanol CHCl₃/CH₃OH (3 mL, 2:1, v/v) and 500 mL of saline 8.5 g/L. Then, the samples were centrifuged at 2000 x g for 10 min and the supernatant was collected and hexane was added. The chloroform and hexane layers were evaporated under nitrogen and the residue was resuspended in 150 mL of ethanol and sonicated for 30 s. 50 µL of this aliquot was injected into the high-performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC system was a Waters Alliance 2695 (Waters, Wilmington, MA, USA) with a C30 carotenoid column (3 mm, 150 x 3 x 4.6 mm, YMC, Wilmington, MA, USA) and Empower 3 chromatography data software (Milford, MA, USA). The HPLC system programmable photodiode array detector was set at 450 nm for carotenoids. For the quantification of the chromatograms, a comparison was made between the area ratio of the substance and the area of the internal standard obtained in the analysis.

2.7 Assessment of Hepatic Triglyceride Content

Liver tissue samples (~100mg, were homogenized in 1 ml of phosphate-buffered saline. Lipids from thin layers were obtained and lipids from water-soluble components of the tissue extracts were partitioned by organic extraction. Then, were analyzed by colorimetric

enzymatic detection kits for triglyceride (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brazil) in an automatic enzymatic analyzer system (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China) [20].

2.8 Metabolomic Analysis: Processing Sample

The liver samples ($\sim 10\text{mg} \pm 1\text{mg}$) were placed into 2 mL microcentrifuge tubes containing stainless steel balls. Samples were immediately flash-frozen in liquid N₂, homogenized using a ball mill, and put on ice to which 1 mL of chloroform: methanol: dH₂O (1: 2.5: 1). The samples were vortexed in a cold room at 4°C for 15 min and return to ice then, were centrifuged at 5000 x g at 4°C for 3 min and the supernatants were collected. To separate polar and non-polar metabolites phases, 0.5 mL of sterile deionized water was added to the samples, mixed with a vortex, and centrifuged at 5000 x g at 3°C for 3 min. The polar (top phase) and non-polar phases (bottom phase) were aliquoted into separate labeled 2 mL microcentrifuge tubes and then dried using a Buchi Rotavapor RE120 with Buchi V5-1 vacuum and Buchi 461 water bath at 25 °C (Buchi Ltd., Postfach, Switzerland) [21].

2.9 Untargeted Metabolomics Analysis

Extracted metabolites were analyzed by flow infusion electrospray ionization high-resolution mass spectrometry (FIE-HRMS). FIE-HRMS was performed by a Q-Exactive Plus mass analyzer equipped with an UltiMate 3000 UHPLC system. Metabolite fingerprints were created in both positive and negative polarity switching modes. Ion intensities were acquired between m/z 55 and 1200 for 3.5 min in profiling mode at a resolution setting of 280,000. Twenty μL of each extract was injected by an autosampler into a flow of 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ methanol/water (70:30, v/v). An in-house data aligning routine in Matlab (R2013b, The MathWorks) was used to join mass spectra around the apex of the infusion maximum into a single mean intensity matrix (runs $\times m/z$) for each ionization mode. For each mass-ion (m/z) the annotation was made using a 3-ppm tolerance on

their accurate mass. Data from the matrix were log₁₀-transformed and used for statistical analysis performed by MetaboAnalyst 4.0. The significance of the cross-validated p-values, based on one-way analysis of variance (ANOVA), was set to $p < 0.05$. Multiple comparisons and post-hoc analysis used Tukey's Honestly Significant Difference (Tukey's HSD). Both ANOVA and Tukey's HSD allowed the identification of significant metabolite changes between the four experimental groups. Metabolites that did not show significant differences between the groups were not further analyzed. Differences in the metabolomics profiles of samples were analyzed by Supervised group discrimination performed by partial least squares – discriminant analyses (PLS-DA), variable importance in projection (VIP), and hierarchical clustering (heatmap) [21].

2.10 Statistical analysis

The data analysis was performed using the software Sigma Stat for Windows Version 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test with Tukey post-hoc test. Results were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median (interquartile range). A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 Nutritional Profile

The nutritional profile is shown in Table 1. There was no difference between groups in caloric intake of the control diet (Co and Co + Lyc) or HSFD (MetS and MetS) as seen in previous studies by our research group exploring the same dietary model (14). The increase in final body weight and weight gain was observed in the MetS and MetS + Lyc groups.

Table 1. Nutritional profile

Variables	Groups			
	Co	Co + Lyc	MetS	MetS + Lyc
Caloric intake (Kcal)	87 ± 9.7 ^a	91.0 ± 8.5 ^a	96.8 ± 6.5 ^a	93.4 ± 9.8 ^a
Initial body weight (g)	199 ± 28.4 ^a	205 ± 14.3 ^a	210 ± 21.4 ^a	198 ± 11.6 ^a
Final body weight (g)	490 ± 44 ^a	477 ± 60 ^a	568 ± 75 ^b	552 ± 43 ^b
Weight gain (g)	291 ± 33 ^a	272 ± 42 ^a	358 ± 73 ^b	354 ± 35 ^b

Parametric data expressed in mean ± standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Tukey post-hoc test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p \leq 0.05$); n = 6 animals/group. Co: Control group; Co: Control + Lyc: Control supplemented with lycopene; MetS: Metabolic syndrome group; MetS + Lyc: Metabolic syndrome group supplemented with lycopene.

3.2 Metabolic Syndrome Characterization

The dietary model was able to induce metabolic syndrome features, presented in Table 2. The MetS groups showed an increase in adiposity index, systolic blood pressure, fasting blood glucose, and triglycerides compared to the Control groups. The tomato oleoresin supplementation was not able to improve all these alterations, but was efficient in attenuating the plasma triglycerides levels and promoted HDL cholesterol levels increase in Co+Lyc and MetS + Lyc groups.

Table 2. Metabolic Syndrome characterization.

Markers	Groups			
	Co	Co + Lyc	MetS	MetS+Lyc
Adiposity index (%)	3.9 ± 0.6 ^a	4.3 ± 1.2 ^a	8.1 ± 1.7 ^b	8.7 ± 1.6 ^b
Systolic blood pressure (mmHg)	130 ± 2.6 ^a	132 ± 3.0 ^a	137 ± 6.1 ^b	137 ± 5.4 ^b
Fasting blood glucose (mg/dL)	77 ± 14 ^a	80 ± 16 ^a	99 ± 21 ^b	102 ± 7.1 ^b
Triglycerides (mg/dL)	71 ± 11.7 ^a	77 ± 20 ^a	118 ± 26 ^b	95 ± 18 ^{ab}
HDL Cholesterol (mg/dL)	18 ± 3.3 ^a	24 ± 4.0 ^b	19 ± 5.5 ^a	29 ± 2.7 ^c

Parametric data expressed in mean ± standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Tukey post-hoc test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p \leq 0.05$); n = 6 animals/group. Co: Control group; Co: Control + Lyc: Control supplemented with lycopene; MetS: Metabolic syndrome group; MetS+Lyc: Metabolic syndrome group supplemented with lycopene; HDL: high-density lipoprotein cholesterol.

