



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Ana Catarina Oliveira Castela

**EFEITOS DO SUMO DE MIRTILO NA EVOLUÇÃO
DA DISFUNÇÃO HEPÁTICA NUM MODELO ANIMAL
DE PRÉ-DIABETES**

Dissertação de Mestrado em Bioquímica, realizada sob orientação do Doutor Flávio Nelson Fernandes Reis e da Professora Doutora Anabela Pinto Rolo, apresentada no Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018

Dissertação em Bioquímica

EFEITOS DO SUMO DE MIRTILO NA EVOLUÇÃO DA DISFUNÇÃO HEPÁTICA NUM MODELO ANIMAL DE PRÉ-DIABETES

Ana Catarina Oliveira Castela

Dissertação de Mestrado em Bioquímica, realizada sob orientação científica do Doutor Flávio Nelson Fernandes Reis do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica (iCBR) da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e coorientação da Professora Doutora Anabela Pinto Rolo do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra e do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2018



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Agradecimentos

Esta fase da minha vida não será concluída sem expressar o meu agradecimento a todos os que constantemente me apoiaram, encorajaram e tornaram possível chegar ao fim deste percurso académico, que representa um importante marco na minha vida pessoal e profissional. Desta forma, dedicarei as seguintes palavras especiais como uma expressão do meu respeito e agradecimento.

Ao **Doutor Flávio Reis**, orientador desta tese, estou para sempre agradecida por me ter acolhido e recebido da melhor maneira, durante estes últimos 4 anos e assim me ter dado a excelente oportunidade de fazer parte do projeto e do seu grupo de trabalho. Agradeço a orientação, os valiosos ensinamentos, rigor científico e a motivação que contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada pelo apoio incondicional, pelos desafios, incentivo e confiança que me deu!

À **Professora Doutora Anabela Rolo**, desejo manifestar o meu profundo agradecimento pela imprescindível orientação, disponibilidade e interesse sempre manifestados na elaboração deste trabalho. Agradeço, não só por todos os ensinamentos, apoio e sugestões que contribuíram, sem dúvida, para o enriquecimento do trabalho realizado, mas também pela paciência e pela sua boa disposição.

Ao **Professor Doutor Carlos Palmeira**, o meu obrigada pelos valiosos ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade manifestada, e pela indispensável colaboração. O meu sincero agradecimento por todo o seu contributo, e por toda a boa disposição.

Agradeço de uma forma muito especial à doutoranda **Sara Nunes** pela sua forte contribuição na concretização desta tese, pelo seu acompanhamento desde o primeiro dia, pelos esclarecimentos, ensinamentos práticos e teóricos, pelos conselhos, pelas sugestões, pela sua pronta disponibilidade, pela grande paciência a qualquer hora, pelo companheirismo, entusiasmo e amizade demonstrada. É na simplicidade de um sorriso que conseguimos perceber a grandiosidade de um coração! Muito obrigada! Desejo-te tudo de bom para o teu futuro!

Agradeço a todos os que se cruzaram comigo no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental do iCBR, à Doutora Sofia, à Doutora Sónia que com o seu saber e boa disposição me transmitiram ensinamentos práticos e teóricos e me entusiasmaram nesta etapa. Também às colegas de laboratório, Johanna, Mafalda, Luciana, Teresa, Diana, Beatriz, Carlota, Inês, Julie, Mariana e Marina, a todas o meu obrigada pelo companheirismo, entusiasmo e amizade.

Ao Jorge, pelo amor, amizade, compreensão, apoio e companheirismo ao longo deste tempo. Obrigada por tudo!

Aos amigos, os que sempre estiveram ao meu lado, obrigada por me apoiarem nos momentos mais difíceis. Pela partilha de bons, maus e fantásticos momentos, por tudo o que aprendemos juntos.

Aos meus Pais e Irmão agradeço os ensinamentos de vida que me deram, todo o apoio, carinho e amor. À minha Mãe, em especial, agradeço-lhe toda a sua enorme coragem e esperança, nesta fase mais difícil da sua vida, dando-me desta forma a maior lição de vida. Não desistir mesmo quando tudo parece não estar a dar certo. Insistir, persistir, e nunca desistir! Obrigado por acreditarem e confiarem em mim, mas sobretudo por todo o esforço feito para que esta etapa na minha vida fosse concluída. Espero que esta etapa que agora termino, possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o apoio, carinho e dedicação que constantemente me oferecem. A eles dedico este trabalho!

Aos meus avós, tios, primos e restante família, agradeço por todo incentivo e apoio que me deram.

A todos, o meu profundo Obrigada!

Resumo

Em conjunto com os dados epidémicos da diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2), também a prevalência da pré-diabetes tem vindo a aumentar, nomeadamente em Portugal, onde em 2015 atingiu um valor estimado de 27,4% da população adulta. A pré-diabetes, descrita como um estado de elevado risco para o desenvolvimento de DMT2, é, sem dúvida, uma fase privilegiada para implementar estratégias para prevenção da progressão da doença, reduzindo o risco de complicações a longo prazo.

A esteatose hepática, caracterizada essencialmente por uma marcada acumulação lipídica no tecido hepático, é muito frequente na DMT2 (40-70%), onde assume geralmente a forma de doença do fígado gordo não alcoólico. Esta condição tem um forte impacto ao nível da mitocôndria dos hepatócitos, responsáveis pela produção de cerca de 90% de ATP consumido pela célula, desempenhando um papel central em diversas funções, incluindo no metabolismo glicídico e lipídico.

É hoje perfeitamente reconhecida a importância crucial de uma dieta saudável na prevenção e/ou tratamento de várias doenças, nomeadamente as metabólicas. O mirtilo (*Vaccinium spp*) é um fruto rico em compostos bioativos, incluindo fenólicos, que conferem inúmeros efeitos benéficos, nomeadamente em distúrbios metabólicos, devido à sua elevada capacidade antioxidante e às propriedades anti-inflamatórias e sensibilizadoras da insulina. Existem estudos, tanto em animais como em humanos, que avaliaram o efeito dos mirtilos na DMT2, contudo, os mecanismos celulares associados às suas propriedades benéficas, nomeadamente em situações mais precoces de doença (pré-diabetes), ainda não estão completamente elucidados.

A hipótese deste estudo experimental é a de que num estado de pré-diabetes induzido por uma dieta hipercalórica (HC) existem já alterações hepáticas, para as quais os desequilíbrios da bioenergética mitocondrial são de extrema relevância. Equaciona-se ainda a possibilidade do sumo de mirtilo poder ser uma abordagem terapêutica (nutracêutica) segura e eficaz na prevenção da evolução da doença. Assim, o principal objetivo foi avaliar o seu efeito num modelo animal de pré-diabetes induzido por uma dieta HC, com destaque para a disfunção e lesão do tecido hepático, em particular para a bioenergética e dinâmica mitocondrial.

Foram utilizados ratos Wistar machos, divididos em 4 grupos, durante 23 semanas: Controlo, submetido a água e ração padrão; Mirtilo, tratado com sumo de mirtilo

(25g/kg/dia) entre as semanas 9 e 23; Pré-diabético com dieta HC, mantido com sacarose (35%) na bebida durante as primeiras 9 semanas, somando-se a esta dieta uma ração rica em gordura (60%) nas 14 semanas seguintes; e Pré-diabético tratado com sumo de mirtilo (HC+M), submetido ao mesmo protocolo mas tratado com sumo de mirtilo entre as semanas 9 e 23.

Os nossos resultados mostraram que este modelo pré-diabético de 23 semanas de dieta hipercalórica (grupo HC) origina aumento do peso corporal, hiperglicemia pós-prandial (normoglicemia em jejum), redução da tolerância à glicose, hiperinsulinemia pós-prandial, resistência à insulina, hipertrigliceridemia e aumento do estado oxidativo em soro. Para além disso, observou-se a presença de esteatose hepática focal, para além de diversas alterações relacionadas com a bioenergética mitocondrial do hepatócito, incluindo perturbações ao nível do potencial transmembranar (aumento da *lag-phase*, indicativo de alterações a nível do sistema fosforilativo), aumento da respiração mitocondrial, diminuição da permeabilidade mitocondrial e um aumento da expressão proteica de COXIV (indicativa da existência de alterações ao nível do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial). A adição de sumo de mirtilo à dieta hipercalórica (grupo HC+M) foi capaz de prevenir o desenvolvimento de grande parte destas modificações metabólicas induzidas pela dieta. Especificamente, melhorou a sensibilidade à insulina, a tolerância à glicose e o perfil antioxidante no soro, preveniu a hipertrigliceridemia e, para além disso, atenuou as alterações hepáticas, tanto a nível da esteatose focal como dos processos associados à dinâmica mitocondrial.

Em conclusão, uma dieta hipercalórica, constituída por elevados teores de lípidos (60%) e de hidratos de carbono (35% de sacarose) induziu uma condição de pré-diabetes e disfunção/lesão hepática precoce. O tratamento simultâneo com sumo de mirtilo preveniu a evolução destas alterações induzidas pela dieta, por mecanismos hipoteticamente relacionados com o seu efeito sensibilizador da insulina, pelas suas propriedades antioxidantes ou ainda através de preservação da eficiência mitocondrial a nível do hepatócito. Contudo, serão necessários estudos adicionais, incluindo a avaliação de outros tempos de exposição, outras doses de sumo de mirtilo e/ou dos seus principais componentes, bem como análise de outros marcadores, para melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos do sumo de mirtilo nesta fase da pré-diabetes.

Palavras-chave: pré-diabetes; modelo animal de dieta hipercalórica; disfunção hepática; dinâmica mitocondrial; sumo de mirtilo.

Abstract

Along with the epidemic data of type 2 diabetes mellitus (T2DM), the prevalence of prediabetes has also been increasing, namely in Portugal, where in 2015 it reached an estimated rate of 27.4% of the adult population. Prediabetes, described as a state of high risk for the development of T2DM, is certainly a privileged phase to implement strategies for preventing the progression of disease, reducing the risk of long-term complications.

Hepatic steatosis, mainly characterized by marked lipid accumulation in hepatic tissue, is a very common condition in T2DM (40-70%), where it usually takes the form of non-alcoholic fatty liver disease. This condition has a strong impact on the hepatic mitochondria, which are responsible for the production of over 90% of the ATP consumed by the cell, with a central role in several functions, including glucose and lipid metabolism.

The crucial importance of a healthy diet in the prevention and/or treatment of various diseases, including metabolic disorders, is now well recognized. Blueberry (*Vaccinium spp*) is a fruit rich in bioactive compounds, including phenolics ones, which confer numerous beneficial effects, namely in metabolic disorders, due to its high antioxidant capacity and its anti-inflammatory and insulin-sensitizing properties. There are several studies, both in animals and in humans, that evaluated the effect of blueberries on T2DM, however, the cellular mechanisms associated with its beneficial properties, namely in earlier disease situations (prediabetes), are still not completely elucidated.

The hypothesis of this experimental study is that in a prediabetes state induced by a hypercaloric diet (HC) there are already hepatic changes, for which the imbalances of mitochondrial bioenergetics are of the utmost relevance. In addition, it is envisaged the possibility of blueberry juice may be a safe and effective non-pharmacological therapeutic approach (nutraceutical) for the prevention of disease progression. In this sense, the main objective of this work was to evaluate its effect on an animal model of prediabetes induced by an HC diet, highlighting the dysfunction and damage of hepatic tissue, with a particular focus on bioenergetics and mitochondrial dynamics.

Male Wistar rats, divided into 4 groups, were used for 23 weeks: Control, submitted to water and standard chow; Blueberry, treated with blueberry juice (25g/kg/day) between weeks 9 and 23; Prediabetic with HC diet, maintained with sucrose solution (35%) into the beverage during the first 9 weeks, adding to this a high fat diet (60%) in the following 14

weeks; and prediabetic treated with blueberry juice (HC+M), submitted to the same protocol but treated with blueberry juice between weeks 9 and 23.

Our results showed that this prediabetic model induced by 23 weeks of hypercaloric diet (HC group) leads to an increase of body weight, postprandial hyperglycemia (with fasting normoglycemia), impaired glucose tolerance, postprandial hyperinsulinemia, insulin resistance, hypertriglyceridemia and increased oxidative status in serum. Moreover, the presence of focal hepatic steatosis was observed, in addition to several changes related with hepatic mitochondrial bioenergetics, including impairment of the transmembrane potential (prolonged lag-phase, an indicative of changes in the phosphorylative system), increased mitochondrial respiration, decreased mitochondrial permeability, and increased protein expression of COXIV (indicative of changes in the mitochondrial oxidative phosphorylation system). The addition of blueberry juice to the HC (HC+M group) was able to prevent the development of most of these metabolic changes induced by diet. In particular, it improved insulin sensitivity, glucose tolerance and serum antioxidant profile, prevented hypertriglyceridemia and, in addition, attenuated the hepatic changes, both within the focal steatosis and beyond the processes associated with mitochondrial dynamics.

In conclusion, a hypercaloric diet, containing high content of lipids (60%) and carbohydrate (35% sucrose), induced a condition of prediabetes and early hepatic liver dysfunction/injury. The concomitant treatment with blueberry juice prevented the evolution of these changes induced by diet, by mechanisms hypothetically related to its insulin sensitizing effect, by its antioxidant properties or through the preservation of mitochondrial efficiency at the hepatocyte level. However, further studies, including the evaluation of other exposure times, other doses of blueberry juice and/or its major bioactive compounds, as well as the analysis of other markers, will be required to better understand the cellular and molecular mechanisms underlying the effects of blueberry juice at this stage of prediabetes.

Keywords: prediabetes, animal model of hypercaloric diet, hepatic dysfunction, mitochondrial dynamics; blueberry juice

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xix
Capítulo I - Revisão Bibliográfica	1
1. Diabetes e pré-diabetes – Visão geral e dados epidemiológicos	3
1.1. Diabetes mellitus – Definição e caracterização	3
1.2. Pré-diabetes	5
1.3. Critérios de diagnóstico	5
1.4. Complicações diabéticas	6
2. Resistência à insulina, hiperglicemia, hiperlipidemia e glicolipototoxicidade	7
2.1. Resistência à insulina	7
2.2. Hiperglicemia e hiperlipidemia	9
2.2.1. Hiperglicemia, stresse oxidativo e glicotoxicidade	10
2.2.2. Lipotoxicidade	12
3. Doença do fígado gordo não alcoólico (DFGNA)	13
3.1. Principais funções do fígado	13
3.2. O papel central do fígado na diabetes	14
3.3. DFGNA e DMT2	16
4. O papel da mitocôndria na DMT2 e na DFGNA	20
4.1. Estrutura e principais funções da mitocôndria	20
4.1.1. Dinâmica mitocondrial – autofagia, fusão e fissão	23
4.1.2. O poro de permeabilidade transitória mitocondrial	26
4.1.3. Homeostase do cálcio	28
4.2. Disfunção mitocondrial na DMT2 e na DFGNA	29
5. Potencial antidiabético do mirtilo	35
5.1. Composição nutricional do mirtilo	36
5.2. Propriedades benéficas do mirtilo	36
5.2.1. Capacidade antioxidante e anti-inflamatória	37
5.2.2. Propriedades antidiabéticas e hepatoprotetoras	39
6. Modelos animais de DMT2 e de pré-diabetes	42
Capítulo II – Objetivos	45

Capítulo III – Materiais e Métodos.....	49
1. Preparação do sumo de mirtilo.....	51
2. Animais e acondicionamento	51
3. Grupos de estudo e protocolo experimental	51
4. Monitorização do peso corporal e consumos calóricos.....	52
5. Sacrifício dos animais e colheita de sangue e tecidos	53
6. Perfil glicémico e insulínico.....	53
6.1. Ensaios <i>in vivo</i>	53
6.1.1. Glicemia em jejum.....	53
6.1.2. Teste de tolerância à glicose (TTG).....	53
6.1.3. Teste de tolerância à insulina (TTI).....	54
6.2. Ensaio <i>ex vivo</i>	54
6.2.1. Glicemia pós-prandial.....	54
6.2.2. Hemoglobina glicosilada (HbA1c)	54
6.3. Níveis séricos de insulina.....	54
7. Perfil lipídico: níveis séricos de colesterol total e de triglicéridos	55
8. Equilíbrio oxidativo	55
8.1. Quantificação da peroxidação lipídica no soro	55
8.2. Quantificação da capacidade antioxidante total no soro	56
9. Análise histológica do tecido hepático.....	56
10. Isolamento de mitocôndrias hepáticas e determinação da concentração de proteína.....	57
11. Avaliação do potencial transmembranar mitocondrial.....	58
12. Determinação do consumo de oxigénio em preparações mitocondriais	59
13. Avaliação da formação de espécies reativas de oxigénio.....	60
14. Detecção da indução da transição de permeabilidade mitocondrial	60
15. Análise de proteínas por Western blotting	61
16. Análise estatística.....	61
Capítulo IV – Resultados.....	63
1. Evolução do peso corporal	65
2. Consumo calórico.....	65
3. Perfil glicémico	66
3.1. Teste de tolerância à glicose (TTG)	66
3.2. Glicemia em jejum e glicemia pós-prandial.....	67
3.3. Hemoglobina glicada (HbA1c)	68
4. Perfil insulínico	68
4.1. Teste de tolerância à insulina (TTI)	68

4.2. Níveis séricos de insulina.....	69
5. Parâmetros bioquímicos.....	70
5.1. Concentração sérica de triglicérides	70
5.2. Concentração sérica de colesterol	70
5.3. Atividade das enzimas hepáticas.....	71
6. Equilíbrio oxidativo	71
6.1. Peroxidação lipídica no soro.....	71
6.2. Capacidade antioxidante total (TAS) no soro	72
6.2.1. Razão MDA/TAS no soro.....	72
7. Análise do tecido hepático	73
7.1. Pesos do fígado e características macroscópicas	73
7.2. Histologia hepática.....	73
8. Bioenergética mitocondrial	74
8.1. Potencial transmembranar.....	74
8.2. Respiração mitocondrial	75
8.3. Indução da permeabilidade transitória mitocondrial.....	76
8.4. Formação de espécies reativas ao oxigénio (ROS)	77
8.5. Conteúdo em proteínas mitocondriais.....	78
Capítulo V – Discussão e Conclusões.....	81
1. Discussão	83
2. Conclusões	96
Capítulo VII – Bibliografia.....	97

Índice de Figuras

Figura 1 – Número estimado de pessoas com diabetes em todo o mundo e por região em 2017 e 2045 (entre 20-79 anos).....	4
Figura 2 – Valores padrão dos testes sanguíneos para diagnóstico de diabetes e da pré-diabetes....	5
Figura 3 – Representação esquemática da história natural da DMT2.....	7
Figura 4 – Fisiopatologia da hiperglicemia e aumento de ácidos gordos livres na DMT2.....	8
Figura 5 – Mecanismos envolvidos na contribuição da disfunção das células beta.....	11
Figura 6 – Visão simplificada do efeito da insulina no desencadeamento do movimento de transportadores intracelulares de glicose para a membrana celular.....	12
Figura 7 – Progressão de doença hepática causada por diabetes.....	14
Figura 8 – Corte de fígado com esteatose macrovesicular de um doente diabético.....	17
Figura 9 – A resistência à insulina leva ao aumento da captação e síntese de AGL no fígado, o que sensibiliza o fígado a uma série de acertos que induzem lesão hepática e progressão de esteatose simples para EHNA.....	18
Figura 10 – Progressão da doença do fígado gordo não alcoólica (DFGNA) para cirrose e fatores de risco e mecanismos patológicos característicos de cada estadio.....	19
Figura 11 – Estrutura e micrografia eletrónica de uma mitocôndria de células hepáticas em alta ampliação.....	20
Figura 12 – Cadeia respiratória mitocondrial.....	22
Figura 13 – Determinantes moleculares de redes de controlo de qualidade mitocondrial.....	26
Figura 14 – Esquema simplificado do ciclo de funções mitocondriais na fisiologia, numa condição normal e na fisiopatologia.....	27
Figura 15 – Interação entre a dinâmica mitocondrial, o stresse oxidativo e a função mitocondrial na diabetes tipo 2.....	30
Figura 16 – Alterações metabólicas que resultam na acumulação de triglicédeos hepáticos no estado de resistência à insulina.....	31
Figura 17 – Disfunção mitocondrial na DFGNA.....	34
Figura 18 – Propostas de vias metabólicas envolvidas nos efeitos do mirtilo na obesidade e comorbidades relacionadas.....	39
Figura 19 – Grupos experimentais e desenho do protocolo animal.....	52
Figura 20 – Colheita de sangue no dia do sacrifício.....	53
Figura 21 – Evolução do peso corporal dos ratos dos grupos em estudo.....	65
Figura 22 – Registos de consumo acumulado de ração e de bebida e cálculo do consumo calórico total.....	66
Figura 23 – Teste de tolerância à glicose (TTG).....	67

Figura 24 – Valores da glicemia em jejum e pós-prandial.....	67
Figura 25 – Hemoglobina glicada (%)	68
Figura 26 – Teste de tolerância à insulina (TTI)	69
Figura 27 – Níveis séricos de insulina em jejum e no estado pós-prandial.....	69
Figura 28 – Níveis séricos de triglicerídeos.....	70
Figura 29 – Valores séricos de colesterol total.....	70
Figura 30 – Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....	71
Figura 31 – Concentração sérica de MDA	71
Figura 32 – Capacidade antioxidante total (TAS) no soro	72
Figura 33 – Razão MDA/TAS no soro.....	72
Figura 34 – Fotografias representativas do fígado	73
Figura 35 – Microscopia óptica (10x e 40x) da histologia hepática de animais	74
Figura 36 – Visualização do potencial transmembranar mitocondrial.....	74
Figura 37 – Suscetibilidade à indução da permeabilidade transitória mitocondrial.....	77
Figura 38 – Fluorescência mitocondrial no estado basal e com antimicina A	77
Figura 39 – Visualização do conteúdo mitocondrial em COX IV, LC3-I e LC3-II, OPA1, p62, SIRT3, TFAM e TOM20	78
Figura 40 – Níveis de expressão de proteínas mitocondriais: COX IV, LC3-I e LC3-II, OPA1, p62, SIRT3 e TFAM.....	79