3.3 Hepatic Lycopene Bioavailability and Triglyceride Content Evaluation

Levels of lycopene in liver tissue were found only in groups that received tomato oleoresin supplementation, as shown in Figure 1A. Control and MetS groups presented non-detectable levels of lycopene. The hepatic triglycerides content, a marker of steatosis, was higher in the MetS groups and tomato oleoresin supplementation was able to attenuate the levels of triglycerides in the liver (Figure 1B).

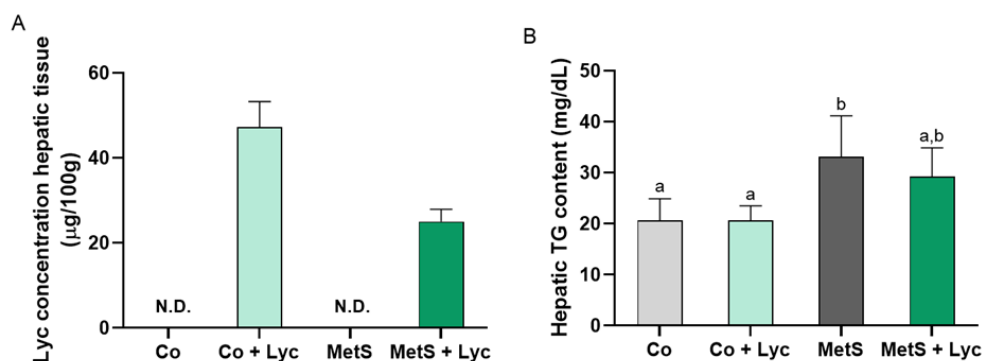


Figure 1. Concentration of lycopene on hepatic tissue (A) and content of triglycerides in the liver (B). Data expressed as mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Tukey post-hoc test. Different letters correspond to the significant statistical difference ($p \leq 0.05$); $n = 6$ animals/group. N.D.: non-detectable; TG: triglycerides; Co: control; Co + Lyc: control + lycopene; MetS: metabolic syndrome and MetS + Lyc: metabolic syndrome + lycopene.

3.4 Untargeted Metabolomics Analysis

The analysis of hepatic metabolome identified 3293 metabolites in the hepatic tissue and 98 metabolites were statistically significant (Figure 2).

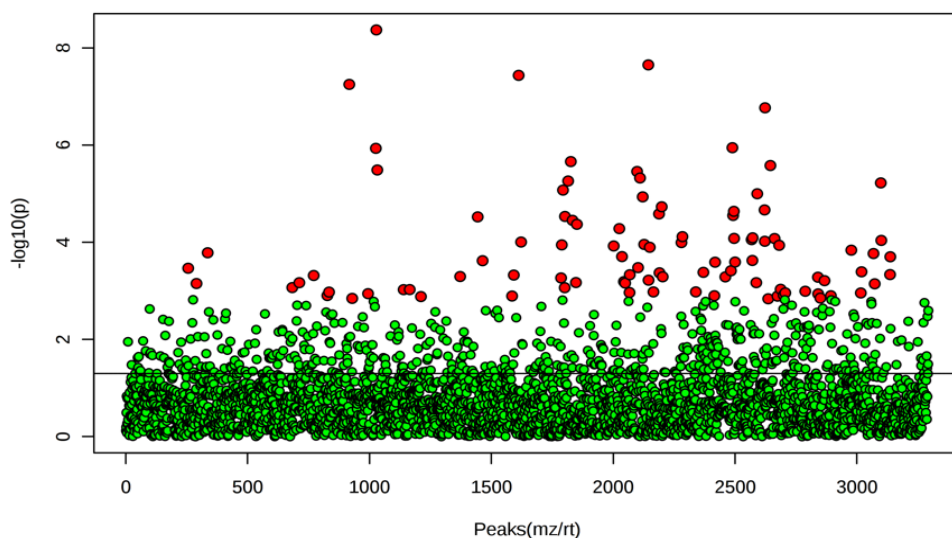


Figure 2. Statistical analysis of the identified metabolites in the liver. The metabolites of the experimental groups were selected by one-way ANOVA and the red dots represent the difference for $p \leq 0.05$

The variable importance in projection (VIP) scores plots from the four experimental groups were used to indicate metabolite which could discriminate between lycopene supplementation effects in the liver, presented in Figure 3A. Metabolites with greater VIP scores are more important in contributing to the separation between the four experimental groups, while those with smaller VIP scores have lower influence on the model and treatment. Therefore, the metabolites with higher scores indicate their essential role in the discrimination of metabolic profiles. Considering this data, a hierarchical clustering analysis of the 15 most important metabolites was performed, as shown in Figure 3B. The metabolites sphinganine 1-phosphate, D-leucine, L-leucine, and L-isoleucine presented a markedly opposite abundance in the MetS+Lyc group compared to the MetS group.

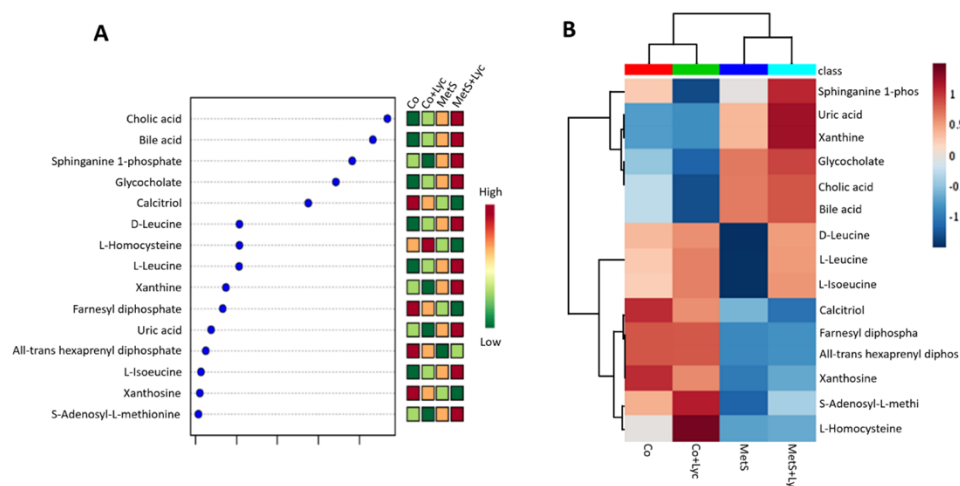


Figure 3. Identified metabolites. (A) variable importance in projection (VIP) scores of each compound (most significant) according to the experimental groups and (B) hierarchical cluster and heatmap of primarily identified metabolites according to the experimental groups. VIP scores indicate the top important metabolites contributing to the separations of metabolic profiles of the groups. The relative abundance of metabolites is indicated by a colored scale from green to red representing the low and high, respectively. Co: control; Co + Lyc: control + lycopene; MetS: metabolic syndrome and MetS + Lyc: metabolic syndrome + lycopene.

The statistical differences for these 4 metabolites are showed in Figure 4. It is possible to verify the tomato oleoresin influences on sphinganine 1-phosphate, D-leucine, L-leucine, and L-isoleucine levels.

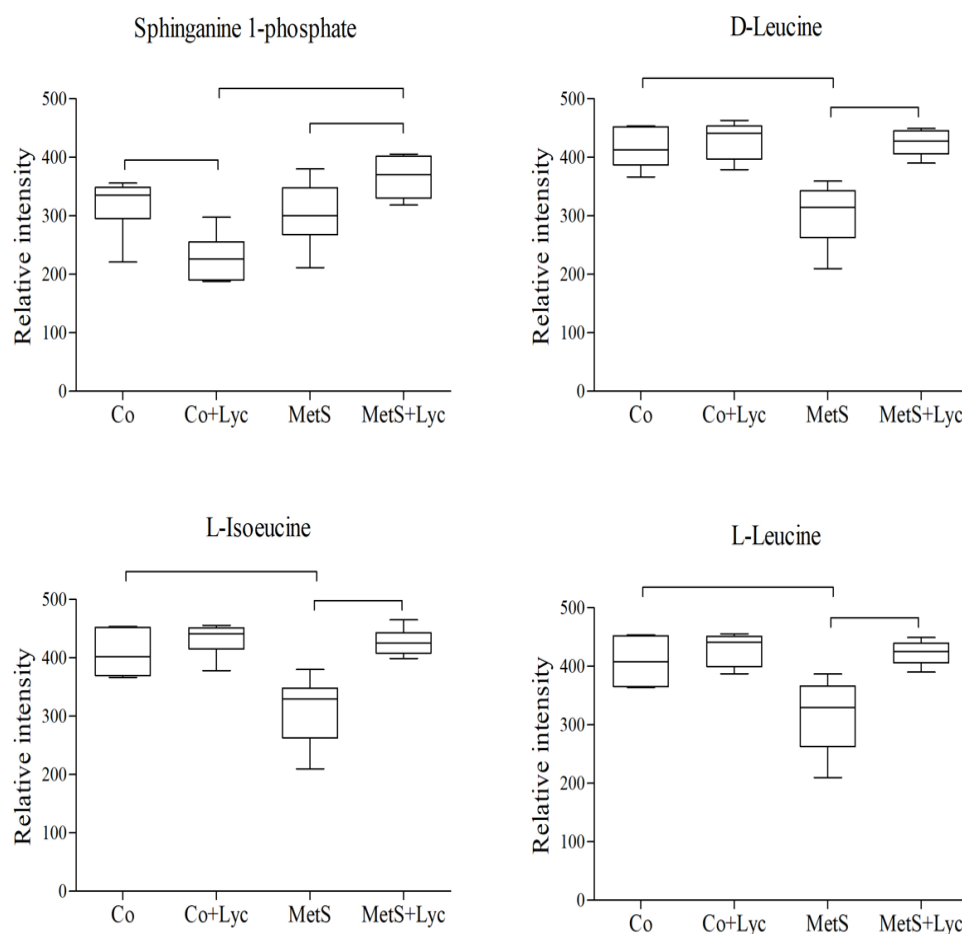


Figure 4. Metabolites affected by lycopene supplementation. Relative intensity of each metabolite was compared among different groups by two-way ANOVA and Tukey post-hoc tests.

In contrast, there were no statistical differences in the effect of tomato oleoresin supplementation for the metabolite uric acid, xanthosine, xanthine glycocholate, cholic acid, bile acid, farnesyl diphosphate, all trans hexaprenyl diphosphate, calcitriol, s-adenosyl-L-methionine and L-homocysteine (Figure 5). Instead, the HSFD led to changes in levels of these metabolites.