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Comparação dos critérios de diagnóstico da pré-diabetes entre a OMS e a ADA	6
Tabela 2 – Resumo de modelos animais (roedores) de DMT2 e obesidade.....	43
Tabela 3 – Lista de anticorpos primários usados para Western Blot.....	61
Tabela 4 – Peso absoluto e peso relativo dos fígados	73
Tabela 5 – Potencial transmembranar ($\Delta\Psi_m$) e <i>lag-phase</i> mitocondriais.....	75
Tabela 6 – Respiração mitocondrial	75

Lista de Siglas e Abreviaturas

- $\Delta\Psi_m$ – Potencial transmembranar mitocondrial
- ADA – Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*)
- ADP – Difosfato de adenosina
- AGEs – Produtos finais de glicosilação avançada (*Advanced glycation end-products*)
- AGJ – Anomalia da glicemia em jejum
- AGL – Ácidos gordos livres
- AGNE – Ácidos gordos livres não esterificados
- ALT – Alanina aminotransferase
- AMP – Adenosina monofosfato (*Adenosine monophosphate*)
- AMPK – *AMP-activated protein kinase*
- AST – Aspartato aminotransferase (*Aspartate transaminase*)
- ATP – Adenosina trifosfato
- AUC – Área sob a curva (*Area under the curve*)
- ChREBP – *Carbohydrate sensitive response element binding protein*
- DFGNA – Doença do fígado gordo não alcoólico
- DM – Diabetes mellitus
- DMT1 – Diabetes mellitus tipo 1
- DMT2 – Diabetes mellitus tipo 2
- EHNA – Esteato-hepatite não alcoólica
- FGNA - Fígado gordo não alcoólico
- GLUT 4 - Transportador de glicose do tipo 4 (*Glucose transporter type 4*)
- HbA1c – Hemoglobina glicada (*Glycated hemoglobin*)
- HC – Hipercalórica
- HDL – Lipoproteína de alta densidade (*High-density lipoprotein*)
- HSu – Dieta rica em sacarose (em solução – 35 %) (*High-sucrose*)
- ICR – Índice de controlo respiratório
- IDF – *International Diabetes Federation*
- LDL – Lipoproteínas de baixa densidade (*Low-density lipoproteins*)
- MDA – Malondialdeído
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PGC1 α – *Proliferator-activated ceceptor gamma co-activator 1-alpha*
- PKC – Proteína cinase C (*Protein kinase C*)

PPTM – Poro de permeabilidade transitória mitocondrial
PTGO – Prova de tolerância à glicose oral
PTM – Permeabilidade transitória mitocondrial
ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*)
SPD – Sociedade Portuguesa de Diabetologia
TA – Tecido adiposo
TAS – Estado antioxidante total (*Total antioxidant status*)
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Tiobarbituric acid reactive substances*)
TDG – Tolerância diminuída à glicose
TFAM – Fator de transcrição mitocondrial A (*Mitochondrial transcription factor A*)
TGs – Triglicerídeos
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa (*Tumor necrosis factor- α*)
TTG – Teste de tolerância à glicose
TTI – Teste de tolerância à insulina
VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very low-density lipoprotein*)

Capítulo I - Revisão Bibliográfica

1. Diabetes e pré-diabetes – Visão geral e dados epidemiológicos

1.1. Diabetes mellitus – Definição e caracterização

De acordo com a Sociedade Portuguesa de Diabetologia (SPD) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), a diabetes mellitus (DM) é uma doença crónica de etiologia múltipla que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não a pode usar eficientemente, resultante de deficiência na secreção e/ou ação de insulina (WHO, 2016; SPD, 2016). A insulina é a principal hormona que regula e mantém a homeostasia da glicose, quando não é produzida em quantidades suficientes pelo pâncreas ou quando a sua ação esta comprometida, leva à ocorrência de hiperglicemia. Quando se torna persistente, a hiperglicemia causa comprometimento da função e lesão de vários tecidos e órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (SPD, 2016; ADA, 2010).

Segundo a OMS e a Associação Americana de Diabetes (ADA), a DM pode ser classificada em quatro categorias diferentes: diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), diabetes gestacional e outros tipos específicos (WHO, 2016; ADA, 2010).

A DMT1 é considerada uma doença autoimune, caracterizada por uma destruição progressiva das células β produtoras de insulina no pâncreas, resultando na incapacidade de produzir a insulina necessária. A razão pela qual isso ocorre não é totalmente compreendida, contudo, a predisposição genética e fatores ambientais parecem estar associados com a supressão da síntese da insulina. A doença pode afetar pessoas de qualquer idade, embora seja diagnosticada geralmente em crianças ou jovens adultos. Indivíduos com DMT1 necessitam de insulina exógena para manter os níveis de insulina, de forma a controlar os níveis de glicose no sangue, sendo também designados de insulino dependentes (World Health Organization, 2006; SPD, 2016; IDF, 2015).

A DMT2 é a forma mais comum da diabetes, afetando 90 – 95 % de todos os indivíduos diabéticos. Contrariamente ao que acontece na DMT1, não há (pelo menos inicialmente) falta de produção de insulina pelas células β pancreáticas, mas, em vez disso, uma situação de resistência à insulina. Ou seja, embora ainda esteja a ser produzida, a insulina é mal utilizada pelo corpo (DeFronzo, 2004), levando a um aumento da glicemia. Apesar de ser uma doença típica da idade adulta (que ocorre geralmente a partir dos 40 anos

de idade), a DMT2 está atualmente a ser diagnosticada em idades mais jovens, afetando mesmo os adolescentes (Zimmet *et al.*, 2001).

A prevalência da DMT2 tem vindo a aumentar a uma escala alarmante, tanto a nível mundial como nacional. De acordo com as estimativas recentes da Federação Internacional de Diabetes (IDF), a diabetes atinge mundialmente cerca de 425 milhões de indivíduos adultos, e estes números tendem a aumentar, estima-se que em 2045 serão 629 milhões. Ainda em relação às estimativas IDF para o ano de 2017, cerca de 58 milhões de europeus seriam diabéticos (Figura 1) (IDF, 2017).

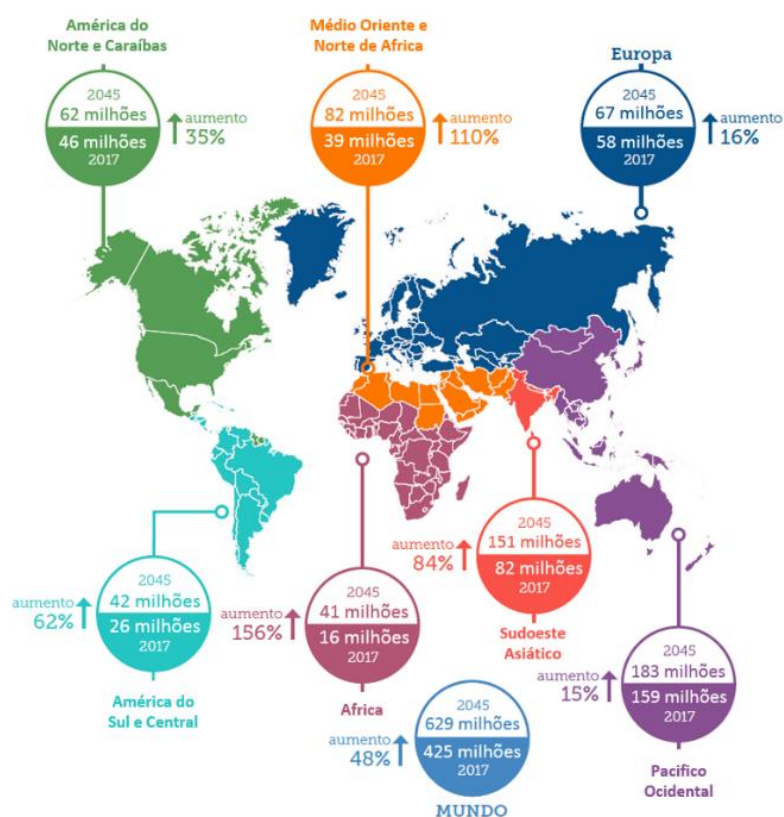


Figura 1 – Número estimado de pessoas com diabetes em todo o mundo e por região em 2017 e 2045 (entre 20-79 anos) (Adaptado de: IDF, 2017).

Segundo os dados do Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes, em 2015, a prevalência estimada de diabetes na população portuguesa entre 20 e 79 anos foi de 13,3% (correspondendo a mais de 1 milhão de indivíduos), 7,5 % já diagnosticados e 5,8 % por diagnosticar (SPD, 2016).

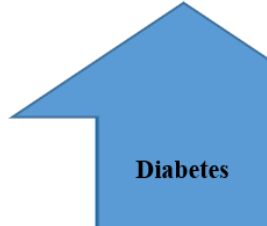
1.2. Pré-diabetes

A hiperglicemia intermédia, também conhecida como pré-diabetes, corresponde a uma alteração do metabolismo dos hidratos de carbono, na qual os níveis de glicose no sangue são superiores ao normal, contudo, não são suficientemente elevados para serem classificados como diabetes. A pré-diabetes é caracterizada por alterações no metabolismo da glicose, incluindo duas condições: a tolerância diminuída à glicose (TDG) e/ou a anomalia da glicemia em jejum (AGJ). Estes estados são reconhecidos como fatores de risco para o desenvolvimento de DMT2 (SPD, 2016). A prevenção da evolução da pré-diabetes é seguramente uma das formas mais eficazes de evitar as complicações severas desta doença.

Para além da diabetes, também a prevalência da pré-diabetes está a aumentar em todo o mundo e os especialistas preveem que mais de 470 milhões de pessoas serão pré-diabéticas em 2030 (Tabák *et al.*, 2012). Em Portugal, em 2015, a pré-diabetes (AGJ e/ou TDG) atingiu valores estimados de 27,4 % da população portuguesa entre 20 e 79 anos (2,1 milhões de indivíduos), desagregada da seguinte forma: AGJ - 10,4 % da população (0,8 milhão de pessoas); TDG - 14,3 % da população (1,1 milhão de pessoas); e AGJ + TDG - 2,7 % da população (0,2 milhões de pessoas).

1.3. Critérios de diagnóstico

Qualquer um dos seguintes testes pode ser usado para diagnosticar a pré-diabetes e a diabetes (ADA, 2012) (Figura 2): avaliação da hemoglobina glicada (HbA1c), da glicose plasmática em jejum (GJ) e prova de tolerância à glicose oral (PTGO).



	HbA1C (%)	Glicemia em jejum (mg/dL)	Prova de tolerância à glicose oral (mg/dL)
Diabetes	6,5 ou acima	126 ou acima	200 ou acima
Pré-diabetes	5,7 a 6,4	100 a 125	140
Normal	Cerca de 5	99 ou inferior	139 ou inferior

Figura 2 – Valores padrão dos testes sanguíneos para diagnóstico da diabetes e da pré-diabetes (Adaptado de: ADA, 2012)

Os critérios de diagnóstico da pré-diabetes variam entre instituições, como representado na Tabela 1. De acordo com a OMS, os indivíduos apresentam elevado risco de desenvolver a diabetes se se confirmar a presença de dois estados distintos: AGJ, que é definida com valores de glicose em jejum compreendidos entre 110 e 125 mg/dL, sem apresentar uma condição de TDG; isto é, com uma resposta normal aos níveis de glicose (< 140 mg/dL); e TDG, estabelecida quando os valores de glicose plasmática em jejum são <126 mg/dL, e a concentração de glicose plasmática está compreendida entre 140 e 199 mg/dL, avaliada durante uma PTGO; isto é, 2 h após administração oral de uma solução de 75 g de glicose (WHO, 2016) (Figura 2 e Tabela 1). A ADA aplica os mesmos limiares para TDG, mas usa um menor valor de corte para a AGJ (glicose em jejum entre 100 e 125 mg/dL) e introduziu a hemoglobina glicada (HbA1c) (intervalo de 5,7 a 6,4 %) como uma nova categoria para o diagnóstico da pré-diabetes (ADA, 2010).

Tabela 1 – Comparação dos critérios de diagnóstico da pré-diabetes entre a OMS (2017) e a ADA (2010).

Parâmetros	OMS	ADA	Categoria
Glicose em jejum	110 – 125 mg/dL	100 – 125 mg/dL	AGJ
Glicose plasmática - 2 horas após 75 g durante PTGO	140 – 199 mg/dL	140 – 199 mg/dL	TDG
HbA1c	—	5,7 – 6,4 %	Pré-diabetes

PTGO, prova de tolerância à glicose oral; HbA1c, hemoglobina glicada; AGJ, anomalia da glicemia em jejum; TDG, tolerância diminuída à glicose.

1.4. Complicações diabéticas

Para além da elevada prevalência da doença, as complicações crônicas da diabetes levam a um impacto significativo no orçamento do Sistema Nacional de Saúde (SNS) devido a hospitalizações, invalidez precoce, morbidade e diminuição da qualidade de vida, tornando-se um grave problema de saúde pública.

A frequência, gravidade e progressão das complicações diabéticas estão relacionadas com os níveis de hiperglicemia, alterações metabólicas associadas à duração da doença, à exposição de fatores de risco e ainda com fatores genéticos. Os doentes com diagnóstico da diabetes podem ter diversas complicações, quer a nível microvascular (retinopatia, nefropatia ou neuropatia periférica) como a nível macrovascular (doença cerebrovascular, acidente vascular cerebral, doença arterial coronária, enfarte agudo do miocárdio ou doença vascular periférica), causando sofrimento humano e custos significativos em despesas com cuidados de saúde (Fowler, 2008).

As complicações crônicas ou tardias que afetam vários órgãos ou sistemas são responsáveis pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade associadas à doença, complicações essas que nem sempre se detetam atempadamente. Assim, torna-se essencial que os doentes com diabetes façam um controlo apertado da doença para prevenir futuras complicações.

2. Resistência à insulina, hiperglicemia, hiperlipidemia e glicolipototoxicidade

2.1. Resistência à insulina

A resistência à insulina pode iniciar-se em fases muito precoces da doença (pré-diabetes), muitos anos antes do diagnóstico de DMT2 (Figura 3). A resistência à insulina (ou insulinoresistência) é caracterizada pela redução das ações biológicas clássicas da insulina, nomeadamente, em estimular a captação da glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo (TA), em inibir a lipólise no TA e a produção hepática da glicose. Pequenos aumentos de glicose, embora moderados, quando cronicamente mantidos tornam-se prejudiciais devido à toxicidade da glicose (glicotoxicidade), o que em si causa disfunção de células pancreáticas. Assim, mesmo com uma reserva ilimitada de células β , a resistência à insulina é a primeira anomalia detetada em doentes que irão desenvolver a diabetes (Kashyap & DeFronzo, 2007).

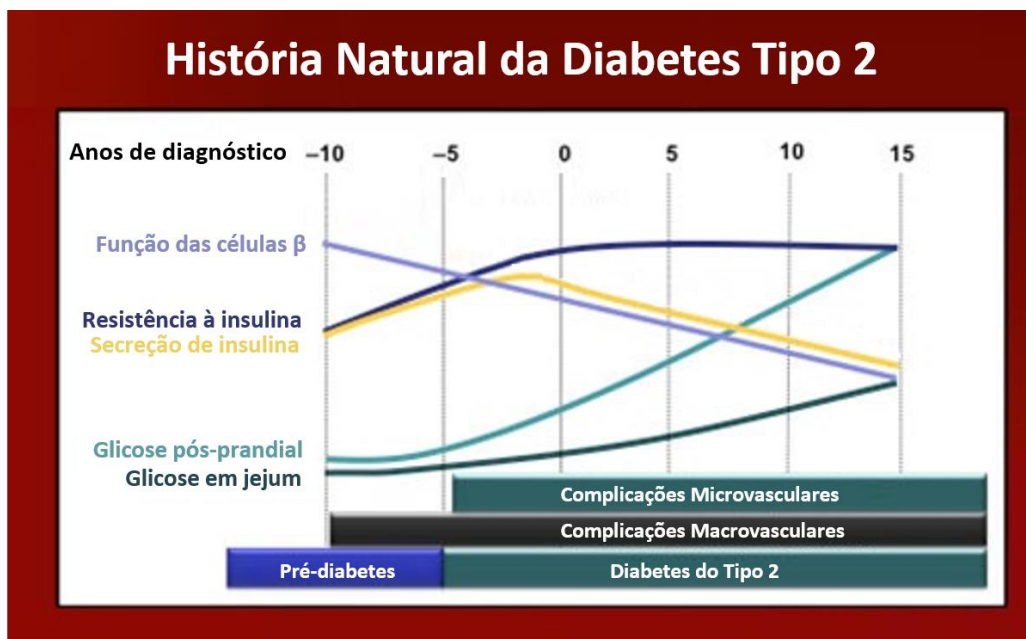


Figura 3 – Representação esquemática da história natural da DMT2 (Adaptado de: Ramlo-Halsted & Edelman, 1999).

A resistência à insulina é causada por uma resposta reduzida dos tecidos-alvo da insulina à sua estimulação, constituindo um importante fator de risco para o desenvolvimento de DMT2 (Choi & Kim, 2010; DeFronzo & Tripathy, 2009; Wilcox, 2005).

Sob o ponto de vista metabólico, a insulinoresistência evidencia-se nas células hepáticas, musculares e adiposas (Figura 4). O músculo e o tecido adiposo são os principais órgãos responsáveis pela utilização periférica da glicose em condições pós-prandiais (Stumvoll *et al.*, 2005).

A secreção de insulina pelo pâncreas reduz a produção de glicose pelo fígado, aumentando a captação pelo músculo esquelético e suprimindo a liberação de ácidos gordos livres (AGL) a partir do TA. Os diferentes fatores que contribuem para a patogênese da DMT2 afetam a secreção de insulina e a sua ação, conduzem à hiperglicemia e ao aumento de AGL circulantes, que, por sua vez, agravam a secreção de insulina e a insulinoresistência (Stumvoll *et al.*, 2005).

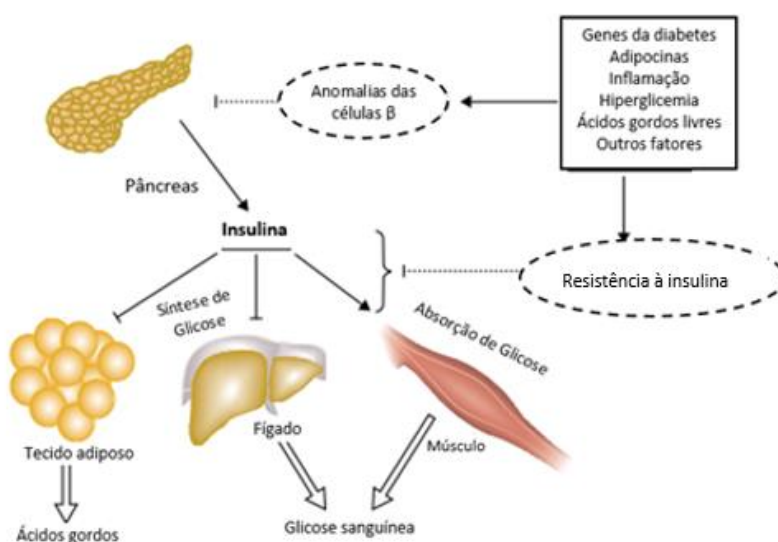


Figura 4 – Fisiopatologia da hiperglicemia e aumento de ácidos gordos livres na DMT2 (Adaptado de: Stumvoll *et al.*, 2005).

Tanto em jejum como no estado pós-prandial, a absorção periférica de glicose e a supressão da produção de triglicerídeos (TGs) no soro através das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), geralmente mediada pela insulina, está comprometida (Bilous & Donnelly, 2010; Smith *et al.*, 1999; Choi & Kim, 2010).

No tecido adiposo, a resistência à insulina aumenta a lipólise, o que aumentará a liberação de ácidos gordos livres não esterificados (AGNE) que, por sua vez, atuarão sobre o fígado e o músculo esquelético, afetando o metabolismo da glicose nestes tecidos (Bilous

& Donnelly, 2010). O aumento de AGNE pode levar a um agravamento da hiperglicemia por interferência com a absorção de glicose mediada pela insulina. Sob condições fisiológicas, o músculo esquelético é o principal consumidor de glicose, no entanto, no estado de resistência à insulina, com níveis elevados de AGNE plasmáticos, há uma acumulação lipídica, nomeadamente de TGs, neste tecido (Guilherme *et al.*, 2008; Ragab *et al.*, 2015; Turner *et al.*, 2014). Para além disso, elevadas concentrações de AGNE em circulação também resultam na acumulação no tecido hepático (sobretudo de TGs) levando a duas possíveis situações de risco: esteatose hepática e estimulação da gliconeogénese que aumentará os níveis plasmáticos de glicose (Guilherme *et al.*, 2008; Moreno-Indias & Tinahones, 2015; Lambadiari *et al.*, 2015).

A resistência à insulina no fígado é o principal fator causador da doença do fígado gordo não alcoólico (DFGNA), caracterizada pela acumulação de lípidos que podem ser libertados pelo TA na lipólise, o que no fígado leva a uma diminuição da sensibilidade à insulina (Liangyou, 2014). A resistência à insulina no fígado também é caracterizada por uma reduzida inibição (pela insulina) da produção de lipoproteínas de baixa densidade que promove hipertrigliceridemia (Bilous & Donnelly, 2010).

2.2. Hiperglicemia e hiperlipidemia

Para compreender os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pela DMT2 é necessário conceptualizar os limites para os quais a glicemia está controlada. A insulina, como anteriormente mencionado, é a hormona-chave na regulação da glicose sanguínea, sendo a normoglicemia mantida pelo equilíbrio entre a ação e a secreção da insulina. É importante referir que as células β pancreáticas normais podem adaptar-se às alterações na ação da insulina, ou seja, uma diminuição da ação da insulina é acompanhada por um aumento da sua secreção pelas células pancreáticas, e vice-versa, originando uma situação de hiperinsulinemia sustentada, o que requer a capacidade de adaptação e de reserva que, quando entra em esgotamento, conduz à hiperglicemia. A DMT2 ocorre quando a função das células β é inadequadamente baixa para o grau específico de insulinoresistência. Assim, a disfunção das células β é uma componente crítica na patogénese da DMT2.