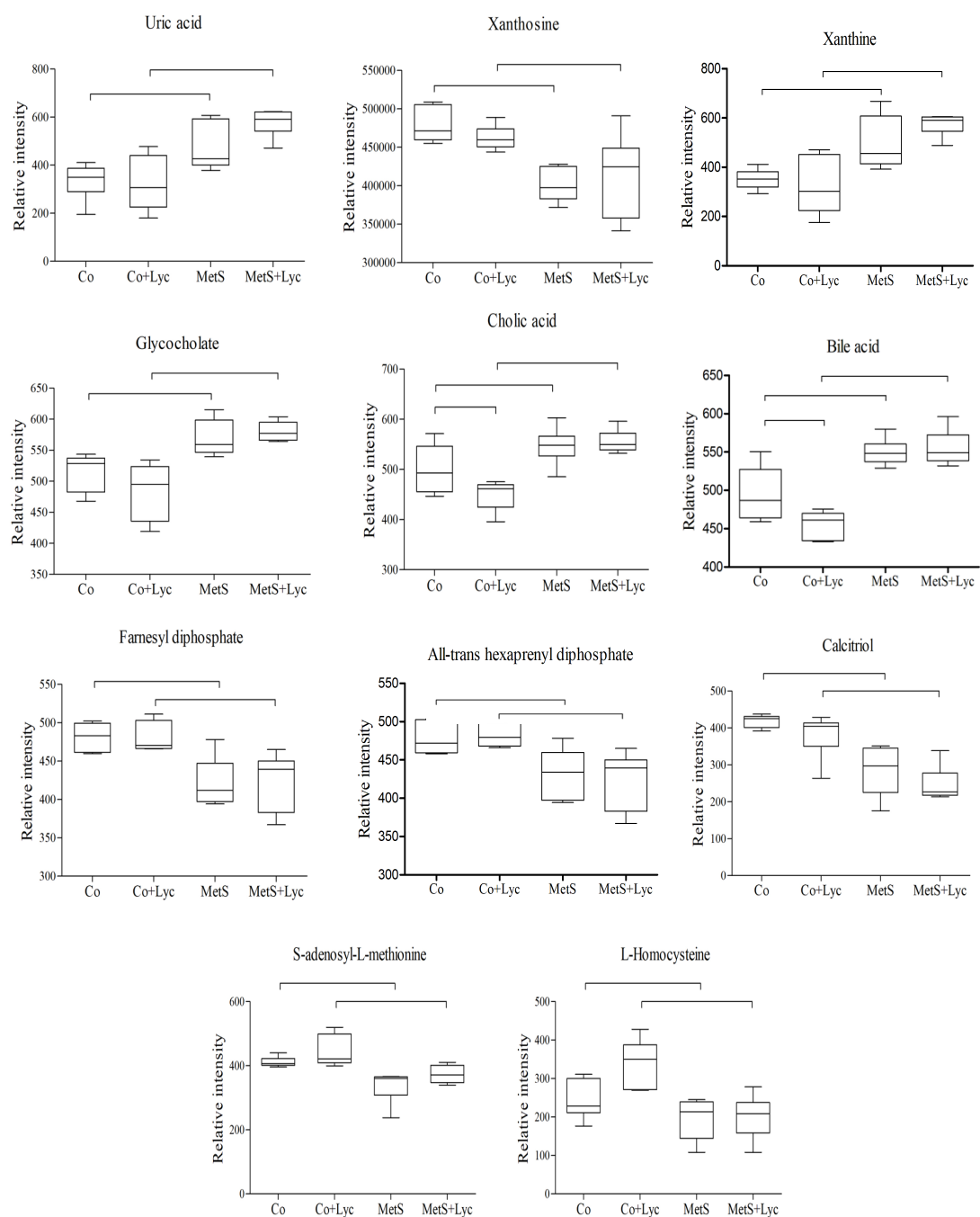


Figure 5. Metabolites not affected by lycopene supplementation. Relative intensity of each compound was compared among different groups by two-way ANOVA and Tukey post-hoc tests

4. Discussion

This study aimed to verify the effects of the lycopene-containing tomato oleoresin supplementation on the hepatic metabolomic profile in a diet-induced metabolic syndrome model. Despite the similar caloric intake between the groups (Control and MetS), the difference in diet composition, particularly, its macronutrient quality reflected a greater weight gain in the groups fed with HSFD. The MetS features were also induced, demonstrated by the increase of adiposity index, SBP, fasting glucose levels, triglycerides levels, and decrease of HDL levels. In addition, the increase in hepatic triglyceride content was observed, a marker for steatosis. In a previous study, our research group has already reported the nutritional, metabolic, and hepatic disorders triggered by the dietary model, as well as the therapeutic effects of lycopene on the risk factors for MetS and, mainly, on the hepatic lipid accumulation (18).

The supplementation with tomato oleoresin did not influence the caloric intake behavior, body weight, and weight gain of the treated group. In line with these data, the adiposity index was not suppressed by lycopene. Although the effects of lycopene on body weight control and adiposity are reported [22,23], no interference of the compound on these parameters was observed [24]. In agreement with previous studies, lycopene lowered the high levels of plasmatic triglycerides with enhance of HDL in MetS rats, events well reported in the literature [23-25].

As lipid levels were modulated by the compound, reflecting a lower accumulation of hepatic triglycerides, the study of the liver could reveal information about the effect of tomato oleoresin on pathophysiological mechanisms. In line with this, the present study investigated the hepatic metabolome in the MetS context, in animals treated with tomato oleoresin. To our knowledge, there is a lack of literature on this approach. The metabolomic analysis is particularly well-placed to describe large-scale pathophysiological events and the tomato oleoresin's treatment targets.

HSFD-induced MetS culminated in changes in the hepatic metabolome, regardless of lycopene supplementation

The HSFD induced glycocholate, uric, cholic and bile acid synthesis and impaired endogenous calcitriol synthesis, besides reducing farnesyl diphosphate, all-trans-hexaprenyl diphosphate, S-adenosyl-L-methionine, L-homocysteine and xanthosine levels in liver tissue. Several risk factors for hyperuricemia and hypercholesterolemia have been identified in MetS subjects. Hyperadiposity, dyslipidemia, and inflammation are strictly related to increased levels of uric acid in humans [26-28]. Moreover, increased consumption of fructose and sucrose are classical inductors of hyperuricemia in animal models [14, 29]. As proof of concept, both MetS groups, tomato oleoresin supplemented or not, showed lower levels of xanthosine and higher levels of xanthine and the final product uric acid, indicating the increased metabolic rate of uric acid synthesis from its precursor.

In contrast, lower levels of farnesyl diphosphate, an intermediate metabolite of cholesterol synthesis in the liver, indicate a reduction in endogenous cholesterol production in MetS rats. Cholesterol biosynthesis and absorption are tightly regulated by a negative feedback mechanism. This close relationship between dietary cholesterol absorption and endogenous synthesis is necessary to maintain whole-body cholesterol balance [30]. In line with this, all-trans-hexaprenyl diphosphate were mitigate in HSFD-fed animals. This metabolite is the end product of the hexaprenyl diphosphate biosynthesis pathway that undergoes a series of polymerizations to form various polyisoprenoids. Polyisoprenoid alcohols have been found in the cells of all living organisms from bacteria to human [31]. In animals, polyisoprenoids are synthesized via mevalonate pathway, which converts acetyl-CoA to several metabolically important molecules including farnesyl diphosphate. [32]. Thus, cholesterol and polyisoprenoids are related compounds that share the cholesterol biosynthesis pathway, which explains why farnesyl diphosphate and all-trans-hexaprenyl diphosphate are depleted in the MetS model.

MetS groups showed increased levels of cholic and glycocholic acids, both byproducts of cholesterol degradation, in addition to increased

synthesis of bile acid in the liver [32]. These findings suggest that an increased supply of dietary cholesterol is impairing the endogenous synthesis of this molecule and promoting its excretion. Thus, to avoid an increase in plasma cholesterol levels, there is a reduction in cholesterol synthesis and an increase in cholesterol excretion by bile acids, given the increase in cholesterol intake [30].

In the same way, lower levels of calcitriol (the active analog of vitamin D) were also observed in MetS groups. Development of hepatic steatosis and its complicated stages from NAFLD to NASH and cirrhosis is associated with low levels of calcitriol in murine models and humans [33] and this is consistent with the findings of the present study. Also, vitamin D deficiency is related to the severity of NAFLD in patients who have normal liver enzymes [34]. The lower levels of vitamin D could be associated with its metabolism which involves cytochrome P450 mixed-function oxidases (CYPs). These enzymes could be found in the mitochondria and the endoplasmatic reticulum, organelles that are sensitive to the oxidative stress triggered by overnutrition [35].

Deficiency in sulfured amino acids such as S-adenosyl-L-methionine and L-Homocysteine was also observed in the MetS groups. Although several animal models for hepatic metabolic disorders are induced by methionine-poor diets, how methionine levels are associated with NAFLD remains unclear. [36,37]. Also, authors have reported impaired sulfur-amino acid metabolism in the presence of chronic liver diseases with lower levels of S-adenosyl-L-methionine [38]. S-adenosyl-L-methionine is a key metabolite for glutathione synthesis, an enzyme that has important antioxidant activity [39]. Furthermore, S-adenosyl-L-methionine is a methyl donor for phosphatidylcholine, an important precursor of VLDL synthesis, which can impact lipid transport from the liver to peripheral tissues [40]. Taken together, these findings are consistent with the MetS condition, therefore, the expected hepatic manifestation is the development of disturbances in lipid and amino acid metabolism. In this model, tomato oleoresin supplementation seems to not influence this metabolic pathway.

Lycopene acted differently on the Co and MetS groups, reducing and increasing Sphinganine 1-phosphate levels

The Co group treated with tomato oleoresin exhibited lower levels of Sphinganine 1-phosphate levels (S1P) than its similar non-treated. Instead, the MetS group treated with tomato oleoresin had higher levels of S1P compared to the group which received only HSFD. Sphingolipids are crucial for membrane structure and function; their metabolism leads to the formation of lipid mediators such as S1P.

The turnover of sphingolipids, which is initiated by the action of sphingomyelinase, leads to the formation of ceramide, which is further processed into sphingosine by the enzyme ceramidase. Sphingosine is then phosphorylated by sphingosine kinase (Sphk) isoenzymes, giving rise to S1P [41, 42]. These lipids, S1P and ceramide, have complex interrelationships. S1P has intra and extracellular functions, modulating cell growth, survival, cell differentiation, migration, and regulation of immune cells. On the other hand, ceramide is known as one of the damage-associated molecular patterns (DAMPs) which activate toll-like receptors promoting tissue inflammation [43], especially in fatty liver diseases. Recently, two compounds were identified as selective and non-selective inhibitors of ceramide synthase, fingolimod, and fumonisins, respectively. The actions of both compounds result in reduced ceramide synthesis with increased concentrations of S1P [44].

The phenomenon of increased levels of S1P in the MetS group supplemented with tomato oleoresin can be supported by possible effects on the balance of the mentioned mechanism. S1P and the isoenzymes related to S1P metabolism possess an important role in liver physiology and pathophysiology [45], because the sphingosine conversion to S1P occurs via two sphingosine kinases (SphK 1 and 2). SphK 1 is linked to NAFLD and NASH development while SphK2 is associated with fatty acid oxidizing genes and liver fatty acid oxidation and reduction of hepatic lipid droplet accumulation [46]. This second metabolic pathway is consistent with the well-known antioxidant, anti-inflammatory, and protective effects of lycopene in NAFLD [18]. Nevertheless, the effects of tomato oleoresin and

lycopene on sphingolipid metabolism are poorly understood. The present study raises the hypothesis to be tested in future research.

Lycopene restored the depletion of metabolites L-Isoleucine, L-Leucine, and D-Leucine

MetS led to lower levels of L-Isoleucine, L-Leucine, and D-Leucine, however, tomato oleoresin supplementation restored these metabolites levels. The present study identified the potential of tomato oleoresin supplementation in restoring concentrations of two branched-chain amino acids (BCAAs), L-leucine, D-leucine and L-isoleucine, in the liver of MetS rats. Leucine, isoleucine, and valine are known to mediate the activation of several important hepatic metabolic signaling pathways, including insulin signaling, glucose regulation, and lipid oxidation. Additionally, BCAAs play important roles in maintaining a healthy liver. These roles range from cancer stem cell suppression to inhibition of reactive oxygen species (ROS) production. BCAA supplementation is also reported to improve insulin resistance and promote liver regeneration [47-51]. This is the first report presenting tomato oleoresin supplementation influences on BCAA levels in liver tissue in HSFD-induced MetS.

The amino acid pool coming from gut absorption is firstly catabolized in the liver, except BCAAs that go direct to extra-hepatic tissues, primarily skeletal muscles, to be consumed in protein synthesis or other cellular processes. The first step of BCAA catabolism occurs in skeletal muscles through the enzyme BCAA transaminase (BCAT) which uses α -ketoglutarate to form branched chain α -keto acids (BCKA) and glutamate. Then, BCKAs return to the liver to be completely degraded by the branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BCKD) [52]. BCAAs absorbed are derived from dietary sources and they are both produced and degraded by gut microbiota in the human intestine. Gut microbiome source is especially important for the D-leucine isoform, which is not found in human tissue and is derived only from bacterial metabolism. Intestinal bacteria secrete D-amino acids to inhibit the growth of competitors, in addition, D-amino acids released by bacteria contribute to modulate intestinal homeostasis and the composition of the microbiota [53]. This means that tomato oleoresin can be

a potential modulator of intestinal microorganisms contributing to the health of the host, since a disruption in the intestinal microbiota, dysbiosis, are associated with pathophysiological mechanisms of metabolic diseases such as obesity, insulin resistance, diabetes type 2 mellitus and NAFLD.

On the other hand, it is noteworthy that emerging evidence links metabolic disorders with elevated systemic concentrations of BCAAs in adult humans. Studies associate changes in gut microbiota induced by HSFD with an increase BCAAs serum level which were significantly associated with MetS features [53-55]. However, there are very conflicting reports about BCAA serum and hepatic levels and metabolic diseases, including fatty liver disease (56). Zhang et al., demonstrated that oral administration of BCAAs improved diet-induced associated fatty liver disease. Furthermore, BCAA supplementation increased amino acid levels and markedly improved parameters such as body weight and hepatic lipid accumulation by modulating the intestinal microbiota [57].

Nowadays, there is an increasing body of evidence supporting the pivotal role of gut microbiota and its metabolites in the maintenance of host homeostasis [58]. Indeed, the gut microbiota modulation is of special interesting of researchers. Findings of animal and human studies suggest that gut dysbiosis plays a role in the pathogenesis of hepatic steatosis. The consumption of a HSFD affects the microbiota profile, reducing beneficial bacterial groups and increasing the counts of gram-negative bacteria [55,59,60]. For this reason, nutritional approaches to modulate the microbiota are possible complementary treatment strategies. Interestingly, investigations addressing the protective effect of lycopene revealed its influence on the gut microbiota, increasing the abundance of beneficial bacteria, suggesting the potential of the compound to treat dysbiosis and improve the metabolic profile that leads to liver impairment [61-64].

These findings have opened a new avenue to investigate the protector mechanism of tomato oleoresin: the liver BCAAs level improvement due to an influence on the intestinal microbiome. Although the role of BCAAs is unclear and up for debate, studies support their use in the treatment of liver damage. Further research examining this topic is required to understand the complex interaction of lycopene on BCAAs

levels in the steatotic liver in Mets. However, the link between dysbiosis and BCAAs in MetS features may be a therapeutic promise of tomato oleoresin supplementation.