Quando ocorre um decréscimo da ação da insulina (como acontece na obesidade), o sistema habitualmente compensa através de um aumento da função das células β e, simultaneamente, a concentração da glicose em jejum e 2h após sobrecarga oral de glicose aumentam moderadamente (Stumvoll *et al.*, 2005). Este aumento, embora sendo pequeno,

quando atinge um carácter de cronicidade torna-se lesivo devido à toxicidade da glicose e é, por si só, causa de disfunção das células do pâncreas. Deste modo, mesmo existindo (ainda que teoricamente) uma reserva ilimitada de células β , a insulinoresistência constitui o caminho para a hiperglicemia e a DMT2 (Stumvoll *et al.*, 2005).

2.2.1. Hiperglicemia, stresse oxidativo e glicotoxicidade

A hiperglicemia e a ingestão de AGL estão entre as principais causas indutoras de stresse oxidativo (Evans *et al.*, 2002; Lazo & Mejía, 2013). A hiperglicemia tem sido vista como uma das principais causas da cardiomiopatia diabética, devido à ativação de vários mecanismos que conduzem a um aumento do stresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e mecanismos de defesa antioxidantes. As ROS são espécies químicas que resultam da ativação ou da redução de oxigénio molecular ou derivados dos produtos desta redução (Irani, 2000; Nunes *et al.*, 2012).

A hiperglicemia crónica e a produção exacerbada de ROS induzem o stresse oxidativo por diversas vias, incluindo o aumento da ativação das vias do poli-ol e hexosamina, ativação de isoformas clássicas da proteína PKC (*protein kinase C*) e aumento da formação de produtos avançados de glicação (AGEs) a partir da auto-oxidação da glicose, que induzem o aumento da produção de ROS mitocondrial. A ativação destas vias leva a um aumento da glicotoxicidade, o que pode causar lesão celular. Para além disso, o stresse oxidativo também está associado ao desenvolvimento de complicações diabéticas, à resistência à insulina e à disfunção das células β pancreáticas (Nunes *et al.*, 2012).

A glicotoxicidade refere-se à lesão estrutural e funcional nas células β pancreáticas causadas pela hiperglicemia crónica. Muitas vias de sinalização podem afetar o crescimento e a sobrevivências das células β . Alguns dos muitos mecanismos que podem estar envolvidos nessa disfunção são o stresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, o stresse do retículo endoplasmático, a inflamação local e a deposição de material amilóide, associados à predisposição genética (Muoio & Newgard, 2008; Gloyn *et al.*, 2008; Sigurd Lenzen, 2008; Donath *et al.*, 2008). A hiperglicemia, decorrente desse processo, e o aumento da concentração dos AGL, acarretando glicolipototoxicidade, são fatores agravantes que aceleram o declínio das células β na DMT2 (Figura 5) (Cnop *et al.*, 2005; Poitout & Robertson, 2008; Rhodes, 2005).

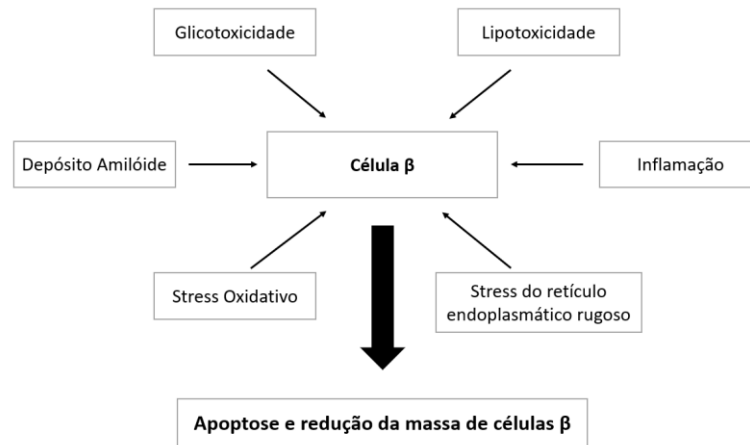


Figura 5 – Mecanismos envolvidos na contribuição da disfunção das células beta (Adaptado de: Leal & Voltarelli, 2010).

O estado funcional das células β pancreáticas define o estado da doença e a sua reversibilidade (DeFronzo, 2004; DeFronzo & Abdul-Ghani, 2011). A exposição prolongada e crônica à hiperglicemia pode causar dessensibilização ou mesmo esgotamento das células β , o que as torna incapazes de secretar insulina (Robertson *et al.*, 2003). Se a situação de hiperglicêmica se mantiver, pode ocorrer extinção irreversível da produção de insulina e, em última instância, morte de células β (Robertson *et al.*, 2003; Pratley, 2013; Kaneto & Matsuoka, 2012).

Uma explicação para a glicotoxicidade envolve o processo de transporte de glicose nas células. Nos tecidos periféricos sensíveis à insulina (tecido adiposo, cardíaco e muscular), a entrada de glicose nas células é limitada pelo número e pela atividade dos transportadores de glicose da membrana. O principal transportador de glicose nestes tecidos é o transportador de glicose do tipo 4 (GLUT 4) (Burant *et al.*, 1991), que existe tanto nas vesículas intracelulares como na membrana plasmática (Figura 6). A insulina atua durante alguns minutos através de recetores de insulina de membrana, para gerar uma série de sinais intracelulares que causam o movimento das vesículas contendo GLUT4 para a membrana plasmática, fusão das vesículas na membrana e entrada de glicose (Shepherd & Kahn, 1999). A própria glicose pode interferir em uma ou mais dessas etapas. Essa interferência é sugerida por estudos de culturas de células musculares e adipócitos, nas quais diminui a incubação com altos níveis de glicose, enquanto que a incubação em níveis baixos de glicose aumenta a atividade de transporte de glicose estimulada pela insulina (Rossetti *et al.*, 1990).

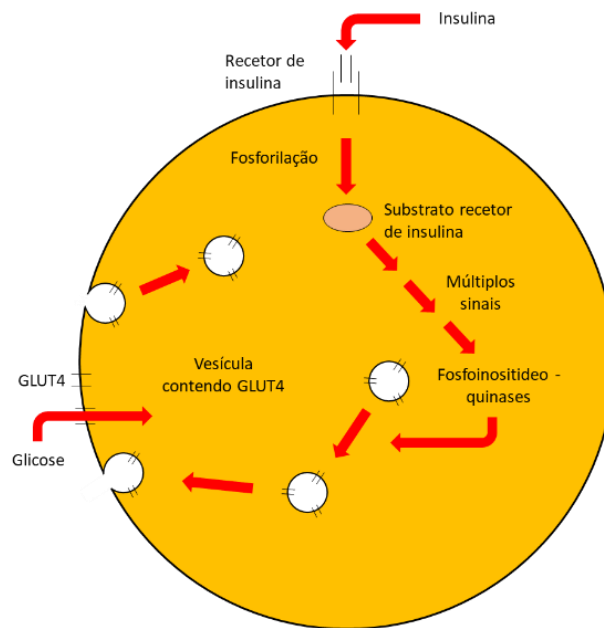


Figura 6 – Visão simplificada do efeito da insulina no desencadeamento do movimento de transportadores intracelulares de glicose para a membrana celular (William & Sivitz, 2001).

2.2.2. Lipotoxicidade

Além da hiperglicemia, a dislipidemia é uma característica importante da DMT2 com perfis lipídicos alterados (Cnop *et al.*, 2005). A ingestão excessiva de nutrientes associada ao sedentarismo leva a distúrbios metabólicos, como a obesidade, caracterizados por aumento de AGL circulantes, de lipoproteínas, de leptina e de citocinas, que são fatores que contribuem para a diabetes.

O termo "lipotoxicidade" refere-se ao efeito nocivo da hiperlipidemia prolongada (Unger, 2003). Na lipotoxicidade, não é apenas o depósito intracelular de TGs que está envolvido no aparecimento de resistência à insulina. O diacilglicerol é uma molécula que, no interior de hepatócitos e miócitos, exerce um efeito direto sobre alguns elementos da via de sinalização da insulina, bloqueando a sua ação (Shulman, 2000). Assim, grande parte das células do corpo humano, principalmente as células musculares, mas também as do coração e do diafragma, podem armazenar e utilizar no seu metabolismo tanto a glicose como os AGL (Randle *et al.*, 1963). A insulina controla essa competição entre as vias metabólicas glicídicas e lipídicas, favorecendo a utilização de glicose e o armazenamento de ácidos gordos (Randle *et al.*, 1963). Na presença de níveis elevados de AGL existe competição destes com a glicose como substrato energético, conduzindo à diminuição da utilização de glicose, com aumento da glicemia e estimulação da liberação de quantidades de insulina cada vez maiores, promovendo o aumento da resistência às ações da insulina. Contudo,

mesmo na ausência de níveis elevados de AGL, como na fase pós-prandial, pode ocorrer insulinoresistência (Kelley *et al.*, 1993). Para tal pode contribuir a alteração da liberação da “substância sensibilizadora da insulina hepática” (HISS), uma substância com origem hepática que é normalmente libertada em resposta à estimulação parassimpática do fígado, após as refeições (Ribeiro *et al.*, 2008). A entrada de glicose nas células fica prejudicada, sendo utilizados AGL para a produção de adenosina trifosfato (ATP). A acumulação intracelular destas moléculas gera um ciclo vicioso em que a insulina, exercendo um efeito cada vez menor, desencadeia vários processos implicados na diabetes, incluindo dislipidemia, lesão endotelial e aterosclerose acelerada.

Estudos espectroscópicos de ressonância magnética demonstraram que a acumulação de gordura intra-hepática está intimamente associada à resistência à insulina (Mayerson *et al.*, 2002; Bajaj *et al.*, 2003; Belfort *et al.*, 2006). Os metabolitos tóxicos intracelulares do metabolismo de triacilglicerol e ácidos gordos (acil CoA, diacilglicerol, ceramidas de cadeia longa) causam resistência severa à insulina, comprometendo a sinalização de insulina e múltiplos passos intracelulares do metabolismo da glicose (Kashyap *et al.*, 2004; Belfort *et al.*, 2005; Griffin *et al.*, 1999).

3. Doença do fígado gordo não alcoólico (DFGNA)

3.1. Principais funções do fígado

O fígado desempenha um papel central na regulação do metabolismo de hidratos de carbono, proteínas e lípidos. Este órgão é responsável pela regulação dos níveis de glicose plasmática através da glicogénese e da glicogénólise (Garcia-Compean *et al.*, 2009). É um órgão-chave na manutenção da homeostase lipídica, sendo um dos principais locais de oxidação de ácidos gordos juntamente com o músculo esquelético (principalmente a oxidação que ocorre nas mitocôndrias) e é o único órgão capaz de sintetizar ácidos gordos através da lipogénese *de novo* (Fabbrini *et al.*, 2010). Para além disso, o fígado é um regulador importante do metabolismo proteico, uma vez que os hepatócitos sintetizam proteínas essenciais, como a albumina e as lipoproteínas, e permitem a desintoxicação da amónia através do ciclo da ureia (Boon *et al.*, 1999).

O seu funcionamento normal é essencial para a manutenção dos níveis de glicose no sangue e para um fornecimento contínuo de energia da glicose para os órgãos que o requerem. O fígado utiliza a glicose como combustível, através do armazenamento de glicose sob a forma de glicogénio, ou conversão em lípidos para exportação e

armazenamento no tecido adiposo, e tem a capacidade de armazená-lo, em jejum, por catabolismo do glicogénio e sintetizá-lo a partir de precursores aglicanos (não hidratos de carbono) através da gliconeogénese. Por sua vez, essas respostas são reguladas pelas principais hormonas (insulina e glucagon) que modulam as vias de sinalização e a expressão génica, levando à inibição ou estimulação da produção de glicose, respetivamente. A glicose absorvida pelo trato intestinal é transportada através da veia porta para o fígado. Embora o destino absoluto desta glicose ainda seja controverso, alguns autores sugerem que a maior parte da glicose absorvida é retida pelo fígado, de modo que o aumento da concentração de glicose periférica reflete apenas um componente menor da glicose absorvida pós-prandialmente (Björntorp & Sjöström, 1978).

3.2. O papel central do fígado na diabetes

Na sociedade atual, um dos graves problemas de saúde é o aumento da prevalência de obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus, proporcionando que as alterações hepáticas resultantes adquiram cada vez maior importância, podendo progredir desde alteração das enzimas hepáticas até esteatose hepática, fibrose, cirrose e hepatocarcinoma (Figura 7) (Tolman *et al.*, 2007).

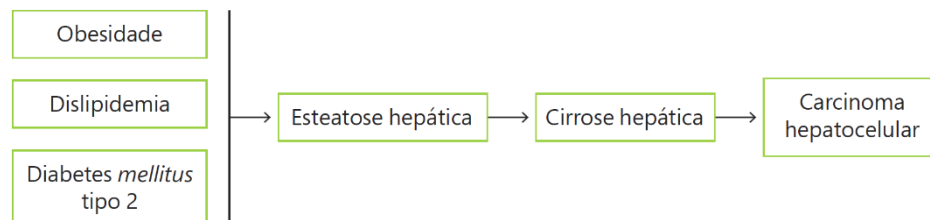


Figura 7 – Progressão de doença hepática causada por diabetes (Giestas *et al.*, 2015).

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos são complexos (Loria *et al.*, 2013). A resistência à insulina associada à síndrome metabólica e à DMT2 promove a libertação de ácidos gordos pelo TA, que se acumulam no hepatócito contribuindo para a lipogénese *de novo* e aumento dos TGs no fígado. Esta acumulação de gordura além de originar esteatose hepática também resulta em stresse oxidativo a nível mitocondrial (lipotoxicidade) com produção de radicais livres e consequente indução de inflamação crónica, necrose e apoptose celular (Loria *et al.*, 2013). A inflamação hepática crónica pode, a longo prazo, resultar em fibrose por estimulação das células estreladas hepáticas que produzem colagénio, podendo evoluir para cirrose ou carcinoma hepatocelular (Anty & Lemoine, 2011). No estado de resistência à insulina, o TA liberta mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose

tumoral-alfa (TNF- α), a resistina, a leptina e a interleucina 6 (IL-6), com redução dos anti-inflamatórios (como a adiponectina), o que potencia o stresse oxidativo hepático (Loria *et al.*, 2013).

Muitas células do corpo, incluindo os adipócitos e as células hepáticas e musculares, possuem recetores específicos de insulina na membrana celular, responsável pela absorção e utilização de glicose por estas células. A glicose equilibra-se rapidamente entre o citosol do fígado e o líquido extracelular. O transporte para certas células, como o músculo em repouso, é fortemente regulado pela insulina, enquanto a absorção no sistema nervoso não é dependente da insulina. A insulina é metabolizada pela insulinase no fígado, rim e placenta. Cerca de 50 % da insulina secretada pelo pâncreas é removida pela extração da primeira passagem no fígado. A insulina ativa a síntese de glicogénio (glicogénese) no fígado e inibe a sua degradação (glicogenólise), estimula a síntese de proteínas, colesterol e TGs, bem como a formação de colesterol sob a forma de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Também inibe a gliconeogénese hepática, estimula a glicólise e inibe a cetogénese. O fígado é o principal órgão alvo da ação do glucagon, onde promove a glicogenólise, a gliconeogénese e a cetogénese (Masharani & German, 2011; McGilvery, 1979). Na DMT2, a produção excessiva de glicose hepática contribui para a hiperglicemia em jejum. A gliconeogénese aumentada é o mecanismo predominante responsável por este aumento da produção de glicose.

Estudos clínicos evidenciaram a importância do desequilíbrio do metabolismo hepático, incluindo o aumento inadequado da produção de glicose hepática, hiperlipidemia e acumulação de lípidos, tanto na obesidade como na DMT2 (Kotronen *et al.*, 2008). Da mesma forma, estudos pré-clínicos também referem um papel importante do fígado na patogénese da diabetes. Por exemplo, murganhos *knockout* para o recetor de insulina específico do fígado (LIRKO) desenvolvem resistência à insulina, intolerância à glicose, redução da capacidade da insulina em suprimir a produção hepática de glicose, para além de padrões alterados de expressão de genes no tecido hepático (Michael *et al.*, 2000), dislipidemia e suscetibilidade para desenvolver aterosclerose (Biddinger *et al.*, 2008).

Diversas vias ativadas estão identificadas como indutoras de lesão hepática em doentes diabéticos. A resistência à insulina, principal causa de hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória, é o fator predominante (Larter & Farrell, 2006; Elisabetta Bugianesi *et al.*, 2005; Leclercq *et al.*, 2007). Entre os vários tecidos sensíveis à insulina, o fígado é um dos mais suscetíveis aos efeitos do stresse oxidativo induzido pela hiperglicemia, que pode levar à lesão hepática (Elisabetta Bugianesi *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2010; Palsamy *et al.*, 2010).

Alterações no metabolismo de proteínas, hidratos de carbono e lípidos a nível hepático, associados com um aumento do stresse oxidativo, contribuem para ativação de cascatas inflamatórias (Leclercq *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2010; Palsamy *et al.*, 2010). Tanto o stresse oxidativo como as respostas inflamatórias atuam como agentes prejudiciais no agravamento da DMT2 (Guven *et al.*, 2006; Romagnoli *et al.*, 2010).

3.3. DFGNA e DMT2

A DFGNA é uma doença hepática crónica caracterizada pela deposição de gordura no fígado, na ausência de ingestão excessiva de álcool e outras causas conhecidas de acumulação de gordura, como hepatite viral e autoimune (Ali & Cusi, 2009; Utzschneider & Kahn, 2006; Vanni *et al.*, 2010; Levinthal & Tavill, 1999). A DFGNA é também um espectro de doenças que variam de esteatose simples (FGNA) a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e cirrose que, em última instância, pode levar ao hepatocarcinoma (Lewis & Mohanty, 2010). A DFGNA está fortemente associada à DMT2 e à obesidade, e em particular à resistência à insulina (no fígado e no tecido adiposo) (E. Bugianesi *et al.*, 2005; Marchesini *et al.*, 2001; Seppälä-Lindroos *et al.*, 2002).

A patogénese e progressão da DFGNA são explicadas com base numa hipótese de “múltiplos processos”, pois compreende várias etapas complexas (Jou *et al.*, 2008; Lewis & Mohanty, 2010). A resistência à insulina é responsável por iniciar a primeira fase de “agressão”, induzindo alterações no metabolismo lipídico, incluindo aumento da lipólise nos tecidos periféricos, aumento da captação hepática de AGL e síntese de TGs, resultando em esteatose hepática. A esteatose hepatocelular é a principal característica da DFGNA, caracterizada por esteatose em mais de 5 % dos hepatócitos (Figura 8) (Cohen *et al.*, 2011; Guiu *et al.*, 2007) e representa a alteração mais comum no fígado da população em geral (Bellentani *et al.*, 1994). Esta acumulação de gordura hepática é uma condição típica da DMT2, com uma frequência relatada de 40-70 %, independentemente do controle de glicose em circulação (Levinthal & Tavill, 1999). A esteatose hepatocelular é classificada em dois tipos: macrovesicular e microvesicular. Na esteatose macrovesicular, uma única gota de gordura grande ou gotículas de gordura menores e bem definidas ocupam o citoplasma dos hepatócitos, empurrando o núcleo para a periferia. Na esteatose microvesicular, o citoplasma dos hepatócitos é preenchido com minúsculas gotas lipídicas e o núcleo está localizado centralmente na célula. A esteatose na DFGNA geralmente é macrovesicular, no entanto, a

esteatose microvesicular também pode estar presente (em aproximadamente 10 % dos casos) (Tandra *et al.*, 2011).

Progredindo com a patologia, múltiplas “segundas agressões”, incluindo o stresse oxidativo, moléculas inflamatórias (como o TNF- α e adipocitocinas) e apoptose hepática atípica, resultam na inflamação crónica ou cirrose (Lewis & Mohanty, 2010; York *et al.*, 2009).

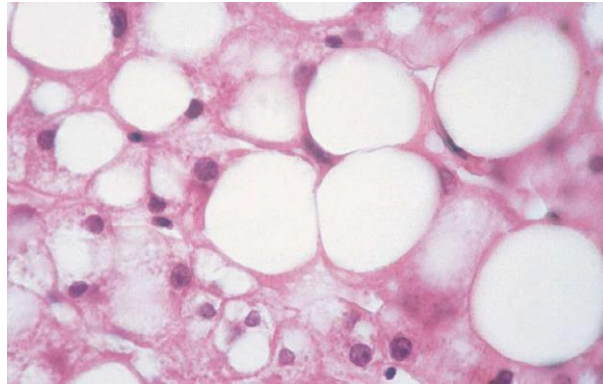


Figura 8 – Corte de fígado com esteatose macrovesicular de um doente diabético (Kuntz & Kuntz, 2008).

Na EHNA (Figura 9), uma variante do fígado gordo, a gordura nos hepatócitos é acompanhada por inflamação lobular e esteatonecrose. Além de causar esteato-hepatite e inflamação dentro do fígado, a EHNA também pode ter efeitos metabólicos profundos, induzindo resistência à insulina a nível hepático (Salgado *et al.*, 2010). Além disso, pensa-se que os defeitos na β -oxidação de ácidos gordos e a lipotoxicidade devido à sobreacumulação intracelular de ácidos gordos e seus metabolitos tóxicos desempenham papéis importantes na patogénese da DFGNA (Farrell *et al.*, 2013; Federico *et al.*, 2014). A progressão na DFGNA geralmente leva a resistência à insulina, aumento da produção de glicose hepática e agravamento do controlo glicémico em doentes diabéticos, representando um ciclo vicioso que agrava ainda mais as manifestações e complicações da diabetes.

A DFGNA deve ser considerada como causa de enzimas hepáticas elevadas cronicamente em doentes diabéticos assintomáticos, particularmente se estes forem obesos e tiverem hiperlipidemia (Sheth *et al.*, 1997).