5. Conclusions

Untargeted metabolomic analysis of hepatic tissue demonstrated the lycopene effect on metabolites profile, including four metabolites that were significantly changed by tomato oleoresin supplementation in our HSFD-induced MetS model. Our findings showed a clear differentiation of metabolites highlighting their role in the liver consequences of MetS and the beneficial effect of lycopene supplementation. In summary, tomato oleoresin restored BCAA levels as L-leucine/D-leucine and L-isoleucine which may suggest a connection with gut microbiota dysbiosis amelioration by the compound. These findings are preliminary and future work may support possible links between the effects of lycopene on BCAAs and their mechanisms.

Supplementary Materials:

The enriched pathways demonstrating the most important pathways involved are visualized in Table. 12 pathways were identified as significantly enriched. These pathways included amino acids, lipids and glutathione metabolism, suggesting that different biological pathways were affected by HSFD and the tomato oleoresin.

Table S1. Enrichment pathway analyses demonstrating the most important pathways involved within the experiment.

	Pathway total compounds	Total hits	Significant hits	P value
Arginine and proline metabolism	44	3	3	0.00003
Cysteine and methionine metabolism	28	3	3	0.00005
Purine metabolism	68	3	2	0.00012
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	67	3	2	0.00013
Steroid biosynthesis	35	2	2	0.00039

	Pathway total compounds	Total hits	Significant hits	P value
Primary bile acid biosynthesis	46	2	2	0.00045
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	42	2	2	0.00045
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	11	2	1	0.00084
Fatty acid metabolism	39	1	1	0.00103
Fatty acid elongation in mitochondria	27	1	1	0.00097
Glutathione metabolism	26	1	1	0.00109
Sphingolipid metabolism	21	1	1	0.00122

Author Contributions: Conceptualization, M.R.C., A.J.T.F., C.R.C., and F.M.; methodology, M.R.C., J.L.G., C.C.V.A S., A.J.T.F., F.V.F., C.S.G., L.G., LA.J.M., R.P.A; formal analysis, M.R.C. and F.M.; investigation, M.R.C. and F.M.; resources, A.J.T.F., C.R.C., A.L.A.F., and F.M.; data curation, M.R.C., J.L.G. and F.M.; writing—original draft preparation, M.R.C. and F.M.; writing—review and editing, M.R.C., F.M. J.L.G. and C.S.G.; visualization, M.R.C., F.M., J.L.G. and C.S.G.; supervision, F.M. and C.R.C.; project administration, A.L.A.F. and F.M.; funding acquisition, A.L.A.F., C.R.C., and F.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number 424209/2016-0, 2016.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and approved by the Animal Ethics Committee of Botucatu Medical School (1266/2018).

Acknowledgments: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or

interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Saklayen, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep.* **2018**, *20*, 12.
2. Lemieux, I.; Després, J.P. Metabolic Syndrome: Past, Present and Future. *Nutrients.* **2020** *12*, 3501.
3. Yki-Järvinen, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2014**, *2*(11):901–10.
4. Samson, S.L.; Garber A.J. Metabolic Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **2014** *43*(1):1–23.
5. Kotronen, A.; Westerbacka, J.; Bergholm, R.; Pietiläinen, K.H.; Yki-Järvinen, H. Liver Fat in the Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* **2007**, *92*(9):3490–7.
6. Lu, F.B.; Hu, E.D.; Xu, L.M.; Chen, L.; Wu, J.L.; Li, H.; et al. The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* **2018**, *12*(5):491–502.
7. Ni, Y.; Zhuge, F.; Nagashimada, M.; Ota, T. Novel Action of Carotenoids on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Macrophage Polarization and Liver Homeostasis. *Nutrients.* **2016**, *24*;8(7):391.
8. McCracken, E.; Monaghan, M.; Sreenivasan, S.; Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol.* **2018**, *36*(1):14–20.
9. Basu, A. Role of Berry Bioactive Compounds on Lipids and Lipoproteins in Diabetes and Metabolic Syndrome. *Nutrients.* **2019**, *11*(9):1983.
10. Ferramosca, A.; di Giacomo, M.; Zara, V. Antioxidant dietary approach in treatment of fatty liver: New insights and updates. *World J Gastroenterol.* **2017**, *23*(23):4146.
11. Kawata, A.; Murakami, Y.; Suzuki, S.; Fujisawa, S. Anti-inflammatory Activity of β -Carotene, Lycopene and Tri-n-butylborane, a Scavenger of Reactive Oxygen Species. *In Vivo (Brooklyn).* **2018**, *32*(2).
12. Senkus, K.E.; Tan, L.; Crowe-White, K.M. Lycopene and Metabolic Syndrome: A Systematic Review of the Literature. *Advances in Nutrition.* **2019**, *10*(1):19–29.
13. Arballo, J.; Amengual, J.; Erdman, J.W. Lycopene: A Critical Review of Digestion, Absorption, Metabolism, and Excretion. *Antioxidants.* **2021**, *10*(3):342.

14. Francisqueti, F.; Minatel, I.; Ferron, A.T.J; Bazan, S.; Silva, V.; Garcia J, 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.
15. Luvizotto, R.A.M.; Nascimento, A.; Miranda, N.; Wang, X.D.; Ferreira, A. Lycopene-rich tomato oleoresin modulates plasma adiponectin concentration and mRNA levels of adiponectin, SIRT1, and FoxO1 in adipose tissue of obese rats. *Hum Exp Toxicol*. **2015**, 34(6):612–9.
16. Luvizotto, R.A.M.; Nascimento, A.F.; Imaizumi, E.; Pierine, D.T.; Conde, S.J.; Correa, C.R.; et al. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *British Journal of Nutrition*. **2013**, 110(10):1803–9.
17. National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press; 2011. 220.
18. Costa, M.R.; Garcia, J.L.; Silva, C.C.V.A.; Ferron, A.T.J.; Francisqueti-Ferron, F.V.; Hasimoto, F.K.; et al. Lycopene Modulates Pathophysiological Processes of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obese Rats. *Antioxidants*. **2019**, 8(8):276.
19. Santos, P.P.; Rafacho, B.P.M.; Gonçalves, A.F.; Jaldin, R.G.; Nascimento, T.B.; Silva, M.A.B.; et al. Vitamin D Induces Increased Systolic Arterial Pressure via Vascular Reactivity and Mechanical Properties. *PLoS One*. **2014**, 9(6):e98895.
20. Tsai, T.H.; Chen, E.; Li, L.; Saha, P.; Lee, H.J.; Huang, L.S.; et al. The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver. *Autophagy*. **2017**, 13(7):1130–44.
21. Taylor, E.N.; Beckmann, M.; Villarreal-Ramos, B.; Vordermeier, H.M.; Hewinson, G.; Rooke, D.; et al. Metabolomic Changes in Naturally MAP-Infected Holstein–Friesian Heifers Indicate Immunologically Related Biochemical Reprogramming. *Metabolites*. **2021**, 11(11):727.
22. Zhu, R.; Chen, B.; Bai, Y.; Miao, T.; Rui, L.; Zhang, H.; et al. Lycopene in protection against obesity and diabetes: A mechanistic review. *Pharmacol Res*. **2020**, 159:104966.
23. Baz, L.; Algarni, S.; Al-thepyani, M.; Aldairi, A.; Gashlan, H.; Lycopene Improves Metabolic Disorders and Liver Injury Induced by a High-Fat Diet in Obese Rats. *Molecules*. **2022**, 27(22):7736.
24. Senkus, K.E.; Zhang, Y.; Wang, H.; Tan, L.; Crowe-White KM. Lycopene supplementation of maternal and weanling high-fat diets

- influences adipose tissue development and metabolic outcomes of Sprague-Dawley offspring. *J Nutr Sci.* **2021**, 10:e96.
25. Inoue, T.; Yoshida, K.; Sasaki, E.; Aizawa, K.; Kamioka, H. Effects of lycopene intake on HDL-cholesterol and triglyceride levels: A systematic review with meta-analysis. *J Food Sci.* **2021**, 86(8):3285–302.
26. Gong, M.; Wen, S.; Nguyen, T.; Wang, C.; Jin, J.; Zhou, L. Converging Relationships of Obesity and Hyperuricemia with Special Reference to Metabolic Disorders and Plausible Therapeutic Implications. *Diabetes Metab Syndr Obes.* **2020**, 13:943–62.
27. Liang, J.; Jiang, Y.; Huang, Y.; Song, W.; Li, X.; Huang, Y.; et al. The comparison of dyslipidemia and serum uric acid in patients with gout and asymptomatic hyperuricemia: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis.* **2020**, 19(1):31.
28. King, C.; Lanaspá, M.A.; Jensen, T.; Tolan, D.R.; Sánchez-Lozada, L.G.; Johnson, R.J. Uric Acid as a Cause of the Metabolic Syndrome. *Contrib Nephrol.* **2018**, 192, 88–102.
29. Russo, E.; Leoncini, G.; Esposito, P.; Garibotto, G.; Pontremoli, R.; Viazzi, F. Fructose and Uric Acid: Major Mediators of Cardiovascular Disease Risk Starting at Pediatric Age. *Int J Mol Sci.* **2020**, 21(12):4479.
30. Afonso, M.S.; Machado, R.M.; Lavrador, M.S.; Quintao, E.C.R.; Moore, K.J.; Lottenberg, A.M. Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients.* **2018**, 10(6):760.
31. Surowiecki, P.; Onysk, A.; Manko, K.; Swiezewska, E.; Surmacz, L. Long-Chain Polyisoprenoids are Synthesized by AtCPT1 in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules.* **2019**, 24(15):2789.
32. Pronin, A.V.; Danilov, L.L.; Narovlyansky, A.N.; et al. Plant Polyisoprenoids and Control of Cholesterol Level. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2014**, 62, 31–39.
32. Li, T.; Chiang, J.Y.L. Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Res.* **2009**, 1–15.
33. Keane, J.; Elangovan, H.; Stokes, R.; Gunton, J. Vitamin D and the Liver – Correlation or Cause? *Nutrients.* **2018**, 10(4):496.
34. Hariri, M.; Zohdi, S. Effect of Vitamin D on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Clinical Trials. *Int J Prev Med.* **2019**, 10(1):14.
35. Bikle DD. Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem Biol.* **2014**, 21(3):319–29.
36. Takahashi, Y. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* **2012**,

18(19):2300.

37. Marcolin, É.; Forgiarini, L.F.; Tieppo, J.; Dias, A.S.; Freitas, L.A.R.; Marroni, N.P. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol.* **2011**, 48(1):72–9.
38. Kwon, D.Y.; Jung, Y.S.; Kim, S.J.; Park, H.K.; Park, J.H.; Kim, Y.C. Impaired Sulfur-Amino Acid Metabolism and Oxidative Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Are Alleviated by Betaine Supplementation in Rats. *J Nutr.* **2009**, 139(1):63–8.
39. Lee, S.Y.; Ko, K.S. Protective Effects of S-Adenosylmethionine and Its Combinations With Taurine and/or Betaine Against Lipopolysaccharide or Polyinosinic-polycytidylic Acid-induced Acute Hepatotoxicity. *J Cancer Prev.* **2016**, 21(3):152–63.
40. Martínez-Uña, M.; Varela-Rey, M.; Mestre, D.; Fernández-Ares, L.; Fresnedo, O.; Fernandez-Ramos, D.; et al. S-Adenosylmethionine increases circulating very-low density lipoprotein clearance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* **2015**, 62(3):673–81.
41. Mendelson, K.; Evans, T.; Hla, T. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development.* **2014**, 141(1):5–9.
42. Gustafsson, K.; Sander, B.; Bielawski, J.; Hannun, Y.A.; Flygare, J. Potentiation of Cannabinoid-Induced Cytotoxicity in Mantle Cell Lymphoma through Modulation of Ceramide Metabolism. *Molecular Cancer Research.* **2009**, 7(7):1086–98.
43. Hernández-Corbacho, M.J.; Canals, D.; Adada, M.M.; Liu, M.; Senkal, C.E.; Yi, J.K.; et al. Tumor Necrosis Factor- α (TNF α)-induced Ceramide Generation via Ceramide Synthases Regulates Loss of Focal Adhesion Kinase (FAK) and Programmed Cell Death. *Journal of Biological Chemistry.* **2015**, 290(42):25356–73.
44. Turner, N.; Lim, X.Y.; Toop, H.D.; Osborne, B.; Brandon, A.E.; Taylor, E.N.; et al. A selective inhibitor of ceramide synthase 1 reveals a novel role in fat metabolism. *Nat Commun.* **2018**, 9(1):3165.
45. Kleuser, B. Divergent Role of Sphingosine 1-Phosphate in Liver Health and Disease. *Int J Mol Sci.* **2018**, 19(3):722.
46. Lee, S.; Hong, I.; Kim, B.; Shim, S.; Lee, J.S.; Lee, H.; et al. Activation of sphingosine kinase 2 by endoplasmic reticulum stress ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Hepatology.* **2015**, 62(1):135–46.
47. Lake, A.D.; Novak, P.; Shipkova, P.; Aranibar, N.; Robertson, D.G.; Reily, M.D.; et al. Branched chain amino acid metabolism profiles in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Amino Acids.* **2015**,

47(3):603–15.

48. Tajiri K. Branched-chain amino acids in liver diseases. *World J Gastroenterol*. **2013**, 19(43):7620.

49. Nagao, Y.; Kawaguchi, T.I.T.; Sata, M. Effect of branched-chain amino acid-enriched nutritional supplementation on interferon therapy in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection: a retrospective study. *Virol J*. **2012**, 9(1):282.