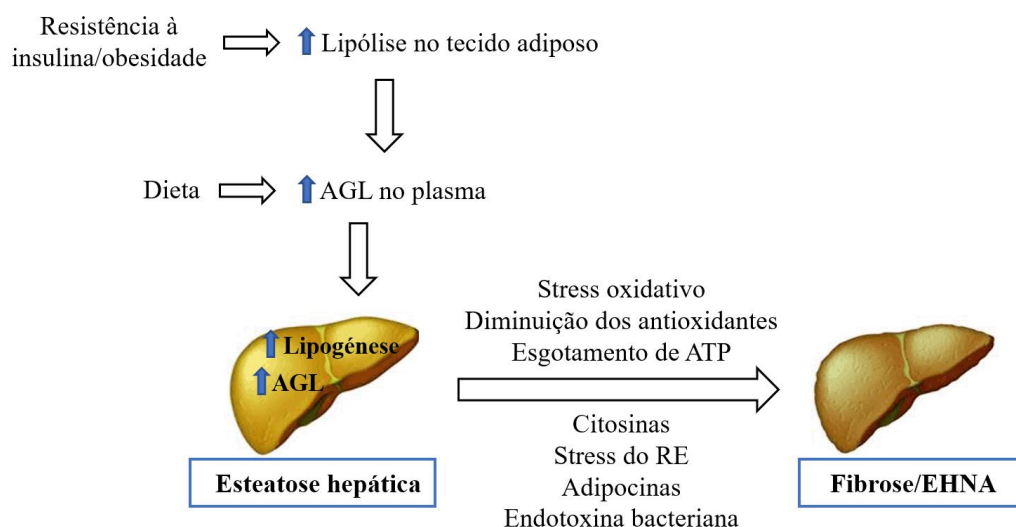


Figura 9 – A resistência à insulina leva ao aumento da captação e síntese de AGL no fígado, o que sensibiliza o fígado a uma série de acertos que induzem lesão hepática e progressão de esteatose simples para EHNA (Adaptado de: Nassir & Ibdah, 2014).

A DFGNA tem sido reportada como prevalente em DMT2 (80 %) e pessoas obesas no geral (60 %) (Haque & Sanyal, 2002). Esta patologia em estadios iniciais pode ser reversível, ainda que 25% dos pacientes possam progredir para o desenvolvimento de patologias mais complexas como a esteato-hepatite (gordura e inflamação com ou sem fibrose), cirrose (estadio mais grave de fibrose) ou carcinoma hepatocelular (Figura 10) (Angulo, 2002; Adams & Angulo, 2006; Zafrani, 2004; Ekstedt *et al.*, 2006; Lupsor & Badea, 2005).

Em Portugal, estima-se que cerca de 27 % da população tenha DFGNA, que atualmente é considerada a principal causa mundial de doenças hepáticas crónicas, intimamente relacionada com a crescente frequência de obesidade, resistência à insulina e DMT2 (Younossi *et al.*, 2011; Angulo, 2002; Fiuza *et al.*, 2008; Dowman *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 1996). A associação de obesidade e diabetes representa um risco adicional, pois neste caso a prevalência de fígado gordo não alcoólico (FGNA), EHNA e cirrose atinge quase 100%, 50 % e 19 %, respetivamente (Angulo, 2002).

A origem desta patologia pode ser muito variada, incluindo causas genéticas, cirúrgicas (da vesícula biliar ou do pâncreas), medicamentos (devido ao papel desintoxicante do fígado), patologias (como DMT2, hepatite C e síndrome metabólica) ou mesmo de uma dieta desequilibrada (rica em gorduras e/ou hidratos de carbono).

A patologia é caracterizada pelo fígado alargado, devido à acumulação de gorduras, com hepatócitos repletos de gotículas de lípidos, facilmente visíveis em observações histológicas, o que causa um decréscimo severo da funcionalidade do órgão. Estas alterações hepáticas adquirem grande importância, pois na sociedade atual, existem cada vez mais graves problemas de saúde pública associados ao aumento da prevalência de obesidade, DMT2 e síndrome metabólica (Tolman *et al.*, 2007).

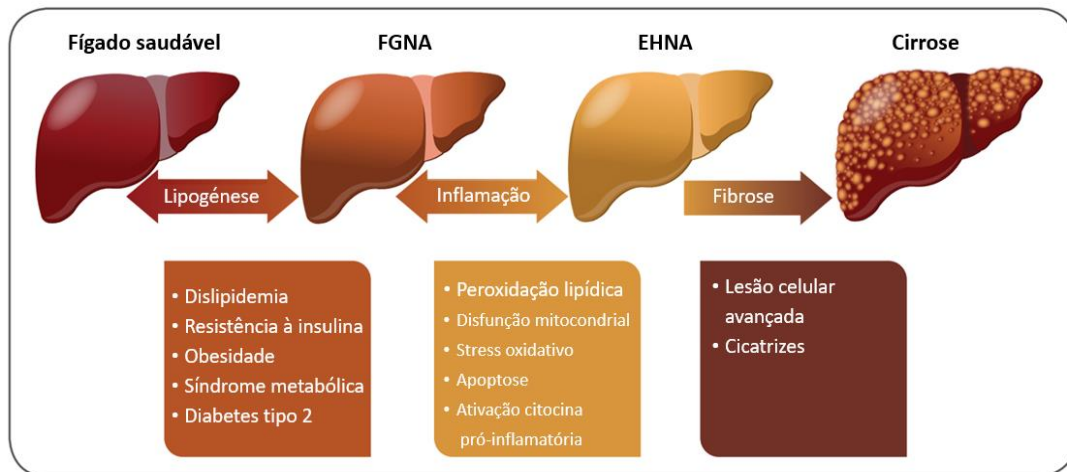


Figura 10 – Progressão da doença do fígado gorduro não alcoólica (DFGNA) para cirrose e fatores de risco e mecanismos patológicos característicos de cada estágio (Adaptado de: Cayman Chemical, 2017).

Ambas as condições de FGNA e EHNA são condições clinicamente silenciosas cuja detecção é muitas vezes feita de forma acidental através de alterações dos níveis de enzimas observados em análises de rotina (Younossi., 2008), o que faz com que milhões de pessoas sofram da doença sem terem conhecimento. Para identificar a patologia, numa fase inicial, podem ser feitos exames sanguíneos para avaliar a existência de valores elevados de enzimas hepáticas no plasma, como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina sérica (SAP), entre outras, que são indicadores de (dis)função hepática (Cigremis *et al.*, 2009).

Atualmente, e contrariamente a outros distúrbios hepáticos, não há terapia específica para a DFGNA. A tentativa da diminuição na ocorrência desta doença é limitada a abordagens que reduzem fatores de risco (obesidade, dislipidemia e resistência à insulina) como alterações do estilo de vida e/ou intervenções farmacológicas (metformina, antioxidantes, tiazolidinedionas, estatinas e fibratos) (Adams & Angulo, 2006; Orchard *et al.*, 2005; Torres & Harrison, 2008).

4. O papel da mitocôndria na DMT2 e na DFGNA

4.1. Estrutura e principais funções da mitocôndria

A mitocôndria (Figura 11) é um dos organitos celulares mais importantes, presentes em todas as células eucarióticas. Normalmente encontram-se em maior número em torno do retículo citoplasmático (Collins *et al.*, 2002).

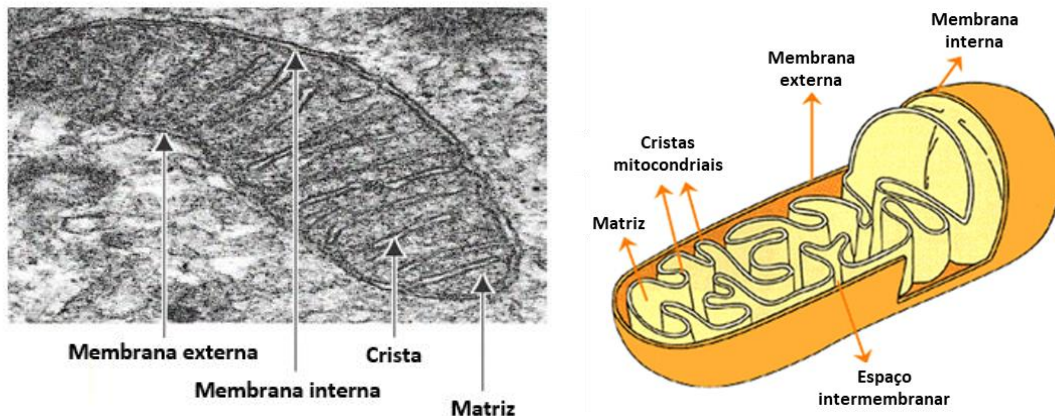


Figura 11 – Estrutura e micrografia eletrônica de uma mitocôndria de células hepáticas em alta ampliação (Adaptado de: Kierszenbaum, 2002).

As mitocôndrias apresentam uma membrana dupla: uma membrana externa que contém proteínas chamadas porinas que permitem a difusão de moléculas de menores dimensões; e uma membrana interna que se dobra em cristas sendo extremamente impermeável e que delimita a matriz mitocondrial. A estrutura da membrana interna é complexa e nela se encontram proteínas da cadeia transportadora de elétrões, de ATP sintase e sistemas de transporte. Na matriz localizam-se enzimas envolvidas na oxidação de piruvato e ácidos gordos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs). O DNA mitocondrial (mtDNA) encontra-se na matriz mitocondrial e consiste em 13 genes estruturais que codificam subunidades essenciais para os complexos I, III, IV da cadeia respiratória mitocondrial, envolvidos na fosforilação oxidativa e na formação de ATP (Calvo & Mootha, 2010; Pessayre, 2007).

A maioria das reações do metabolismo celular ocorrem na mitocôndria, tais como as do ciclo de Krebs, da β -oxidação dos ácidos gordos, da fosforilação oxidativa (Wartier *et al.*, 2006; Nouette-Gaulain *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009) e parte do ciclo da ureia e da gliconeogénese. Por essa razão, a mitocôndria tem um papel central nas células de mamíferos (Nouette-Gaulain *et al.*, 2007). Estas também exercem um papel importante no mecanismo

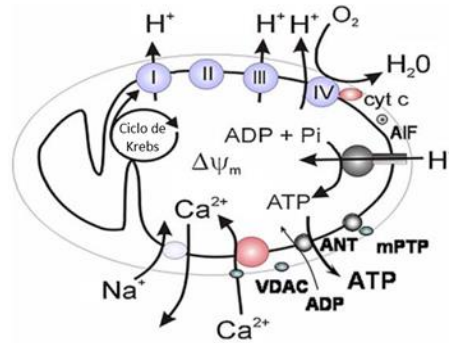
da apoptose, formação de radicais livres (Wartier *et al.*, 2006; Nouette-Gaulain *et al.*, 2007) e regulação da concentração intracelular de Ca^{2+} (Fernandes *et al.*, 2006). A mitocôndria está também envolvida na produção de estrogénio e testosterona, síntese de hemoglobina e tem um papel importante no metabolismo do colesterol (Dykens & Will, 2007).

A principal função mitocondrial é gerar 95 % do requerimento de energia celular na forma de ATP via fosforilação oxidativa (Mitchell, 1966). A fosforilação oxidativa é uma unidade funcional chave na mitocôndria e combina o fluxo de eletrões com a respiração celular e a síntese de ATP, sendo formada pela cadeia transportadora de eletrões e a ATP sintase. A cadeia transportadora de eletrões compreende a nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzida (NADH)-desidrogenase (complexo I), a succinato desidrogenase (complexo II), a ubiquinona, complexo bc_1 (complexo III), o citocromo c (Cyt c) e a citocromo c oxidase (CcO; complexo IV). Este processo está relacionado com uma série de reações bioquímicas no ciclo de Krebs envolvendo a geração de NADH e flavina adenina dinucleótido reduzida (FADH_2) (Nouette-Gaulain *et al.*, 2007). NADH e FADH_2 são posteriormente oxidados e os seus eletrões são transferidos para os complexos do sistema de transporte de eletrões, até à redução de oxigénio com formação de água (Duchen, 2004).

A atividade mitocondrial é regulada fisiologicamente pela interação entre complexos heteropoliméricos (Figura 12 – A): complexo I, complexo II, complexo III e complexo IV, localizados na membrana interna da mitocôndria (Dykens & Will, 2007; Nouette-Gaulain *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2000). Como resultado da transferência de eletrões através dos quatro complexos do sistema de transporte de eletrões, três desses complexos (Complexos I, III e IV) bombeiam ou transferem prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar para gerar um gradiente de prótons transmembranar e potencial elétrico (Figura 12 – A) (Duchen, 2004).

No ciclo de Krebs (Figura 12 – B) a NADH e o FADH_2 são oxidadas a NAD^+ e FADH pelo Complexo I e II, respetivamente. Os eletrões removidos são transferidos para uma Coenzima Q (CoQ) e subsequentemente para o Complexo III, Citocromo C e Complexo IV, onde é transferido para uma molécula de oxigénio para formar água. Simultaneamente, os complexos I, III e IV transferem os prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar mitocondrial, criando um gradiente de prótons. O complexo II não transfere os prótons em si, mas contribui para o gradiente de prótons através dos Complexos III e IV. O gradiente de prótons é utilizado pela F_1F_0 -ATPase para fosforilar ADP (difosfato de adenosina) a ATP (Grattagliano *et al.*, 2012).

A



B

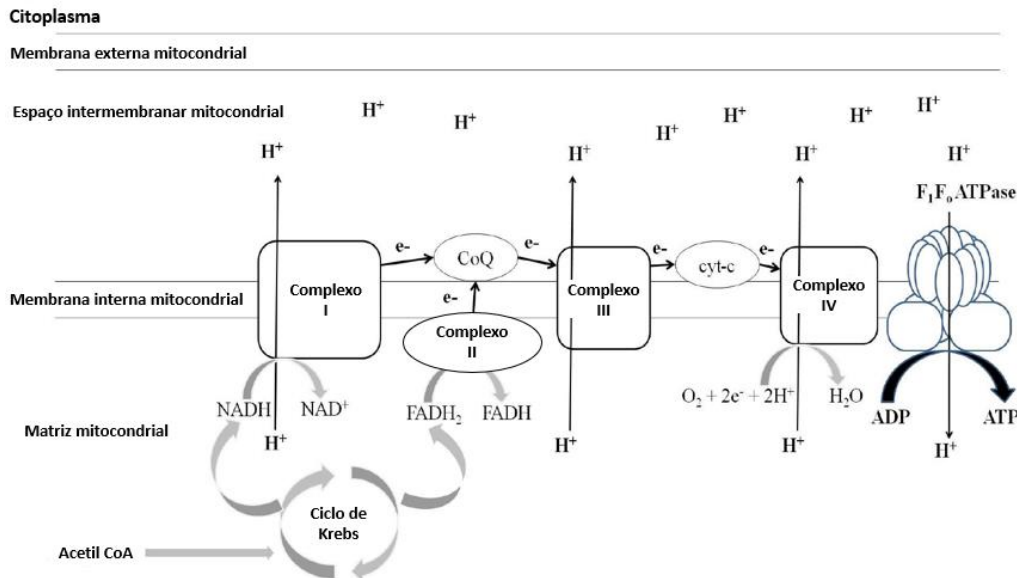


Figura 12 – Cadeia respiratória mitocondrial. (A) Desenho que representa os componentes funcionais da mitocôndria; (B) Esquema mais detalhado da cadeia respiratória. ADP, adenosina difosfato; ATP, trifosfato de adenosina; CoQ, coenzima Q; e⁻, Eletrão; H⁺, Protão; H₂O, molécula de água; FADH, dinucleótido de flavina-adenina, FADH₂, dinucleótido de flavina-adenina reduzido; NAD⁺, dinucleótido de nicotinamida-adenina; NADH, dinucleótido de nicotinamida-adenina reduzido; CAT, ciclo dos ácido tricarboxílico (Adaptado de: Duchon, 2004).

Dado que a membrana interna é impermeável a prótons, estes só podem fluir de volta para a matriz através da F₁/F₀ ATP-sintase, que então acopla a síntese de ATP ao sistema de transporte de elétrons. Concomitantemente, a maioria dos elétrons são transferido para o complexo IV (CIV ou Citocromo C oxidase, CCO), onde a combinação de oxigênio, elétrons e hidrogênio leva à formação água, como esquematizado na Figura 12 – B. O ATP resultante é então transportado para fora da mitocôndria pela translocase nucleotídica da adenina (ANT). Todos esses processos são dependentes da integridade da membrana interna mitocondrial, servindo como uma barreira ao fluxo de prótons e como uma estrutura para a regulação da transferência de elétrons e da atividade enzimática (Grattagliano *et al.*, 2012).

A ação dos complexos da cadeia transportadora de elétrons é regulada pelo gradiente de prótons, também conhecido como potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). A diminuição do $\Delta\Psi_m$ resulta no aumento da velocidade do fluxo de elétrons na cadeia

transportadora de eletrões por forma a restabelecer o $\Delta\Psi_m$, enquanto que o aumento do $\Delta\Psi_m$ diminui o fluxo de eletrões na cadeia transportadora de eletrões. Agentes de desacoplamento, como, o carbonilcianeto-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP), aumentam a taxa da respiratória uma vez que promovem o fluxo de protões através da membrana interna e assim dissipam o $\Delta\Psi_m$. Em oposição, a inibição do fluxo de protões através de ATP-sintase com oligomicina aumenta $\Delta\Psi_m$ e diminui a taxa respiratória. Assim, a respiração mitocondrial e a síntese de ATP estão ligadas através do $\Delta\Psi_m$. Isto é crítico, pois a perda de $\Delta\Psi_m$ pode ser causada por uma variedade de fatores, como a inibição da respiração, falta de substratos ou mecanismos de desacoplamento, podendo desempenhar um papel nas patologias mitocondriais (Duchen, 2004).

Além do seu principal papel na síntese de ATP, a mitocôndria está ainda envolvida na regulação do metabolismo lipídico celular, na formação de ROS, na homeostase do cálcio e na regulação da morte celular (Duchen, 2004; Grattagliano *et al.*, 2012).

O fígado, o cérebro, o músculo cardíaco e o esquelético são os órgãos com atividade metabólica mais elevada, contendo por isso um maior número de mitocôndrias por célula (Szewczyk & Wojtczak, 2002). O interesse científico relativamente à mitocôndria aumentou consideravelmente devido ao facto das mitocôndrias terem um papel central nos mecanismos da morte celular, estarem envolvidas em doenças cardiovasculares, diabetes, cancro e em doenças neurodegenerativas, como Parkinson ou Alzheimer (Pereira *et al.*, 2009; Boelsterli & Lim, 2007; Szewczyk & Wojtczak, 2002).

4.1.1. Dinâmica mitocondrial – autofagia, fusão e fissão

A manutenção de uma população mitocondrial saudável é essencial para a sobrevivência celular. As células utilizam o mecanismo de autofagia para remover organelos defeituosos e reciclar os componentes essenciais através da sua encapsulação numa estrutura de membrana dupla conhecida como autofagossoma. No caso das mitocôndrias, esse mecanismo é conhecido como mitofagia (Mizushima & Komatsu, 2011), processo que permite a eliminação de mitocôndrias disfuncionais de forma seletiva. A importância de uma regulação adequada deste processo está relacionada com o facto de que quando uma mitocôndria danificada se funde com uma saudável, o resultado não é um organelo saudável maior mas sim uma mitocôndria danificada maior, que poderia expandir a lesão libertando grandes quantidades de ROS (Dorn & Kitsis, 2015). Desta forma, à semelhança da biogénese mitocondrial, a autofagia tem sido sugerida como um fator de longevidade. Desequilíbrios

nesse processo, nos quais a mitofagia é insuficiente ou extremamente induzida, condicionam a rede mitocondrial e impõem um limite de vida útil. Por exemplo, durante o envelhecimento o conteúdo mitocondrial mostrou-se aumentado (Malpass, 2013; Palikaras *et al.*, 2015).

A biogénese mitocondrial responde a vários estímulos como por exemplo a depleção de ATP que ativa a AMPK (*AMP-activated protein kinase*; AMP (*adenosine monophosphate*)), um regulador-chave deste processo. Esta enzima não só ativa a Sirtuína 1 (Sirt1), uma desacetilase associada à longevidade, mas também fosforila PGC1 α (um alvo de Sirt1, também), aumentando assim a função mitocondrial, em resultado do aumento do conteúdo mitocondrial e fosforilação oxidativa, como acontece por exemplo com a prática de exercício físico. Flutuações de cálcio e a produção de óxido nítrico (NO) têm sido associadas à biogénese mitocondrial (Nisoli, 2003; Wu *et al.*, 2000). Em modelos animais com deficiências ao nível da COX, a sobreexpressão de PGC1 α atenua a progressão de doença mitocondrial (Viscomi *et al.*, 2011; Wenz *et al.*, 2008), demonstrando assim a importância da biogénese mitocondrial para a homeostase mitocondrial global e extensão de vida útil.

Processos como fusão, fissão e biogénese mitocondrial também são necessários (Scott *et al.*, 2014; Youle & Van Der Blik, 2012), particularmente para as células com necessidades energéticas elevadas (Tong & Sadoshima, 2016), como as células musculares esqueléticas. A desregulação na homeostase mitocondrial tem sido cada vez mais correlacionada com distúrbios metabólicos humanos, incluindo diabetes e envelhecimento (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009; Preston *et al.*, 2008; Wredenberg *et al.*, 2002). Uma vez que a mitofagia é precedida pela divisão mitocondrial, a fissão mitocondrial desempenha um papel central pois gera fragmentos mitocondriais individuais de tamanhos reguláveis para o encapsulamento (Youle & Narendra, 2011).

A mitocôndria sofre alterações morfológicas para se adaptar às necessidades energéticas celulares, alterações essas que podem ocorrer através dos ciclos contínuos de fusão e fissão mitocondrial e que permitem uma distribuição adequada das mitocôndrias nas células. As mitocôndrias existem como uma rede intracelular, e fundem-se e dividem-se constantemente através dos processos de fusão e fissão, respetivamente. Assim, a fissão mitocondrial resulta em pequenas mitocôndrias individuais, enquanto que as grandes redes interconectadas de mitocôndrias são obtidas através de fusão (Westermann, 2010; Youle and Van Der Blik, 2012).

Os processos de fusão e fissão são essenciais para a manutenção de importantes funções celulares, como atividade respiratória mitocondrial, distribuição de mtDNA, apoptose, sobrevivência celular ou sinalização de cálcio. A produção de ATP é modulada por redes mitocondriais geradas por fusão e esta via é controlada pela transmissão do potencial de membrana de áreas de elevada disponibilidade de O₂ para aquelas com baixa disponibilidade, permitindo assim a dissipação de energia (Westermann, 2010). Considerando que este estado pró-fusão é típico em situações de maior eficiência energética devido a situações de jejum ou stresse agudo, o oposto ocorre quando as células são submetidas a uma grande oferta de nutrientes, como na obesidade ou DMT2. A exposição a um excesso nutricional promove a fissão e diminui a fusão mitocondrial, que está associada à respiração desacoplada (Liesa & Shirihai, 2013). Além disso, a fissão mitocondrial é crucial para a remoção de mitocôndrias danificadas pela mitofagia (Wai & Langer, 2016). Portanto, a regulação da dinâmica mitocondrial é um processo complexo envolvendo diferentes GTPases (enzimas que catalisam a hidrólise do trifosfato de guanosina) relacionadas com a dinâmica e que mantêm um equilíbrio entre a fusão e a fissão mitocondrial. Qualquer alteração desse equilíbrio pode envolver stresse oxidativo, disfunção mitocondrial e alterações metabólicas, eventualmente promovendo o desenvolvimento de doenças relacionadas com a mitocôndria, como a resistência à insulina e DMT2 (Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

A fusão requer a junção das membranas mitocondriais internas e externas de duas mitocôndrias e é controlada principalmente por GTPases. Em mamíferos, as mitofusinas (MFN1 e MFN2) medeiam a fusão da membrana externa de duas mitocôndrias, seguida da união (fusão) das suas membranas internas mediada por OPA1 (atrofia ótica 1) (Figura 13). Em contraste, DNM1L (proteína tipo dinamina-1; DRP1) e FIS1 (proteína de fissão; fissão 1) são componentes-chave do processo de fissão, que, em cooperação, conduzem à divisão do túbulo mitocondrial. As moléculas de DRP1 agrupam-se numa estrutura semelhante a um anel para construir membranas mitocondriais, processo dependente de GTP, enquanto a FIS1 é ancorado à membrana mitocondrial externa e parece participar do recrutamento de DRP1 através de seu domínio citosólico (Yoon *et al.*, 2011).

Esses dois processos opostos são finamente balanceados, mantendo assim as condições fisiológicas do estado estacionário, e têm papéis importantes na função e desenvolvimento mitocondrial, bem como na morte celular programada (Chan, 2006).

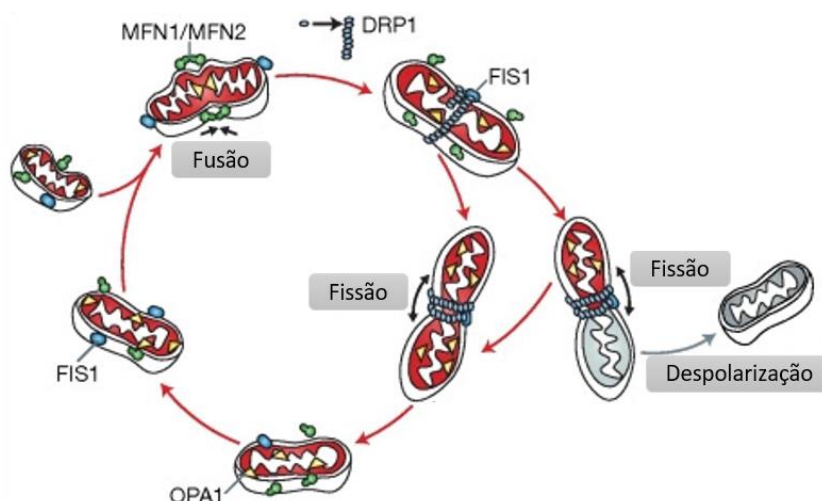


Figura 13 – Determinantes moleculares de redes de controle de qualidade mitocondrial. Abreviaturas: OPA1, atrofia óptica; FIS1, fissão 1; MFN1/MFN2, mitofusina 1/ mitofusina2; DRP1, proteína 1relacionada com a dinamina 1 (Adaptado de: Twig, Hyde, *et al.*, 2008).

Vários estudos sugerem que o silenciamento de proteínas de fusão altera a homeostase da glicose e promove resistência à insulina e obesidade em murganhos (Quirós *et al.*, 2012; Sebastian *et al.*, 2012). Estudos recentes mostram que o silenciamento de DRP1 ou Mfn1 no fígado protege os murganhos contra a obesidade, induzida por dieta gorda, e a resistência à insulina (Kulkarni *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2015). Essas evidências destacam o importante papel da dinâmica mitocondrial na regulação do metabolismo da glicose e da sinalização da insulina e, por sua vez, no desenvolvimento da obesidade e da DMT2.

4.1.2. O poro de permeabilidade transitória mitocondrial

O poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTM) é um poro não específico que atravessa as membranas mitocondriais interna e externa, facilitando o transporte de pequenos solutos (até 1,5 KDa) entre o citosol e a mitocôndria (Duchen, 2004).

O papel fisiológico do PPTM ainda não foi completamente esclarecido mas há evidências de que da interação entre várias proteínas resulta um complexo macromolecular que inclui o ANT, a proteína transportadora de fosfato (PiC) e a isomerase de proyl ciclofilina-D (Halestrap & Pasdois, 2009). Estudos genéticos mostraram claramente um papel para a ciclofilina D na regulação do PPTM e a ciclosporina A, um conhecido inibidor da ciclofilina, previne a abertura do PPTM (Basso *et al.*, 2005).

A permeabilidade transitória mitocondrial (PTM) é um fenômeno caracterizado pela perda súbita do $\Delta\Psi_m$. As consequências desse fenômeno são: cessação da fosforilação oxidativa e depleção de ATP, influxo de solutos na matriz, entumescimento e rutura

mitocondrial, libertação de cálcio e de fatores apoptóticos. Em última análise, uma abertura prolongada do PPTM leva à morte celular por apoptose ou necrose (Camara *et al.*, 2010).

Lípidos, ROS, cálcio, substratos respiratórios e glutatona oxidada (GSSG) podem induzir um stresse mitocondrial que se manifesta por aberturas do PPTM de baixa condutância. Este estado de baixa condutância é influenciado pelo pH da matriz. Além de aberturas de PPTM de baixa condutividade, várias condições fisiopatológicas (por exemplo, insuficiência cardíaca, isquemia/reperfusão, envelhecimento) ou sinalização intracelular alterada (por exemplo, sobrecarga de cálcio, aumento de ROS) induzem aberturas duradouras do PPTM, levando a vários modos de morte celular ou reciclagem de mitocôndrias através de mitofagia, eventos de fusão/fissão e biogénese que contribuem a biologia celular normal (Figura 14) (Brenner & Moulin, 2012).

Vários fatores aumentam a probabilidade de abertura do PPTM, incluindo elevados níveis de Ca^{2+} mitocondrial, acumulação de ROS, depleção de nucleótidos de adenina e elevado conteúdo mitocondrial em fosfato. A lesão oxidativa e a desregulação do cálcio são características comuns a muitas doenças relacionadas com o envelhecimento e, portanto, a abertura do PPTM em resposta a esses fenómenos tem sido sugerida como envolvida na patogénese de várias doenças (Figura 14) (Rao *et al.*, 2014).

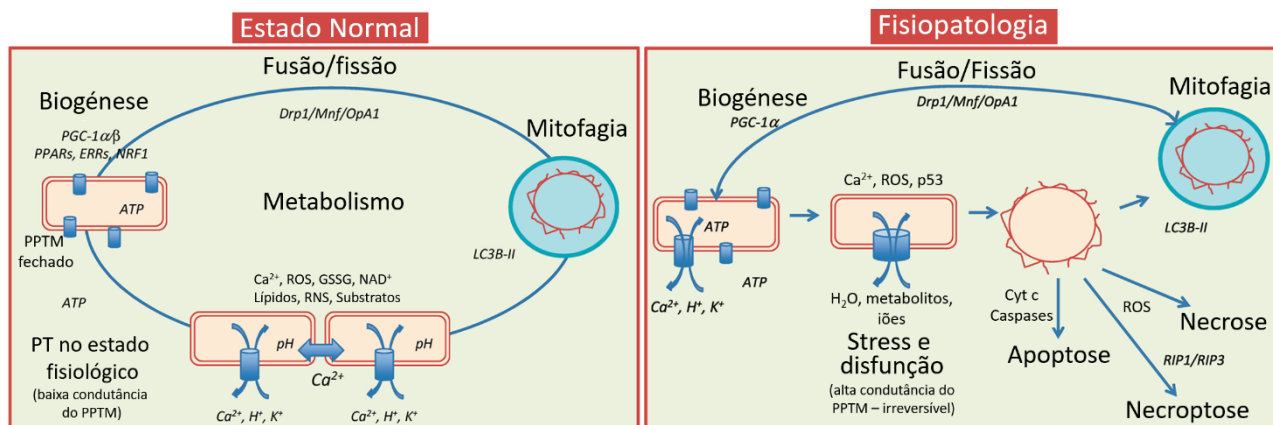


Figura 14 – Esquema simplificado do ciclo de funções mitocondriais na fisiologia, numa condição normal, e na fisiopatologia. Abreviaturas: Cyt c, citocromo c; DRP1, proteína tipo dinamina-1; ERRs, receptores relacionados ao estrogénio; GSSG, glutatona dissulfeto; NAD^+ , dinucleótido de nicotinamida adenina; NRF, fator respiratório nuclear; OPA1, atrofia óptica tipo 1; p53, proteína citoplasmática; PGC-1 α , coativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma 1-alfa; PPAR, receptor activado por proliferador de peroxissoma; PPTM, poro de permeabilidade transitória mitocondrial; PT, permeabilidade transitória; RIP, proteína serina/treonina interagindo com o receptor; RNS, espécies reativas ao nitrogénio (Adaptado de: Brenner & Moulin, 2012).

4.1.3. Homeostase do cálcio

Os íons cálcio (Ca^{2+}) estão envolvidos em vias de sinalização celular (Rizzuto *et al.*, 2004) e medeiam eventos, de curto prazo, que desencadeiam mudanças em várias funções celulares (Berridge *et al.*, 2000). Entre essas vias de sinalização, o Ca^{2+} tem um papel importante na regulação do metabolismo mitocondrial (Duchen, 2004). O influxo de cálcio para a matriz mitocondrial é mediado por um sistema do tipo uniporte e é promovido pelo gradiente eletroquímico, sem associação à hidrólise de ATP ou cotransporte com outros íons ou moléculas (Gunter & Gunter, 2002). Deste modo, a despolarização da mitocôndria resulta no efluxo do cálcio mitocondrial (Kröner, 1986), que ocorre de duas vias distintas: dependente (Gunter e Pfeifer, 1990) e independente de sódio (Puskin *et al.*, 1976). A saída de cálcio da mitocôndria através do antiporte dependente de sódio é abundante em tecidos como o coração. O mecanismo independente de sódio encontra-se no fígado e consiste na saída de cálcio por troca com dois prótons (Gunter *et al.*, 1994).

Esses mecanismos permitem que a mitocôndria armazene Ca^{2+} de forma dinâmica. Paralelamente, a interação com o retículo endoplasmático contribui para a regulação dos níveis de Ca^{2+} (Rizzuto *et al.*, 2004). No entanto, a capacidade mitocondrial para acumular Ca^{2+} é finita e pode estar significativamente alterada em diversas condições patológicas (Chinopoulos & Adam-Vizi, 2010).

Além da regulação da respiração mitocondrial, o Ca^{2+} é também um fator chave na ativação da morte celular programada, a apoptose (Rizzuto *et al.*, 2003). Alterações na homeostase mitocondrial de Ca^{2+} podem levar à abertura do PPTM, que é por exemplo parte fundamental na indução de morte celular no contexto da reperfusão (Duchen, 2004). Para além do excesso de Ca^{2+} intracelular poder levar à ativação de vias pró-apoptóticas, também tem sido sugerido como um elemento comum de diferentes tipos de morte celular. Foi demonstrado que níveis excessivamente elevados de Ca^{2+} intracelular podem promover necrose, enquanto níveis mais baixos de Ca^{2+} intracelular promovem apoptose (Arnaud & Sanchez, 1990).

4.2. Disfunção mitocondrial na DMT2 e na DFGNA

A dinâmica mitocondrial é crucial na DMT2 e nas suas complicações vasculares, dado o seu papel central na produção de ATP e formação de ROS, mas também na regulação da secreção de insulina (Kytövuori *et al.*, 2016). A elevação crónica dos níveis de glicose estimula a produção de ROS e induz stresse oxidativo, com consequente lesão nos tecidos (Szendroedi *et al.*, 2012) e desenvolvimento de diversas patologias, incluindo complicações diabéticas microvasculares (nefropatia, retinopatia e neuropatia) e macrovasculares (acidente vascular cerebral, isquemia miocárdica) (Michael Brownlee, 2001).

As células β sintetizam a insulina e a sua secreção é modulada principalmente por níveis de glicose. Um nível elevado de glicose induz a fosforilação oxidativa em células β , aumentando a relação ATP/ADP e inibindo os canais K^+ que podem despolarizar a membrana plasmática e levar a níveis elevados de Ca^{2+} dentro das células. Este efeito desencadeia a secreção de insulina na corrente sanguínea para manter os níveis adequados de glicose (Hoeks *et al.*, 2006; Maechler & Wollheim, 2001). Portanto, a secreção de insulina é modulada pelo estado bioenergético das mitocôndrias. A resistência à insulina é uma característica comum da DMT2 e a disfunção mitocondrial foi associada a ela (Diaz-Morales *et al.*, 2016; Hernandez-Mijares *et al.*, 2011; Maechler & Wollheim, 2001; Rovira-Llopis *et al.*, 2015). A inibição da função mitocondrial e um aumento da peroxidação lipídica foram descritos no músculo esquelético de doentes resistentes à insulina (Kelley *et al.*, 2002).

Há evidências de que o exercício, o uso de antioxidantes direcionados à mitocôndria e a restrição calórica melhoram a sensibilidade à insulina e a função mitocondrial na DMT2 (Apostolova & Victor, 2015; Escribano-Lopez *et al.*, 2016; Redman *et al.*, 2007; Rimbart *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2007) (Figura 15). Em contraste, as mutações de mtDNA, níveis de cálcio aumentados, baixo controlo glicémico ou peroxidação lipídica aumentam o stresse oxidativo e podem estar relacionados com o desenvolvimento de DMT2 (Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

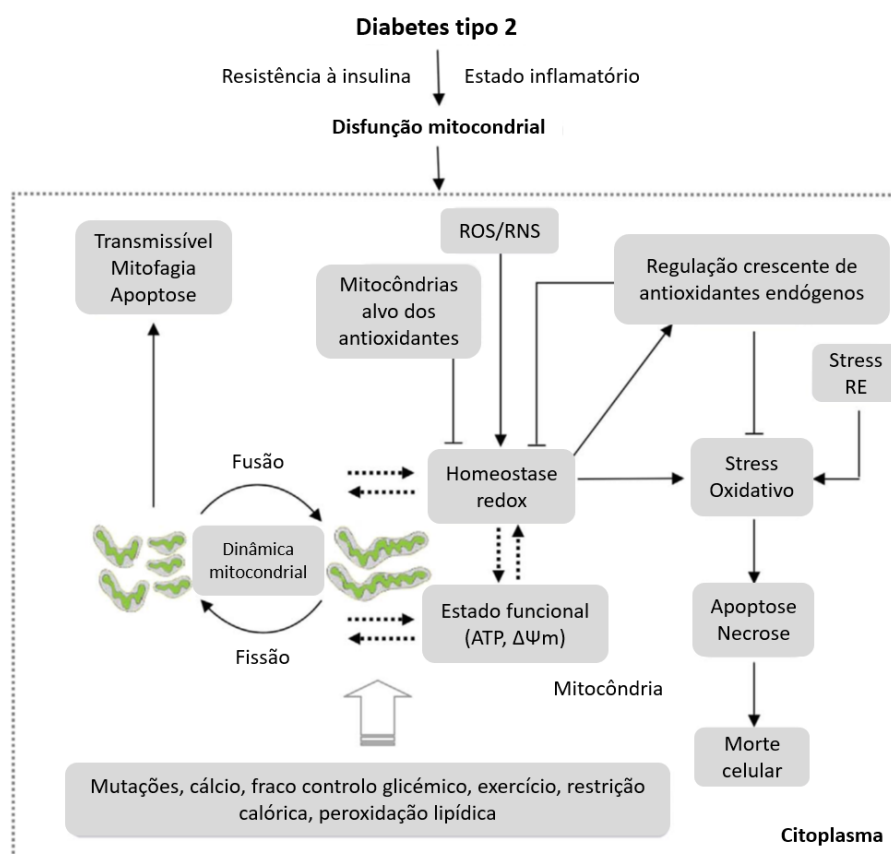


Figura 15 – Interação entre a dinâmica mitocondrial, o estresse oxidativo e a função mitocondrial na diabetes tipo 2 (Adaptado de: Rovira-Llopis *et al.*, 2017).

Uma série de alterações moleculares e fisiológicas ocorrem no contexto de resistência à insulina, resultando na acumulação de TGs no fígado (Figura 16). A explicação convencional para esta acumulação hepática é que a obesidade e a resistência à insulina resultam num aumento da libertação de AGL dos adipócitos. O aumento da massa de adipócitos e o aumento da hidrólise de TGs através do aumento da atividade da hormona sensível à lipase (HSL) contribuem para níveis plasmáticos elevados de AGL (Lewis *et al.*, 2002). A taxa de captação hepática de AGL não é regulada e, portanto, é diretamente proporcional às concentrações plasmáticas de AGL (Wahren *et al.*, 1984). Os AGL absorvidos pelo fígado são metabolizados por uma de duas vias: pela oxidação para formar ATP ou pela esterificação para produzir TGs, que são incorporados em partículas de VLDL para exportação ou armazenados dentro do hepatócito. Um comprometimento de uma ou ambas destas vias pode levar à esteatose hepática.

Uma função metabólica central do fígado é manter os níveis de glicose no plasma, independentemente do estado nutricional. No cenário de excesso de energia, a glicose é convertida em ácidos gordos através da conversão da glicose em piruvato, que entra no ciclo

de Krebs na mitocôndria (Figura 16). O citrato formado no ciclo de Krebs é transportado para o citosol, onde é convertido em acetil-CoA pela ATP citrato liase. A acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1) converte então acetil-CoA a malonil-CoA, que é usado pela sintase de ácidos gordos para formar ácido palmítico (ou palmitato) (C16: 0). O ácido palmítico é então dessaturado pela esteroil-CoA dessaturase (SCD) em ácido palmitoleico, ou ainda alongado pela acil-elongase de cadeia longa para formar ácido esteárico (C18: 0), que também pode ser dessaturado para formar ácido oleico (C18: 1) (Horton *et al.*, 2002). Esses ácidos gordos são usados para sintetizar TGs - a principal fonte de armazenamento e transporte de energia. Estudos realizados em humanos (Araya *et al.*, 2004) e murganhos (Shimomura *et al.*, 1998) com esteatose hepática revelam que há acumulação de ácido oleico, o produto final da lipogênese de *ново*. Isso sugere que as taxas sintéticas de ácidos gordos aumentam no fígado resistente à insulina.

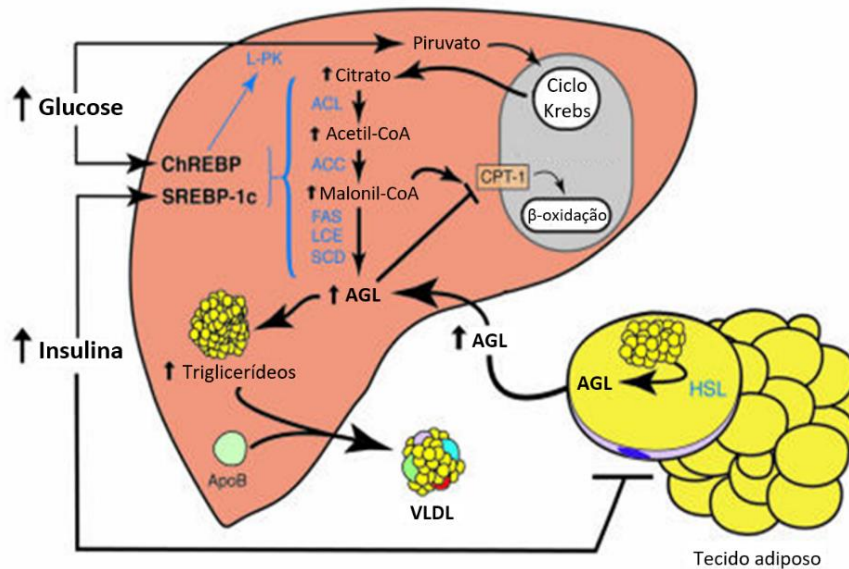


Figura 16 – Alterações metabólicas que resultam na acumulação de triglicerídeos hepáticos no estado de resistência à insulina (Adaptado de: Browning *et al.*, 2004).

No fígado, a hiperinsulinemia induz a expressão de SREBP-1c (*sterol regulatory element-binding proteins*), levando à ativação transcricional de todos os genes lipogénicos. Simultaneamente, a hiperglicemia ativa o ChREBP (*carbohydrate response element binding protein*), que ativa transcionalmente a LPK (pyruvate kinase) e todos os genes lipogénicos. As ações sinérgicas do SREBP-1c e do ChREBP ativam de maneira coordenada a dinâmica enzimática necessária para a conversão do excesso de glicose em ácidos gordos. Uma consequência do aumento da síntese de ácidos gordos é o aumento da produção de malonil-CoA, que inibe a carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), a proteína responsável

pelo transporte de ácidos gordos para a mitocôndria. Assim, no cenário da resistência à insulina, os AGL que entram no fígado a partir da periferia, bem como os derivados da lipogênese de *novo*, serão preferencialmente esterificados em TGs (Browning & Horton, 2004).

Estudos demonstram que o aumento das taxas de síntese de ácidos gordos hepáticos contribui para o desenvolvimento de DFGNA em modelos da diabetes e obesidade resistentes à insulina (Martin, 1974; Memon *et al.*, 1994).