50. Miyake T, Abe M, Furukawa S, Tokumoto Y, Toshimitsu K, Ueda T, et al. Long-term Branched-chain Amino Acid Supplementation Improves Glucose Tolerance in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis-related Cirrhosis. *Internal Medicine*. **2012**, 51(16):2151–5.

51. Yoshida, R.; Yagi, T.; Sadamori. H.; Matsuda, H.; Shinoura, S.; Umeda, Y.; et al. Branched-chain amino acid-enriched nutrients improve nutritional and metabolic abnormalities in the early post-transplant period after living donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. **2012**, 19(4):438–48.

52. Suryawan, A.; Hawes, J.W.; Harris, R.A.; Shimomura, Y.; Jenkins, A.E.; Hutson, S.M. A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr*. **1998**, 68(1):72–81.

53. Aliashkevich, A.; Alvarez, L.; Cava, F. New Insights Into the Mechanisms and Biological Roles of D-Amino Acids in Complex Eco-Systems. *Front. Microbiol*. **2018**, 9.

54. Zhang, F.; Zhao, S.; Yan, W.; Xia, Y.; Chen, X.; Wang, W.; et al. Branched Chain Amino Acids Cause Liver Injury in Obese/Diabetic Mice by Promoting Adipocyte Lipolysis and Inhibiting Hepatic Autophagy. *E Bio Medicine*. **2016**, 13:157–67.

55. Ma J, Zhou Q, Li H. Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanisms and Therapy. *Nutrients*. **2017**, 9(10):1124.

56. Aron-Wisnewsky, J.; Vigliotti, C.; Witjes, J.; Le, P.; Holleboom, A.G.; Verheij, J.; et al. Gut microbiota and human NAFLD: disentangling microbial signatures from metabolic disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **2020**, 17(5):279–97.

57. Honda, T.; Ishigami, M.; Luo, F.; Lingyun, M.; Ishizu, Y.; Kuzuya, T.; et al. Branched-chain amino acids alleviate hepatic steatosis and liver injury in choline-deficient high-fat diet induced NASH mice. *Metabolism*. **2017**, 69:177–87.

58. Zhang, R.; Mu, H.; Li, Z.; Zeng, J.; Zhou, Q.; Li, H.; et al. Oral administration of branched-chain amino acids ameliorates high-fat diet-induced metabolic-associated fatty liver disease via gut microbiota-

associated mechanisms. *Front Microbiol.* **2022**, 22;13.

59. Neis, E.; Dejong, C.; Rensen, S. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients.* **2015**, 7(4):2930–46.

60. Chen, J.; Vitetta, L. Gut Microbiota Metabolites in NAFLD Pathogenesis and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* **2020**, 21(15):5214.

61. Wang, P.X.; Deng, X.R.; Zhang, C.H.; Yuan, H.J.; Gut microbiota and metabolic syndrome. *Chin Med J.* **2020**, 133(7):808–16.

62. García-Alonso, F.J.; González-Barrio, R.; Martín-Pozuelo, G.; Hidalgo, N.; Navarro-González, I.; Masuero, D.; et al. A study of the prebiotic-like effects of tomato juice consumption in rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Food Funct.* **2017**, 8(10):3542–52.

63. Xia, H.; Liu, C.; Li, C.C.; Fu, M.; Takahashi, S.; Hu, K.Q.; et al. Dietary Tomato Powder Inhibits High-Fat Diet–Promoted Hepatocellular Carcinoma with Alteration of Gut Microbiota in Mice Lacking Carotenoid Cleavage Enzymes. *Cancer Prevention Research.* **2018**, 11(12):797–810.

64. Meng, Q.; Zhang, Y.; Li, J.; Shi, B.; Ma, Q.; Shan, A. Lycopene Affects Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiota in Weaned Piglets via Antioxidant Signaling Regulation. *J Nutr.* **2022**, 152(11):2396–408.

65. Li, C.; Liu, C.; Fu, M.; Hu, K.; Aizawa, K.; Takahashi, S.; et al. Tomato Powder Inhibits Hepatic Steatosis and Inflammation Potentially Through Restoring SIRT1 Activity and Adiponectin Function Independent of Carotenoid Cleavage Enzymes in Mice. *Mol Nutr Food Res.* **2018**, 62(8):1700738.

Capítulo 3

Conclusão

A suplementação com licopeno promoveu a diminuição dos níveis plasmáticos de triglicérides e aumento dos níveis de HDL colesterol. Além disso, atenuou os níveis de triglicérides no tecido hepático. Dessa forma, o composto apresentou efeito protetor em relação à parâmetros característicos da síndrome metabólica, assim como para indicador de esteatose hepática. A análise metabolômica revelou que a suplementação com licopeno restaurou níveis dos aminoácidos de cadeia ramificada, L-leucina, D-leucina e L-isoleucina, depletados nos animais portadores de síndrome metabólica.

Em conclusão, esses resultados fornecem *insights* para futuras pesquisas que busquem investigar mecanismos fisiopatológicos da esteatose hepática envolvidos no contexto da síndrome metabólica e evidencia os efeitos da suplementação com licopeno ressaltando seu potencial como alternativa terapêutica.

Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada pela Portaria FMB
Nº 611 de 13/12/2012

Ofício nº 023/2022 – CEUA – FMB/UNESP

Botucatu, 30 de agosto de 2022.

Prezado Senhor,

Em atendimento ao documento enviado em 08 de agosto de 2022, solicitando a exclusão de uma co-laboradora e inclusão de uma nova colaboradora, referente ao projeto de pesquisa **"Efeitos da suplementação do licopeno sobre o metabolismo lipídico no fígado de ratos wistar submetidos à dieta hipercalórica rica em carboidratos simples"** (Protocolo CEUA 1266/2018), essa comissão considera a solicitação **APROVADA**. Reiteramos que a aprovação da solicitação pela CEUA não prevê a inclusão de nenhum animal adicional aos já solicitados no projeto de pesquisa **1266/2018**.

Subobjeto

"Efeitos do Licopeno sobre balanço redox e o metaboloma hepático de ratos portadores de síndrome metabólica."

Atenciosamente,

Profa. Débora C. Damasceno Meirelles dos Santos

Vice – Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Ilustríssimo Senhor

Prof. Fernando Moreto

Faculdade de Medicina de Botucatu

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Distrito Rubião Júnior, S/N - Bloco V (UNIPEX) - Botucatu - SP CEP: 18618-970
Fone: (14) 3880-1880 WhatsApp: (14) 3880-1880
Email Secretária: ceua.fmb@unesp.br ou sara.sampaio@unesp.br