A microscopia eletrônica demonstra que a área mitocondrial é 44 % menor no fígado do que no coração (Veltri *et al.*, 1990), com menor tamanho, menor número de cristas e menor densidade de matriz. A expressão proteica de múltiplos componentes da fosforilação oxidativa e TFAM (fator de transcrição mitocondrial A) (expressa por miligrama de proteína) e a atividade da citrato sintase também são menores no fígado (por exemplo, 7 % do músculo cardíaco) (Benard *et al.*, 2006). Da mesma forma, os padrões de expressão gênica são distintos no fígado (Mootha *et al.*, 2003). Funcionalmente, as mitocôndrias hepáticas isoladas têm reduções relativas nas proteínas da fosforilação oxidativa, nos citocromos da cadeia respiratória e na atividade máxima dos complexos III e IV. Apesar da menor capacidade da fosforilação oxidativa, a respiração do estado 3 e a taxa de controle respiratório são equivalentes no fígado e no músculo. O conteúdo de mtDNA, expresso por grama de tecido ou por mitocôndria, é maior no fígado noutros tecidos (Benard *et al.*, 2006). Juntos, esses dados enfatizam novamente as diferenças nos protocolos que avaliam a abundância, capacidade e função mitocondrial e destacam a diversidade tecidual da estrutura e da função mitocondrial, o que pode contribuir para a suscetibilidade a doenças específicas do tecido, incluindo a diabetes.

Depleção mitocondrial e/ou perda da eficiência oxidativa podem potencialmente afetar múltiplas funções celulares dentro dos hepatócitos, tanto diretamente (por exemplo, redução na formação de ATP, stresse oxidativo, capacidade reduzida de oxidação de ácidos gordos) como indiretamente, por efeitos em processos dependentes de energia, incluindo gliconeogênese, síntese de ureia, ácidos biliares, colesterol e proteínas. Como a acumulação de lípidos nos hepatócitos é um marcador chave da resistência à insulina em humanos (Kotronen *et al.*, 2008) e um dos principais contribuintes para a DFGNA e cirrose, consideramos primeiramente as relações entre o metabolismo lipídico hepático e a resistência à insulina.

A patogênese da DFGNA ainda não está totalmente elucidada, mas é provável que a falta de capacidade de oxidação, do excesso de ácidos gordos que são transportados até ao

fígado, desempenhe um papel fundamental na progressão da DFGNA acompanhada por resistência a insulina (Pessayre & Fromenty, 2005). Estudos com um modelo de ratos de obesidade e diabetes tipo 2, o rato obeso e hiperfágico OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima Gordo*) (Kawano *et al.*, 1992), mostraram que a redução do conteúdo e da função mitocondrial hepática precede o desenvolvimento de NAFLD e resistência à insulina, sugerindo que a disfunção mitocondrial contribui para o desenvolvimento da DFGNA associada à obesidade (Rector *et al.*, 2010).

Há evidências consistentes de um papel central da disfunção mitocondrial na fisiopatologia da DFGNA (Begrache *et al.*, 2006; Sanyal *et al.*, 2001; Pérez-Carreras *et al.*, 2003). São reportados défices na síntese hepática de ATP, reduções na atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e aumento da produção de ROS (Cortez-Pinto *et al.*, 1999; Hensley *et al.*, 2000). A rutura mitocondrial tende a provocar e agravar doenças hepáticas, como resistência à insulina, carcinoma hepatocelular, doença hepática alcoólica (DHA) e DFGNA (Galloway & Yoon, 2013). Essas alterações bioquímicas estão associadas a anormalidades ultra estruturais indicadoras do comprometimento da fosforilação oxidativa. As mitocôndrias do fígado aparecem em número reduzido, entumescidas e arredondadas com perda de cristas e presença de inclusões paracristalinas (Pérez-Carreras *et al.*, 2003; Teodoro *et al.*, 2006; Teodoro *et al.*, 2008). Estas inclusões paracristalinas foram observadas em muitas miopatias mitocondriais (Lammens & Laak, 2004). O comprometimento da função mitocondrial ocorre em várias etapas da patogênese da DFGNA, pois afeta o metabolismo da gordura, mas também aumenta o stresse oxidativo e a produção de citocinas, desencadeando a morte celular, a inflamação e a fibrose (Cortez-Pinto *et al.*, 1999; Pérez-Carreras *et al.*, 2003).

O desacoplamento da oxidação e da fosforilação e aumento da produção de radicais livres e da peroxidação lipídica causa lesão celular (Lammens & Laak, 2004). A produção de ROS causa a peroxidação lipídica das membranas mitocondriais, o que pode contribuir para o compromisso da função mitocondrial e perpetuar a formação de ROS. O stresse oxidativo também desencadeia a produção de citocinas inflamatórias, causando inflamação e resposta fibrogénica. Isso acaba por resultar no desenvolvimento de DFGNA (Rolo *et al.*, 2012), que é caracterizada por um estado inflamatório devido à superprodução de ROS e espécies reativas de nitrogénio (RNS), lipotoxicidade e aumento de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogénicas. O stresse oxidativo e a peroxidação lipídica ativam o NF- κ B para induzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Carter-Kent *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2017).

O metabolismo mitocondrial engloba a via oxidativa dominante para a disposição de ácidos gordos sob condições fisiológicas normais. Dietas hiperlipídicas e a desregulação do metabolismo lipídico causam a acumulação de ácidos gordos livres (AGL) hepáticos e TGs (Eccleston *et al.*, 2011). Sob essas condições, uma mudança metabólica é induzida para superar a carga hepática de AGL, ocorrendo uma estimulação compensatória da β -oxidação mitocondrial de ácidos gordos. Essa mudança inclui a oxidação de ácidos gordos mitocondriais, a indução do ciclo do ácido tricarboxílico e a fosforilação oxidativa (Sunny *et al.*, 2011).

Quando a capacidade oxidativa das mitocôndrias é excedida, os ácidos gordos citosólicos são mobilizados para vias alternativas nos peroxissomas e nos microssomas (Johnson *et al.*, 1996; Reddy & Mannaerts, 1994), aumentando a formação de ROS, desestabilizando o ambiente redox da célula e causando lesões celulares. Lesão oxidativa nos complexos da cadeia transportadora de elétrons e no mtDNA (Ricci *et al.*, 2008; Rachek *et al.*, 2009) podem bloquear ainda mais o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (Figura 17). Isto desencadeia um círculo vicioso no qual a acumulação de lesões oxidativas afeta a eficiência das mitocôndrias e leva ao aumento da taxa de produção de ROS (Petrosillo *et al.*, 2008). Alterações na morfologia mitocondrial, deficiências na bioenergética mitocondrial, aumento da peroxidação lipídica e diminuição do conteúdo em ATP foram descritas em vários modelos de DFGNA (Begriche *et al.*, 2006; Teodoro *et al.*, 2006; Chavin *et al.*, 1999; Teodoro *et al.*, 2008).

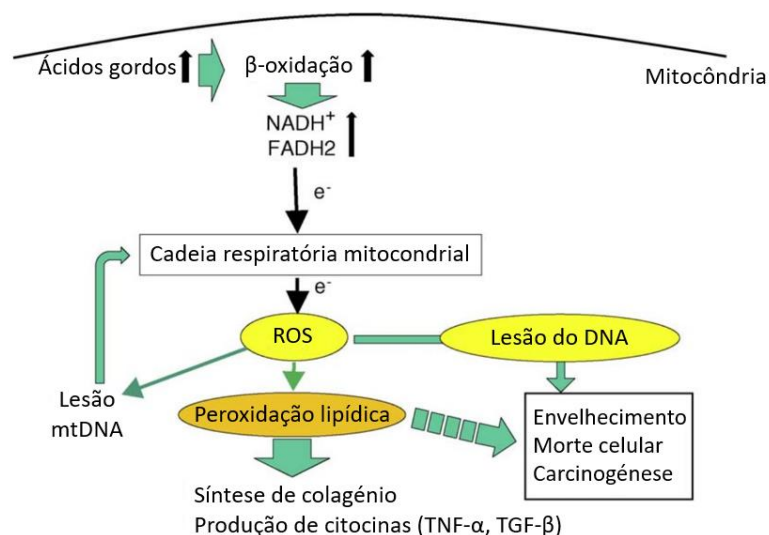


Figura 17 – Disfunção mitocondrial na DFGNA (Adaptado de: Yamashina *et al.*, 2009).

Evidências recentes sugerem que a elevação rápida de TGs no fígado a partir de plasma, AGL dietéticos e/ou lipogênese de *novo* em esteatose simples está associada a uma regulação positiva na função oxidativa mitocondrial (Miele *et al.*, 2003; Iozzo *et al.*, 2010; Sunny *et al.*, 2011). Esta adaptação ou remodelação da bioenergética mitocondrial é uma característica central da DFGNA. No entanto, essas alterações dependem do estadió e da gravidade da doença, da suscetibilidade da via metabólica e da capacidade tampão do hepatócito para armazenar o excesso de lípidos (Koliaki *et al.*, 2015; Patterson *et al.*, 2016; Satapati *et al.*, 2012). Em consonância com esses argumentos, a resistência à insulina hepática e a esteatose simples já estão estabelecidas em murganhos alimentados com dieta hiperlipídica (DH) durante 8 semanas, bem antes das alterações na bioenergética mitocondrial se tornarem evidentes (Patterson *et al.*, 2016; Satapati *et al.*, 2012). Nesses murganhos, apesar da função mitocondrial aparentemente normal, a acumulação de subprodutos lipotóxicos, incluindo ceramidas e diacilgliceróis, já é evidente durante os estádios iniciais do desenvolvimento da resistência hepática à insulina (Patterson *et al.*, 2016). Isto destaca uma interação complexa entre mecanismos oxidativos compensatórios precoces e armazenamento/eliminação ineficiente de AGL.

5. Potencial antidiabético do mirtilo

Uma dieta equilibrada tem um impacto positivo no bem-estar e na saúde humana e pode desempenhar um papel importante na prevenção e/ou tratamento de várias doenças. Assim, a utilização de compostos bioativos ou alimentos funcionais que possam prevenir ou pelo menos atrasar a evolução de algumas doenças, inclusive do foro metabólico (como a DMT2) é uma estratégia muito apelativa para a medicina.

O mirtilo é um fruto popular que despertou grande interesse por parte da comunidade nos últimos anos, devido à sua potencial relevância para a promoção e manutenção de saúde e prevenção de várias doenças (Mizuno & Rimando, 2009). Este fruto, pertencente à família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e género *Vaccinium*, é nativo da América do Norte, Estados Unidos e Canadá, sendo nestes países onde se encontram as maiores produções, apesar de existir em muitas outras regiões do Mundo, incluindo em Portugal (Silva *et al.*, 2008).

O mirtilo é conhecido como uma "fruta de longevidade" devido sobretudo à sua elevada capacidade antioxidante contra radicais livres e espécies reativas, sendo também considerado o “rei dos antioxidantes” entre todas as frutas e vegetais (Prior *et al.*, 1998).

5.1. Composição nutricional do mirtilo

A composição química e nutricional do mirtilo varia em função de inúmeros fatores que incluem a variedade (cultivar), práticas de cultivo, como também aspectos climáticos, entre outros. Este fruto apresenta elevada quantidade de água (cerca de 82 %), com baixo valor calórico, baixo teor em gordura e em sódio. Apresenta ainda uma grande variedade de vitaminas (A, B, C, K e ácido fólico) e minerais (potássio, magnésio, cálcio, fósforo e ferro), açúcares, pectinas, taninos, ácidos orgânicos e resveratrol (Silveira *et al.*, 2007; Skupień, 2006).

Os mirtilos são uma excelente fonte de antioxidantes naturais, principalmente polifenóis, que exercem impacto benéfico para a saúde (Zafra-Stone *et al.*, 2007; Norberto *et al.*, 2013; Maechler & Wollheim, 2001; Diaconeasa *et al.*, 2015). Tal como a maioria das bagas, os mirtilos são ricos em flavonóides, especificamente antocianinas, taninos e ácidos fenólicos (Prior *et al.*, 1998).

Dos diversos tipos de polifenóis, os mirtilos apresentam elevadas quantidades de antocianinas, principalmente na sua forma glicosilada (cianidina, malvidina, delphinidina, etc.), flavonóis (quercetina, canferol, miricetina, etc.), flavanóis (catequina, epicatequina, etc.), ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos (principalmente ácido clorogénico), estilbenos (resveratrol e piceatanol) e taninos condensados (Zheng & Wang, 2003; Neto, 2007; Wang *et al.*, 2009; Giovanelli & Buratti, 2009). No entanto, o perfil exato destes compostos, bem como a quantidade em que se encontram, variam com uma série de fatores como mencionado anteriormente.

5.2. Propriedades benéficas do mirtilo

Muitos estudos relatam que o mirtilo tem vários benefícios para a saúde associados à presença dos compostos bioativos (Heinonen *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Seeram, 2008), incluindo propriedades pré-bióticas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, anticancerígenas e sensibilizadoras de insulina (Duthie, 2007; Molan *et al.*, 2009; Neto, 2007; Norberto *et al.*, 2013; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Várias doenças crónicas poderiam beneficiar hipoteticamente do consumo de mirtilos, incluindo cancro (Smith *et al.*, 2000; Katsube *et al.*, 2003), diabetes (Martineau *et al.*, 2006), doenças cardiovasculares (Heinonen *et al.*, 1998) e neurodegenerativas (Joseph *et al.*, 2003; Krikorian *et al.*, 2010). Além disso, os mirtilos têm também efeitos benéficos sobre a visão (Kalt *et al.*, 2010).

Estudos documentaram os efeitos benéficos da suplementação com mirtilos em vários parâmetros metabólicos *in vitro* (Martineau *et al.*, 2006), em modelos animais (DeFuria *et al.*, 2009; Grace *et al.*, 2009) e em humanos (Stull *et al.*, 2010). Os mirtilos podem conferir proteção contra o desenvolvimento de intolerância à glicose e aumento dos níveis de glicose em circulação (Roopchand *et al.*, 2013; Vuong *et al.*, 2007), suprimir o apetite (Molan *et al.*, 2008) e normalizar marcadores lipídicos (Prior *et al.*, 2010).

Vários estudos reportam que as antocianidinas e quercetinas encontrados em *V. myrtillus*, constituem importantes agentes terapêuticos na diabetes, retardando o aparecimento de complicações diabéticas, geralmente relacionadas a lesões vasculares induzidas por stresse oxidativo e por outros mecanismos fisiopatológicos concomitantes e sinérgicos, como a inflamação (Duke, 1992; Riihinen *et al.*, 2008).

5.2.1. Capacidade antioxidante e anti-inflamatória

Muitas das propriedades biológicas benéficas dos mirtilos podem, de algum modo, estar relacionadas com a presença de antocianinas, flavonóides e de outros compostos fenólicos, podendo estes efeitos benéficos resultar da ação de compostos isolados, de grupos específicos de compostos ou de efeitos de sinergia entre eles. A atividade antioxidante dos mirtilos deve-se ao seu elevado teor em compostos fenólicos, sendo que a contribuição individual de cada um desses compostos para a capacidade antioxidante total está geralmente dependente da estrutura e da concentração em que se encontram (Zheng & Wang, 2003).

O efeito benéfico das antocianinas pode dever-se aos seus metabolitos. O ácido protocatecúico, por exemplo, é o principal metabolito das antocianinas em humanos e exerce atividade antioxidante e anti-inflamatória. Além das antocianinas, outras substâncias bioativas presentes nos mirtilos, como os flavonóides e a vitamina C, possuem propriedades antioxidantes e contribuem para a ação antioxidante global dos mirtilos (Giovanelli & Buratti, 2009).

A inflamação de baixo grau pode desempenhar um papel importante na resistência à insulina associada à obesidade, à DM2 e a outras comorbidades (Calder *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015; Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). A obesidade está associada à infiltração de macrófagos no tecido adiposo e à ativação da via inflamatória que leva ao desenvolvimento de resistência à insulina. A acumulação de macrófagos nos adipócitos induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Uma dieta enriquecida com vegetais e frutas está inversamente relacionada com o stresse

inflamatório, contrariamente às refeições calóricas que induzem um estado inflamatório agudo, tanto em adultos com excesso de peso como em adultos saudáveis (Calder *et al.*, 2011; Manning *et al.*, 2008; Vendrame *et al.*, 2013).

As várias antocianinas, ácido fenólico e outros compostos bioativos presentes nos mirtilos têm sido reconhecidos pela sua capacidade de fornecer e ativar uma proteção antioxidante celular, eliminar radicais livres, inibir a expressão de genes que induzem inflamação e, conseqüentemente, proteger contra lesões e citotoxicidade induzidas por agentes oxidantes e inflamatórios (Johnson *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2015; Nile & Park, 2014).

Existem vários mecanismos potenciais envolvidos nas propriedades anti-inflamatórias do mirtilo, intimamente ligadas aos efeitos antioxidantes. Com efeito, os antioxidantes presentes no mirtilo, como os polifenóis e as antocianinas, exibem efeitos anti-inflamatórios dependentes da redução de citocinas pró-inflamatórias e do aumento de mediadores anti-inflamatórios, como a adiponectina (Guo *et al.*, 2012). Para além disso, o stresse oxidativo, que se relaciona de forma estreita com a inflamação, é reduzido devido à forte atividade antioxidante dos mirtilos e seus extratos, nomeadamente por aumento da expressão génica da glutathione peroxidase (Lee *et al.*, 2008). Adicionalmente, o mirtilo ou as suas antocianinas, podem ser capazes de alterar a sinalização da proteína cinase ativada por mitogénios (MAPK), que modula a expressão génica inflamatória em vários tecidos e em macrófagos (Suganami *et al.*, 2007). Finalmente, a atenuação da ativação do fator nuclear kappa-B (NF-kB) pode estar relacionada com a capacidade antioxidante e anti-inflamatória dos mirtilos (Vendrame *et al.*, 2013).

Em suma, o consumo de mirtilo pode ter efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios através de diferentes vias, incluindo a inibição da produção de ROS, como os radicais hidroxilo (OH⁻) e superóxido (H⁺), e a redução de citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- α , e a IL-6, para além de influência sobre outros fatores, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). A via do NF-kB parece ser umas das principais vias de sinalização associada aos efeitos anti-inflamatórios dos mirtilos (Shi *et al.*, 2017). A Figura 18 representa esquematicamente algumas das vias propostas para os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antidiabéticos dos mirtilos.

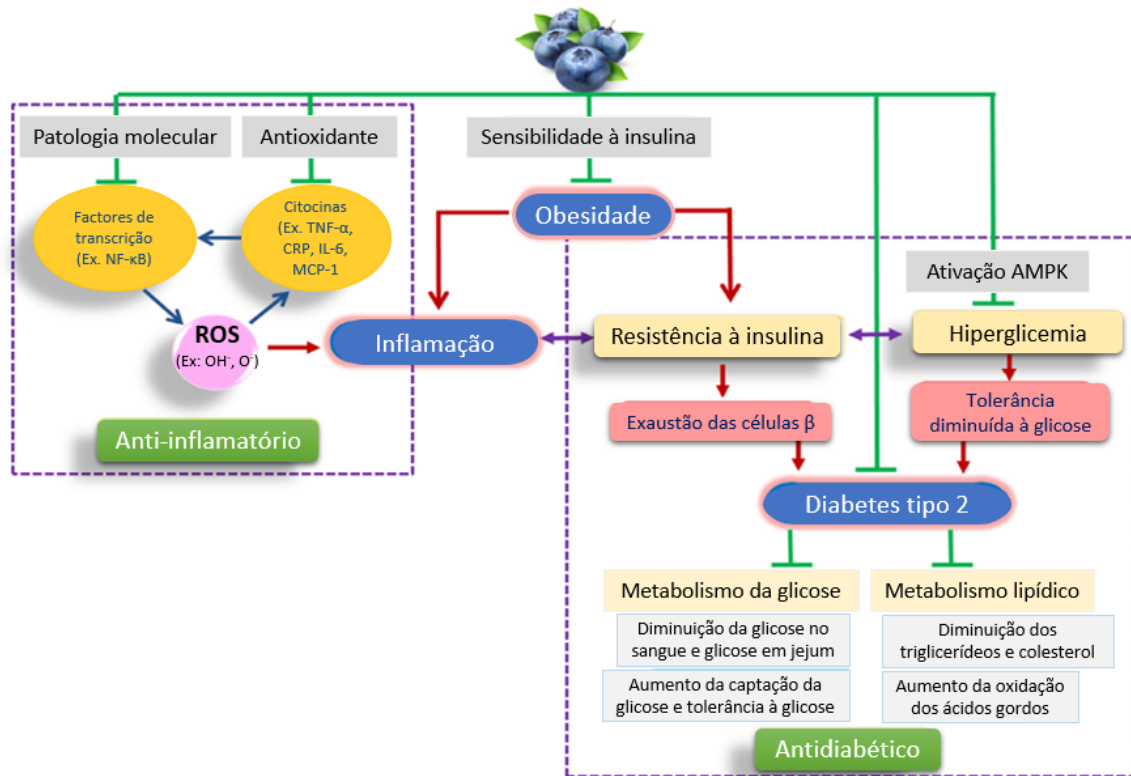


Figura 18 – Propostas de vias metabólicas envolvidas nos efeitos do mirtilo na obesidade e comorbidades relacionadas (Adaptado de: Shi *et al.*, 2017).

5.2.2. Propriedades antidiabéticas e hepatoprotetoras

Aumentar a sensibilidade à insulina, nomeadamente melhorar a resistência à insulina e a tolerância à glicose, é importante na prevenção e/ou no atraso na progressão da DMT2.

Existem evidências científicas crescentes que apoiam a existência de benefícios dos mirtilos para a saúde, incluindo devido às suas propriedades antidiabéticas. Estudos pré-clínicos (DeFuria *et al.*, 2009; Elks *et al.*, 2015; Nair *et al.*, 2014; Roopchand *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2011; Takikawa *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2013) e clínicos (Hoggard *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Rebello *et al.*, 2015; Stull *et al.*, 2010) encontraram melhorias na resistência à insulina e na tolerância à glicose após o consumo de mirtilo em roedores e humanos obesos e resistentes à insulina.

O mirtilo reduz a concentração de glicose, de TGs e de colesterol no sangue, aumentando a captação de glicose, a tolerância à glicose e oxidação de ácidos gordos (Shi *et al.*, 2017). Existem vários estudos *in vitro*, em animais e em humanos que mostram um potencial antidiabético do uso de mirtilo. Martineau *et al.* (2006) avaliaram a capacidade de um extrato de fruta de mirtilo em aumentar a proliferação de células β pancreáticas em cultura celular, sugerindo uma potencial proteção contra a lesão das células β, melhorando assim a sensibilidade à insulina. DeFuria *et al.* (2009) verificaram que murganhos C57BL/6

que consumiram 60 % de HF + 4 % de extrato de mirtilo durante 8 semanas melhoraram a tolerância à glicose em comparação com os murganhos HF. A administração de um extrato de folhas de mirtilo a ratos diabéticos reduziu em 26 % os níveis de glicose no sangue (Zafra-Stone *et al.*, 2007). Stull *et al.*, (2010) confirmaram, em indivíduos obesos e resistentes à insulina, um aumento da sensibilidade a esta hormona, após 6 semanas de consumo de mirtilo. Em oposição a estas evidências, outros investigadores não confirmam esses efeitos antidiabéticos, nomeadamente na melhoria da resistência à insulina e/ou tolerância à glicose em ratos com obesidade e diabetes induzidas por dietas hipercalóricas (Elks *et al.*, 2015; Mykkänen *et al.*, 2014; Prior *et al.*, 2008; Vendrame *et al.*, 2015). Estes resultados inconsistentes resultam principalmente da variação dos modelos animais, da duração do tratamento e da dose de compostos bioativos no mirtilo.

Além disso, estudos clínicos também relataram que a suplementação com mirtilo não mostrou o impacto na glicemia em jejum (Basu *et al.*, 2010; Kolehmainen *et al.*, 2012; Stull *et al.*, 2010), mas levou a uma melhoria da sensibilidade à insulina em voluntários humanos, obesos, não diabéticos, mas com resistência à insulina (Stull *et al.*, 2010).

Há evidências em modelos *in vitro* e *in vivo* que sugerem que os mirtilos podem modular as vias intracelulares do metabolismo da glicose, como anteriormente mencionado. No entanto, não existe ainda uma resposta clara para os mecanismos celulares que contribuem para o efeito antidiabético dos mirtilos. Estudos em cultura de células e em animais sugerem que o aumento da captação de glicose deve-se à atividade na via dependente da insulina (Seymour *et al.*, 2011; Martineau *et al.*, 2006); por outro lado, outros investigadores observaram uma atividade através de vias independentes da insulina (Takikawa *et al.*, 2010; Vuong *et al.*, 2007). Contraditoriamente, Roopchand e colaboradores (2013) relatam que as antocianinas presentes nos mirtilos não aumentavam a captação de glicose nos miotubos de linhas celulares L6 (isto é, em células musculares esqueléticas). No entanto, esses investigadores observaram redução na produção de glicose nos hepatócitos de ratos após a adição de antocianinas de mirtilo.

Embora os efeitos do sumo de mirtilo sobre a tolerância à glicose *in vivo* sejam variados, a suplementação com antocianinas parece ter um efeito mais positivo, já que as concentrações séricas de glicose em jejum diminuíram e a tolerância à glicose aumentou em murganhos alimentados com dieta gorda (Prior *et al.*, 2010). Este resultado é possivelmente atribuído a outros constituintes do sumo de mirtilo, como procianidinas, ácido clorogénico e outros compostos solúveis em água, incluindo açúcares, que não estão presentes nas antocianinas. É possível que este efeito benéfico na tolerância à glicose possa ser devido a

um efeito direto no fígado, já que as antocianinas do mirtilo (0,05 – 10 mg/mL) demonstraram reduzir significativamente a produção de glicose em 24 – 74 % na linha celular H4IIE de hepatócitos (Roopchand *et al.*, 2013).

Dietas enriquecidas com mirtilos foram propostas para melhorar a dislipidemia (Seymour *et al.*, 2011; Vendrame *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013). As concentrações plasmáticas de TGs, colesterol total e LDL foram significativamente reduzidas em ratos Zucker obesos suplementados com 8 % de mirtilo selvagem durante 8 semanas (Vendrame *et al.*, 2014).

ROS e stresse oxidativo têm mostrado um papel importante na etiopatogênese das alterações fibróticas hepáticas (Tahan *et al.*, 2007; Tahan *et al.*, 2004; Poli, 2000), e o tratamento antioxidante *in vivo* parece ser eficaz na prevenção ou redução de lesões hepáticas crônicas, incluindo da fibrose (Parola & Robino, 2001). O stresse oxidativo agrava a fibrose hepática via ativação de células estreladas hepáticas e a peroxidação lipídica estimula a transcrição do gene do colagénio. A expressão de actina do músculo liso-alfa (α -SMA) é uma característica das células estreladas hepáticas ativadas e é considerada um marcador de fibrose hepática (Campbell *et al.*, 2005). Com a lesão hepática, as células estreladas hepáticas são ativadas e diferenciadas em células semelhantes a miofibroblastos, que proliferam e contribuem para a deposição de colagénio na matriz extracelular (Friedman, 2000), um processo que conduz à fibrose. As metalotioneínas (MTs) são uma família de proteínas intracelulares de baixo peso molecular (6 a 7 kDa), ricas em cisteína, que tem um papel antioxidante importante, incluindo a nível hepático (Coyle *et al.*, 2002 Chiaverini & De Ley, 2010; Nachman-Clewner *et al.*, 2008). Wang *et al.* (2013) mostrou que o sumo de mirtilo aumenta a capacidade antioxidante do fígado presumivelmente através da estimulação da expressão de metalotioneína e atividade da SOD, que diminui os níveis de α -SMA e colagénio na matriz extracelular, atenuando a fibrose hepática. Srivastava *et al.*, (2007) descobriu que as antocianinas de mirtilo continham principalmente cianidina, delphinidina, malvidina e peonidina. Estas substâncias podem aumentar a apoptose das células e promover a recuperação da função original das células.

6. Modelos animais de DMT2 e de pré-diabetes

Os modelos animais tornaram-se uma ferramenta útil na investigação científica, nomeadamente para avaliar o efeito dos vários fatores genéticos, ambientais, comportamentais e farmacológicos que originam alterações metabólicas semelhantes às encontradas nas doenças do Homem. Vários modelos animais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de DMT2, bem como para identificar e melhorar os efeitos das opções farmacológicas e não-farmacológicas. Como claramente se compreende, existem uma série de impedimentos éticos para a investigação em humanos e assim, o uso de modelos animais é uma maneira útil de estudar doenças metabólicas, em particular a diabetes, sendo cruciais para investigar as mudanças adaptativas a diferentes níveis funcionais, morfológicos e bioquímicos. Contudo, a extrapolação subsequente dos resultados obtidos, em modelos animais, para humanos deve ser obviamente cautelosa.

Os modelos experimentais mais frequentemente utilizados são roedores (ratos ou murganhos), devido ao seu tamanho, ao facto de apresentarem um ciclo curto de reprodução, viabilidade da realização de estudos longitudinais usando um número maior de animais, baixo custo, para além de serem de fácil disponibilidade e manuseamento (Cefalu, 2006). Existe uma grande diversidade de modelos animais tanto para a DMT2 como para a obesidade (Islam & Loots, 2009), alguns dos quais mostram uma predisposição genética para a doença (Kim *et al.*, 1998), enquanto outros podem desenvolver a doença espontaneamente (Liu *et al.*, 2002) ou de maneira induzida por dieta (Dourmashkin *et al.*, 2005), como apresentado de forma reduzida na Tabela 2.

Os modelos animais de DMT2 tendem a incluir modelos de resistência à insulina, modelos de disfunção de células β pancreáticas, modelos obesos e modelos não obesos. Muitos modelos animais de DMT2 são obesos, o que reflete a condição humana em que a obesidade está intimamente ligada ao desenvolvimento de resistência à insulina e da DMT2. No entanto, existem outros tipos de modelos animais, como por exemplo com insuficiência de células β , ou seja, com redução da função e/ou massa destas células. Estes modelos podem ter aplicações a diferentes níveis, incluindo melhoria na resistência à insulina, estudo dos efeitos em complicações diabéticas, na melhoria na função das células beta, na prevenção da deposição amilóide nos ilhéus, na prevenção da obesidade induzida pela dieta e na melhoria da sobrevivência das células. O modelo mais apropriado será dependente da questão científica em causa (King & Bowe, 2015).

Tabela 2 – Resumo de modelos animais (roedores) de DMT2 e obesidade (Adaptado de: King, 2012).

Mecanismo de indução	Modelo	Principais características
Modelos obesos transgênicos (monogênicos)	Ratinho Lep ^{ob/ob} Ratinho Lepr ^{db/db} Ratos ZDF	Hiperglicemia induzida pela obesidade
Modelos obesos transgênicos (poligênicos)	Ratinho KK Rato OLETF Ratinho TallyHo/Jng Ratinho NoncNZO10/LtJ	Hiperglicemia induzida pela obesidade
Modelos obesos induzidos por dieta	Dieta rica em gordura, alimentação de elevado teor de gordura (ratinho ou rato) Rato do deserto Rato <i>Nile grass</i>	Hiperglicemia induzida pela obesidade
Modelos não obesos de transmissão intergeracional (30 gerações) de intolerância à glicose	Rato GK	Hiperglicemia induzida pela insuficiência funcional das células beta
Modelos geneticamente induzidos de disfunção das células beta	Ratinho hIAPP Ratinho AKITA	Deposição amilóide nos ilhéus Destruição das células beta devido ao stresse do RE

Os modelos animais (roedores) de diabetes frequentemente utilizados são os induzidos por estreptozotocina ou aloxano, e em simultâneo com modificações da dieta (S. Lenzen, 2008), ou modelos obtidos por pancreatectomia parcial (Islam & Loots, 2009) que induzem insuficiência de insulina, hiperglicemia e cetose. Embora esses modelos sejam úteis para o estudo da diabetes, eles não são totalmente representativos da síndrome metabólica ou da DMT2 humana induzida por dieta. De facto, a composição da dieta tem sido considerada um fator importante no comprometimento da atividade da insulina (Dourmashkin *et al.*, 2005). Um estudo em ratos confirmou que a administração de dieta hiperlipídica durante 2 meses é uma forma rápida e fácil de induzir a síndrome metabólica, associada a distúrbios metabólicos e oxidativos, sem alteração da glicemia (Auberval *et al.*, 2014). Entretanto, estudos epidemiológicos sobre o consumo de açúcar e a prevalência da diabetes (Basu *et al.*, 2013) sugerem que uma dieta rica em gordura e açúcar é um fator de risco maior para esses transtornos do que uma dieta rica em apenas gorduras ou só açúcares.

Contrariamente à DMT2, a variedade de modelos animais disponíveis para aprofundar mecanismos e até mesmo mimetizar a condição de pré-diabetes humana é ainda limitada. Um modelo animal pré-diabético pode ajudar a entender as circunstâncias que levam à evolução da doença na sua fase mais precoce, mesmo antes do aparecimento dos sintomas clínicos. Alguns modelos animais induzidos pela dieta foram também descritos para

mimetizar os estadios iniciais de pré-diabetes e/ou resistência à insulina. Diversos estudos experimentais mostraram que a composição dos macronutrientes provenientes da dieta pode desencadear o estado de pré-diabetes (Storlien *et al.*, 1988; Bessesen, 2001). Muitos estudos têm descrito a relação entre sacarose e resistência à insulina. Em estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo, foi reproduzido e caracterizado um modelo animal de pré-diabetes, induzido pelo consumo de uma solução de sacarose a 35 %, durante 9 semanas. Os animais apresentavam normoglicemia em jejum mas com intolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina, sem obesidade e hipertensão (Nunes *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2013).

Capítulo II – Objetivos

Este trabalho experimental pretende ajudar a colmatar algumas lacunas no conhecimento nesta área específica da pré-diabetes, em particular da bioenergética e dinâmica mitocondrial a nível hepático, bem como o possível impacto do uso de sumo de mirtilo nesta fase da doença.

Tal como atrás referido, o fígado desempenha um papel central na regulação do metabolismo de hidratos de carbono, proteínas e lípidos. Este tecido é responsável pela regulação dos níveis de glicose plasmática através da glicogénese e da glicogenólise. Diversas vias ativadas estão identificadas como indutoras de lesão hepática em doentes diabéticos. A resistência à insulina, principal causa de hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória, é o fator predominante. Entre os vários tecidos sensíveis à insulina, o fígado é um dos mais suscetíveis aos efeitos do stresse oxidativo induzido pela hiperglicemia. Contudo, ainda não está completamente elucidada a natureza da disfunção (e lesão) hepática numa situação de pré-diabetes. O fígado é um órgão crítico para a regulação da homeostase energética do corpo devido ao seu papel central no metabolismo lipídico e glicídico. A esteatose hepática, caracterizada pela acumulação lipídica nos hepatócitos, principalmente sob a forma de AGL e de TGs, é uma séria consequência da diabetes. Esse excesso de lípidos intracelulares destabiliza o metabolismo energético da célula, uma vez que ocorre substituição da glicose como fonte de energia por lípidos. Esta alteração tem graves consequências, especialmente ao nível da mitocôndria, organelo responsável pela produção elevada (cerca de 90 %) de ATP consumido pela célula, com um papel central no metabolismo lipídico, sendo visto como um bom modelo para estudar os efeitos da dieta a nível celular, nomeadamente no hepatócito. Vários estudos anteriores debruçaram-se sobre as alterações a nível da disfunção mitocondrial do hepatócito na diabetes. Contudo, numa fase de pré-diabetes as evidências existentes são mais escassas e merecem melhor aprofundamento.

Muitos estudos relatam que o mirtilo tem vários benefícios para a saúde associados à presença dos compostos bioativos, nomeadamente propriedades pré-bióticas, antioxidantes, anti-inflamatórias e sensibilizadoras de insulina. Vários trabalhos anteriores, tanto em animais como em humanos, avaliaram o efeito dos mirtilos na obesidade e na diabetes, contudo, os mecanismos celulares associados às suas propriedades benéficas ainda não estão completamente elucidados, nomeadamente em situações mais precoces de doença (como na pré-diabetes), sendo este o principal foco deste estudo.

A principal hipótese deste estudo experimental é a de que num estado de pré-diabetes induzido por uma dieta hipercalórica existem já alterações, mesmo que ténues, a nível hepático, para as quais os desequilíbrios da bioenergética mitocondrial podem ser cruciais. Para além disso, equaciona-se a possibilidade do sumo de mirtilo ser uma boa abordagem terapêutica (mais precisamente nutracêutica) não farmacológica para prevenir a evolução da doença, devido às suas propriedades benéficas relacionadas não apenas com o poder antioxidante mas também com a melhoria da intolerância à glicose e da sensibilidade à insulina, de supressão do apetite e de melhoria de marcadores lipídicos, já observadas em estadios mais avançados da doença.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi o de avaliar o impacto de uma dieta rica em mirtilos (mais especificamente sumo de mirtilo ingerido através da bebida) a nível da disfunção e lesão do tecido hepático, num modelo animal (em rato) de pré-diabetes induzido por uma dieta hipercalórica (rica em lípidos e em hidratos de carbono).

Para atingir o objetivo principal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Caracterização do modelo animal em termos de evolução dos seguintes parâmetros:
 - a. peso corporal;
 - b. perfil glicémico, avaliado através dos níveis de glicose em jejum e em estado pós-prandial, da HbA1c e do teste de tolerância à glicose (TTG);
 - c. perfil insulínico, analisado por intermédio das concentrações de insulina em jejum e em estado pós-prandial e pelo teste de tolerância à insulina (TTI);
 - d. equilíbrio oxidativo no soro, avaliado pela peroxidação lipídica medida pela concentração sérica de malondialdeído (MDA) e pela capacidade antioxidante total (TAS);
 - e. lesão e disfunção hepática, avaliada respetivamente através de marcadores histomorfológicos e de diversos parâmetros relacionados com a bioenergética mitocondrial, incluindo a determinação do potencial transmembranar mitocondrial, avaliação da respiração mitocondrial, permeabilidade transitória mitocondrial, formação de ROS bem como a análise da expressão de proteínas envolvidas na biogénese/dinâmica mitocondrial.
- 2) Avaliação do efeito do sumo de mirtilo nos parâmetros atrás referidos.

Capítulo III – Materiais e Métodos

1. Preparação do sumo de mirtilo

Os mirtilos (*Vaccinium corymbosum L.*, da Cultivar: Liberty) foram fornecidos pela Cooperativa Agropecuária dos Agricultores de Mangualde (COAPE). O sumo de mirtilo foi preparado diariamente e fornecido aos animais a partir da semana 9, após o início de protocolo animal, e de estabelecido o modelo de pré-diabetes, de uma forma preventiva numa concentração de 25 g/kg de peso corporal.

2. Animais e acondicionamento

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar machos (n=48) provenientes do biotério Charles River (Barcelona, Espanha). Os animais chegaram ao laboratório com 8 semanas de idade e foram mantidos, de acordo com as normas legais e éticas em vigor, no biotério do Instituto de Investigação Clínica e Biomédica de Coimbra (iCBR), da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, e foram acomodados em gaiolas individualmente ventiladas (IVC, *individually ventilated cages*), 2 animais por gaiola, sob temperatura (22-23°C), humidade (25 %) e iluminação controlada (12horas:12horas, ciclo claro-escuro).

3. Grupos de estudo e protocolo experimental

Depois de uma semana de adaptação, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, de acordo com o seguinte protocolo animal, representado na Figura 19:

- 1) Grupo veículo (Controlo) (n = 8) – animais alimentados com uma ração normal e água *ad libitum* na bebida durante 23 semanas (T23);
- 2) Grupo tratado com sumo de mirtilo (Mirtilo) (n = 8) – animais alimentados com uma ração normal e tratados com mirtilos, em forma de sumo, dissolvido em água, fornecido nos *biberons*, numa dose de 25 g/kg de peso corporal/dia, a partir da semana 9 e durante 14 semanas;
- 3) Grupo Pré-diabético – estado pré-diabético avançado (dieta hipercalórica – HC) (n = 10): animais mantidos inicialmente com uma ração padrão e tratados com uma solução de 35 % de sacarose na água, durante as primeiras 9 semanas e,

posteriormente, durante as 14 semanas seguintes, suplementados com uma ração rica em gordura (*High-fat*, HF) (60 % calorias provenientes de gordura, 58Y1, TestDiet);

4) Grupo pré-diabético tratado com sumo de mirtilo (HC+M) (n = 10) – animais mantidos sob os mesmos tratamentos do grupo anterior (HF) mas tratados com sumo de mirtilo (Mirtilo, 25 g/kg/dia) dissolvido na solução de sacarose (35 %), durante as últimas 14 semanas.

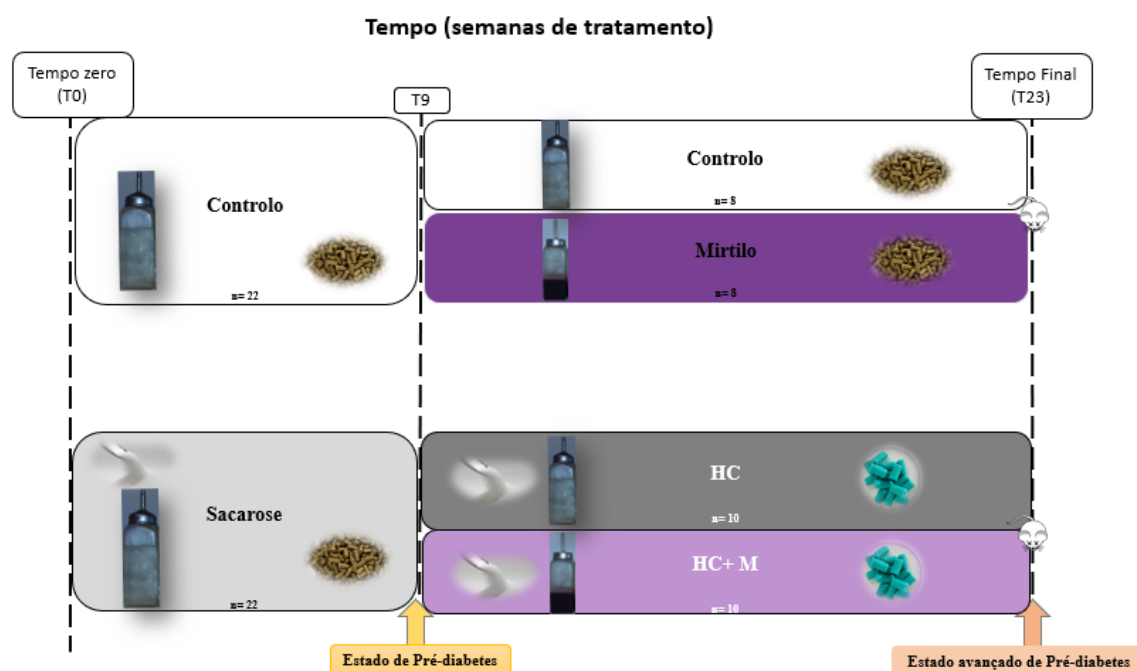


Figura 19 – Grupos experimentais e desenho do protocolo animal. Mirtilo: sumo de mirtilo (25 g/kg–peso corporal/dia); Sacarose: dieta rica em sacarose (35 % sacarose); HC (Hipercalórica): dieta rica em gordura (60% calorias da comida) e sacarose na água da bebida (35 %); HC+M: dieta rica em gordura e sumo de mirtilo dissolvido na solução (35 %) de sacarose T: Tempo de tratamento (em semanas); : Sacrifício dos animais/recolha de sangue e tecidos.

4. Monitorização do peso corporal e consumos calóricos

Os animais foram pesados utilizando uma balança analítica (CQT 2000 Core® Portable Compact Balance, Adam Equipment, USA). O peso corporal de cada animal foi registado à chegada e semanalmente durante o período experimental até ao dia do sacrifício.

Durante o protocolo animal, a bebida consumida foi quantificada semanalmente, com o auxílio de uma proveta. Foi também quantificada a ração ingerida semanalmente, utilizando a mesma balança, para posterior determinação do consumo de calórico total.

5. Sacrifício dos animais e colheita de sangue e tecidos

No dia do sacrifício, no tempo final (T23) os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com 100 mg/kg de uma solução anestésica de Cetamina (Imalgene, Portugal) e de relaxante muscular cloropromazina (Largactil, Portugal). As amostras sanguíneas foram imediatamente colhidas por punção venosa na veia jugular (Figura 20) e colocadas em tubos sem anticoagulante (Vacuette®, Áustria) para obtenção de soro.



Figura 20 – Colheita de sangue no dia do sacrifício.

Após essa recolha, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical após reforço anestésico e o fígado foi imediatamente recolhido, pesado. Foi dividido em várias amostras: uma fração foi armazenada em azoto líquido, outra em formaldeído 10 % como pré-fixação para posterior análise histológica e uma outra fração para o isolamento de mitocôndrias.

6. Perfil glicémico e insulínico

6.1. Ensaios *in vivo*

6.1.1. Glicemia em jejum

Na última semana de tratamento, os ratos foram colocados em jejum durante 6 horas e os valores de glicose sérica avaliados a partir de uma gota de sangue recolhida da veia da cauda do animal utilizando um glucómetro portátil ACCU-CHEK® AVIVA (Roche, Alemanha). Os resultados foram expressos em mg/dL.

6.1.2. Teste de tolerância à glicose (TTG)

Na última semana de tratamento, os ratos foram submetidos a um período de jejum de 6 horas e posteriormente administrados intraperitonealmente (i.p.) com uma solução de glicose (2 g/kg de peso corporal). Os valores de glicose foram medidos em amostras

recolhidas imediatamente antes da administração (0 minutos) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após, a partir da veia da cauda, utilizando o mesmo glucómetro.

6.1.3. Teste de tolerância à insulina (TTI)

Na última semana de tratamento, os ratos foram submetidos a um período de jejum de 6 horas e posteriormente administrados por via i.p. com uma solução de insulina (0,75 U/kg de peso corporal). A glicose foi monitorizada, através da colheita de sangue na veia caudal, recolhida imediatamente antes da injeção de insulina e 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após, usando o mesmo glucómetro.

6.2. Ensaio *ex vivo*

6.2.1. Glicemia pós-prandial

Os níveis de glicemia pós-prandial no sangue foram medidos no dia do sacrifício, a partir de uma gota de sangue recolhida por punção venosa na veia jugular, com auxílio do glucómetro.

6.2.2. Hemoglobina glicosilada (HbA1c)

A hemoglobina glicosilada foi doseada no dia do sacrifício através de uma gota de sangue colocada num analisador automático (Siemens, DCA Vantage Analyzer™, EUA).

6.3. Níveis séricos de insulina

Os níveis de insulina foram doseados nas amostras de soro através de um *kit* de ELISA (ensaio de imunoadsorção enzimática) da Mercodia (Uppsala, Suécia). Este *kit* consiste em um imunensaio enzimático em dois estádios em fase sólida. Este método é baseado na técnica de sanduíche direta, em que dois anticorpos monoclonais são direcionados contra determinados antígenos separados da molécula de insulina. Na fase de incubação, as moléculas de insulina na amostra reagem com anticorpos anti-insulina correspondentes na peroxidase conjugada e os anticorpos anti-insulina correspondentes fixados no poço de microtitulação. O anticorpo marcado com enzima não ligada é removido no passo de lavagem. A enzima conjugada ligada é detetada por reação com o 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina. A reação termina após a adição de solução ácida, que leva à

formação de um composto colorido. A intensidade da cor é avaliada por espectrofotometria a 450 nm.

7. Perfil lipídico: níveis séricos de colesterol total e de triglicerídeos

O sangue foi recolhido para seringas sem anticoagulante e centrifugado (35000 rpm, 15 minutos a 4 °C). Os níveis de colesterol total e de triglicerídeos (TGs) foram determinados em soro através de um analisador automático (Hitachi 717, Roche Diagnostics Inc., MA, EUA) utilizando o reagente Cholesterol RTU (bioMérieux, Lyon, França) e *kit* TG PAP 1000 (bioMérieux, Lyon, França), para a medição de colesterol, e TGs, respetivamente, através de métodos colorimétricos.

8. Equilíbrio oxidativo

8.1. Quantificação da peroxidação lipídica no soro

A medição de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Tiobarbituric Acid Reactive Substances*) é uma técnica usada para avaliação da peroxidação lipídica. O malondialdeído (MDA) é o aldeído mais significativo obtido por decomposição de produtos de peroxidação lipídica e, assim, amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do stresse oxidativo (Pilz *et al.*, 2000). Quando submetido a condições de pH ácido (3,5) e temperatura elevada (100 °C), este reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um aducto (TBA-MDA) cromogénio de cor avermelhada, que pode ser medido por espectrofotometria (532 nm).

Num tubo de polipropileno de 10 mL, 100 µL de soro foram homogeneizados com 100 µL de solução antioxidante de hidroxitolueno butilado (BHT) dissolvido em etanol, 100 µL de catalisador de tricloreto de ferro hexa-hidratado (FeCl₃.6H₂O), dissolvido em água destilada, 1,5 mL de tampão de HCl–Glicina a pH 3,5, e finalmente 1,5 mL de reagente de ácido tiobarbitúrico. Todos os tubos foram colocados no escuro durante 60 minutos. Posteriormente, as amostras foram colocadas a 90 °C durante 60 minutos, sendo de seguida parada a reacção colocando os tudo em gelo. Neste ensaio, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA, sendo o produto final uma molécula que pode ser quantificada espectrofotometricamente a 532 nm (pigmento rosa). A concentração de MDA nas amostras é calculada em função de uma curva de calibração. Da solução comercial de malonaldeído Bis (*dimetil acetal*) preparou-se uma solução mãe de concentração 83,5 µmol/L, a partir da

qual se prepararam as soluções padrão de concentrações conhecidas (intervalo: 0,10 – 16,70 μM) que, em conjunto com um branco, serviram para a obtenção da curva de calibração. Os resultados são expressos em μM .

8.2. Quantificação da capacidade antioxidante total no soro

Foi usado o método FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) para quantificar a capacidade antioxidante total (TAS) das amostras de soro. Esta determinação depende da redução do complexo férrico de tripiridil-triazina $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ a pH baixo. O complexo ferroso $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ apresenta uma cor azul intensa que é quantificada a um comprimento de onda de 593 nm (Benzie e Strain, 1996).

Para quantificação das concentrações séricas de TAS foi necessária a construção de uma curva de calibração. Da solução comercial de Trolox, preparou-se uma solução-mãe de concentração 1750 μM , a partir da qual se prepararam as soluções padrão de concentrações conhecidas (intervalo: 250 – 1500 μM) que, em conjunto com um branco, serviram para obtenção da curva de calibração. O branco constituído apenas por água e reagente FRAP. O reagente de FRAP é constituído por: tampão acetato a pH = 3,6 (300 mM); TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) (10 mM) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM). Colocou-se em cada poço da placa de poliestireno (COSTAR[®], 96 poços, placa EIA/RIA) 10 μL de amostra, ou solução-padrão (amostras padrão) ou água (branco). Em seguida, em cada poço adicionaram-se 300 μL de reagente FRAP e 30 μL de água. A placa foi incubada durante 15 minutos a 37 °C num leitor de placa (BIOTEK[®], Synergy HT, EUA) ligado a um computador (Fujitsu, Siemens). Por fim, a absorvância foi lida um comprimento de onda de 593 nm, e os resultados expressos em μM .

9. Análise histológica do tecido hepático

As amostras de fígado foram fixadas em formalina 10 % e posteriormente em cassetes preenchidas com cera de parafina num processo automático. Foram realizados cortes de 4 μm de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para análise. Todas as amostras foram examinadas por microscopia de luz usando um microscópio Zeiss Mod. Axioplan 2.

10. Isolamento de mitocôndrias hepáticas e determinação da concentração de proteína

As mitocôndrias foram isoladas do fígado de ratos por métodos convencionais descritos por Gazzoti e colaboradores (Gazzotti *et al.*, 1979) com pequenas modificações (Palmeira *et al.*, 1994). Todo o material de isolamento foi mantido em gelo durante o procedimento de forma a assegurar a manutenção a baixa temperatura baixa.

O fígado foi imediatamente excisado e finamente macerado num meio de homogeneização frio (4 °C), o meio de homogeneização continha sacarose 250 mM, HEPES 10 mM (pH 7,4), EGTA 0,5 mM e albumina de soro bovino (BSA) 0,1 % despilificada. O tecido hepático foi finamente cortado e lavado várias vezes com meio de homogeneização de modo a remover o excesso de sangue. Seguidamente o tecido foi colocado num homogeneizador de vidro do tipo “Potter–Elvehjem” com um pistão de PTFE (Teflon) até se obter uma suspensão homogénea.

O homogeneizado foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (centrifugadora Sigma 3 – 18 K). Nesta primeira centrifugação o objetivo é a remoção dos componentes mais densos do homogeneizado (núcleos, eritrócitos, células fragmentadas). A gordura suspensa foi aspirada e o sobrenadante recolhido, o qual após diluição com tampão de homogeneização, foi centrifugado a 10 000 rpm durante 10 minutos (4°C), para obter a fração mitocondrial. O sobrenadante foi aspirado permitindo a eliminação de toda a gordura e o sedimento (*pellet*) cuidadosamente ressuspenso com a ajuda de um pincel, em tampão de lavagem (250 mM de sacarose, 10 mM de HEPES (pH 7,4). Após transferência para novos tubos de centrifuga e diluição em cerca de 40 mL de tampão de lavagem, seguiu-se uma nova centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi novamente desperdiçado e o sedimento ressuspenso em tampão de lavagem, com nova centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos. Este passo foi repetido uma vez mais. Por fim, o sedimento mitocondrial foi ressuspenso em cerca de 2 mL de tampão de lavagem e transferido para microtubos. A suspensão mitocondrial foi mantida a 4 °C e os ensaios realizados nas 4 – 5 horas seguintes.

A concentração de proteína foi estimada espectrofotometricamente pelo método biureto, utilizando BSA como padrão (Gornall *et al.*, 1949). Uma pequena amostra de preparação mitocondrial (50 µL) foi solubilizada pela adição de 50 µL de SDS a 10 %. Foi adicionada água desionizada até perfazer um volume de 0,5 mL, e em seguida 2 mL de reagente de biureto. Prepararam-se padrões de BSA 0,1; 1,5 e 2 mg/mL a partir de um *stock*

0,4 % tendo sido adicionados água desionizada de modo a que, conjuntamente com a BSA, o volume perfizesse 0,5 mL. A estes padrões foram adicionados 50 μ L de meio de lavagem, 50 μ L de SDS e, finalmente 2 mL de reagente de biureto. Os tubos foram incubados a 37 °C, durante 10 minutos. Após este período, a absorvância das amostras e padrões foi medida a 540 nm, num espectrofotómetro Thermo, série HeYos Y.

11. Avaliação do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O $\Delta\Psi_m$, foi avaliado com base na monotorização da acumulação e libertação do catião lipofílico tetrafenilfófonio (TPP⁺). Para este efeito utilizou-se um eléctrodo seletivo para TPP⁺, preparado no nosso laboratório de acordo com métodos previamente estabelecidos por Kamo e colaboradores (Kamo *et al.*, 1979) e um eléctrodo de referência de Ag/AgCl (modelo MI 402, Microelectrodes Inc, Bedford, NH). A entrada do TPP⁺ nas mitocôndrias foi determinada pelo decréscimo de concentração de TPP⁺ no meio.

A diferença de potencial gerada entre o eléctrodo seletivo e o sinal de referência foi medida com um electrómetro adequado (medidor de pH Jenway 3305) e o sinal debitado para um registador Kipp & Zonen, depois de passar por um circuito de compensação de voltagem basal (Madeira, 1975).

Utilizando-se apenas os eléctrodos que apresentam uma correlação linear com logaritmo da concentração de TPP⁺, com uma inclinação de 59 \pm 1, isto é, com uma boa aproximação à inclinação prevista pela equação de Nernst.

As reacções foram realizadas a 25 °C, numa câmara com revestimento de água com temperatura controlada e com agitação magnética contínua. As mitocôndrias (1 mg) foram suspensas em 1 mL de meio de reacção (sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, KH₂PO₄ 5 mM, EDTA 50 μ M, HEPES 5 mM (pH 7,4)) e suplementada com 3 μ L de TPP⁺. Esta concentração de TPP⁺ foi escolhida por permitir uma elevada sensibilidade nas determinações, na ausência de efeitos tóxicos na mitocôndria (Jensen & Gunter, 1984; Wingrove & Gunter, 1985).

Os ensaios foram realizados com 1 mg de proteína mitocondrial, na presença de 5 mM de succinato como substrato respiratório. Para evitar a contribuição do complexo I devido à utilização de possíveis substratos endógenos, os ensaios decorreram na presença de rotenona 3 μ M, um inibidor do complexo I. A energização das mitocôndrias resultou no desenvolvimento de $\Delta\Psi_m$ e na tomada de TPP⁺ pelas mitocôndrias.

O eléctrodo foi calibrado com TPP⁺, assumindo a resposta *nersntiana* do ião através da membrana sintética. $\Delta\Psi_m$, que é expresso em milivolts (mV), foi calculado usando a equação:

$$\Delta\Psi_m = 59 \log (v/V) - 59 \log 10^{\Delta E / 59} - 1)$$

De acordo com Muratsugu e colaboradores (Muratsugu *et al.*, 1977) e Kamo e colaboradores (1979) v , V e ΔE representam o volume da matriz mitocondrial, o volume do meio de incubação e a deflexão potencial do eléctrodo desde a linha basal, respetivamente. Foi assumido um volume de matriz das mitocôndrias de 1,1 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de proteína (Masini *et al.*, 1984). O valor da *lag-phase* foi calculado mediante a medição do tempo decorrido desde o início do ciclo fosforilativo (coincidente com a adição de 200 nmol de ADP) até ao restabelecimento do potencial inicial.

12. Determinação do consumo de oxigénio em preparações mitocondriais

O consumo de oxigénio das mitocôndrias isoladas foi determinado polarograficamente com um eléctrodo de oxigénio do tipo Clark (Estabrook, 1967) conectado a um registrador Kipp & Zonen adequado, através de um sistema de controlo de eléctrodo de oxigénio (modelo YSI 5300). O eléctrodo foi calibrado de acordo com o previamente descrito (Rickwood *et al.*, 1987).

Numa câmara de reação fechada, termoestabilizada, as mitocôndrias (1 mg) foram suspensas sob agitação constante, a 25 °C, em 1,3 mL de meio de reação (sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, KH₂PO₄ 5 mM, EDTA 50 μM , HEPES 5 mM (pH 7,4)), suplementado com rotenona 3 μM . Durante a experiência, a suspensão mitocondrial foi sujeita a agitação magnética contínua, usando-se um pequeno magnete inserido na câmara. A respiração mitocondrial foi iniciada com a adição do substrato respiratório, succinato (5 mM). Após ser registado o consumo de oxigénio induzido pela adição do substrato respiratório, foram adicionadas 200 nmol de ADP, o que desencadeou o estado respiratório 3. Após todo o ADP adicionado ter sido fosforilado a ATP, a respiração reassumiu uma velocidade mais lenta, o denominado estado respiratório 4. Os estados respiratórios foram determinados de acordo com Chance e Williams (Chance & Williams, 1956). O índice de controlo respiratório, definido como ICR (índice de controlo respiratório), foi determinado pelo quociente entre o estado 3 (após a fosforilação do ADP) e o estado 4, utilizado como critério de integridade mitocondrial.

O quociente entre ADP adicionado e oxigênio consumido para fosforilar o ADP adicionado (ADP/O) foi calculado de acordo com Estabrook (Estabrook, 1967; Chance & Williams, 1956).

A taxa máxima de respiração mitocondrial dissociada de fosforilação (respiração desacoplada, indicada como vFCCP) foi determinada na presença de 1 μ M de carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenil-hidrazon (FCCP).

13. Avaliação da formação de espécies reativas de oxigênio

As ROS foram determinadas fluorometricamente utilizando um fluorômetro de leitor de placas Perkin-Elmer VICTOR 3, com um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 538 nm, correspondendo aos comprimentos de onda de excitação e emissão de H₂DCFDA (Zhou *et al.*, 2001). As mitocôndrias isoladas (1 mg/mL) foram suspensas em meio de reação (sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, KH₂PO₄ 5 mM, EDTA 50 mM, HEPES 5 mM (pH 7,4) e 3 μ M de rotenona) e incubadas com 50 μ M de H₂DCFDA (em DMSO) por 15 minutos a 25 °C. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 3 minutos e o sedimento resultante foi suspenso em meio (1 mL). 200 μ L da suspensão mitocondrial foram carregados numa placa de 96 poços e a fluorescência monitorizada. Após a medição da fluorescência basal, foi adicionada antimicina A (1 μ M) para bloquear o complexo III da cadeia mitocondrial, estimulando a formação de ROS. Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência relativa (RFUs).

14. Detecção da indução da permeabilidade transitória mitocondrial

A indução da permeabilidade transitória mitocondrial foi estimada por mudanças na dispersão da luz, como espectrofotometricamente monitorizado a 540 nm de acordo com a descrição de Palmeira & Wallace (1997). As experiências decorreram a 25 °C e foram iniciadas com a adição de 1 mg de suspensão mitocondrial a 2 mL de meio de reação (sacarose 200 mM, Tris-MOPS 10 mM, 1 mM KH₂PO₄, 10 μ M EGTA, pH 7,4) suplementado com 3 μ M de rotenona, 5 mM succinato). Após um breve período para o registro da absorbância basal, foi adicionado CaCl₂ e foram registadas as alterações resultantes na dispersão da luz. Foi realizado um ensaio de controlo com 1 μ M de ciclosporina A. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

15. Análise de proteínas por Western blotting

As amostras foram preparadas por lise com tampão de Leammi 2x concentrado e suplementado com β -mercaptoetanol a 5 % (Bio-Rad Laboratories), numa concentração final de 50 μ g/10 μ L. As proteínas (50 μ g de proteína por pista) foram separadas usando SDS-PAGE com um gel de 8 ou 15 % e subsequentemente transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) usando o sistema de transferência TransBlot Turbo (Bio-Rad Laboratories). Em seguida, as membranas foram bloqueadas com 5 % de solução de bloqueio (BioRad) durante 2 horas à temperatura ambiente e incubadas com anticorpos primários (Tabela 3) durante a noite, a 4 °C. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes durante 15 minutos com solução salina tamponada com Tris (TBS) – solução *Tween* a 0,5 % e incubadas com anticorpos secundários durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas 3 vezes durante 10 minutos com TBS - *Tween* a 0,5 % e incubadas com conjugado de estreptavidina substrato Qdot 625 (Thermo Fisher Scientific) durante 15 minutos. As membranas foram fotografadas utilizando o equipamento Bio-Rad DocTM EZ Imager e com a ajuda do programa Image Lab 4.1 Bio-Rad.

Tabela 3 – Lista de anticorpos primários usados para Western Blot.

Anticorpo	Fornecedor	Referência	Diluição	Espécie
COXIV	Mitosciences	MS406	1:1000	Murganho
LC3- I; LC3-II	Sigma	L7543	1:1000	Coelho
OPA1	Abcam	ab119685	1:1000	Murganho
p62	Santa Cruz Biotech	sc-28359	1:1000	Murganho
SIRT3	Cell Signaling	C73E3: 2627S	1:1000	Coelho
TFAM	Aviva Systems Biology	ARP36993-P050	1:1000	Coelho
TOM20	Santa Cruz Biotech	FL-145: sc-11415	1:1000	Coelho

16. Análise estatística

A distribuição de variáveis contínuas foi analisada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar desvios significativos da normalidade. As comparações entre os 4 grupos foram realizadas utilizando o teste não paramétrico, o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn's para comparações múltiplas. Foram utilizados, conforme

apropriado, testes de análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias, seguidos de teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos como médias \pm erros padrão da média (e.p.m), com auxílio do programa de GraphPad Prism®, versão 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). As diferenças foram consideradas significativas para valores de p inferiores a 0,05.

Capítulo IV – Resultados

1. Evolução do peso corporal

O peso corporal foi monitorizado durante as 23 semanas de tratamentos (Figura 21). Até às nove semanas de tratamento, foram registados valores semelhantes de peso corporal entre todos os grupos experimentais. Após a introdução da dieta hipercalórica, observou-se um ligeiro aumento do peso corporal nos animais do grupo HC e do grupo HC+M, comparativamente aos animais dos grupos Controlo e Mirtilo, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

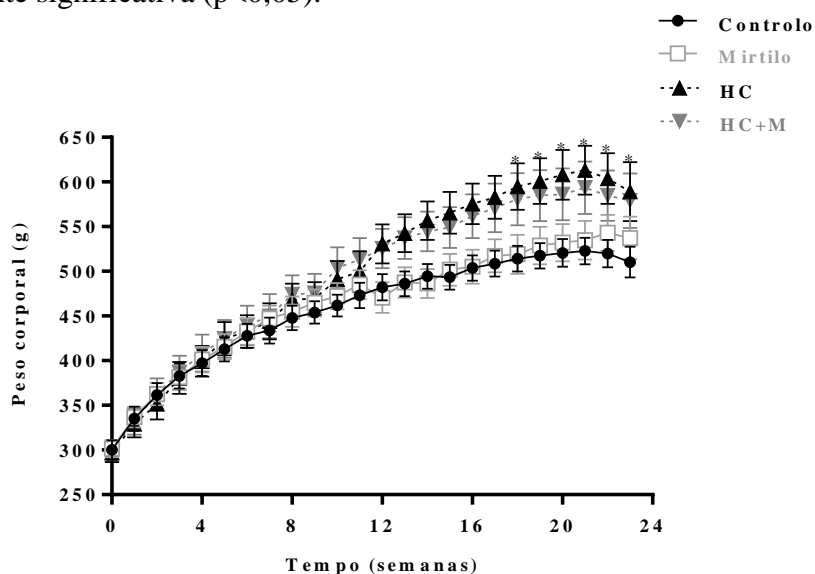


Figura 21 – Evolução do peso corporal dos ratos dos grupos em estudo: Controlo (n=8), Mirtilo (n=8), HC (n=10) e HC+M (n=10) ao longo das 23 semanas de tratamento. Os valores são expressos em média \pm e.p.m (* $p < 0,05$ vs Controlo).

2. Consumo calórico

O consumo acumulado de ração foi avaliado semanalmente, por gaiola, ao longo das 23 semanas de tratamento, e posteriormente estimado por rato (Figura 22 – A). Verificou-se um consumo de ração significativamente menor nos ratos dos grupos HC e HC+M, em comparação com o grupo Controlo ($p < 0,0001$) e Mirtilo ($p < 0,0001$). Contudo, os animais alimentados simultaneamente com a dieta hipercalórica e o sumo de mirtilo (HC+M) comeram significativamente mais que os animais alimentados apenas com a dieta hipercalórica (HC) ($p < 0,05$).

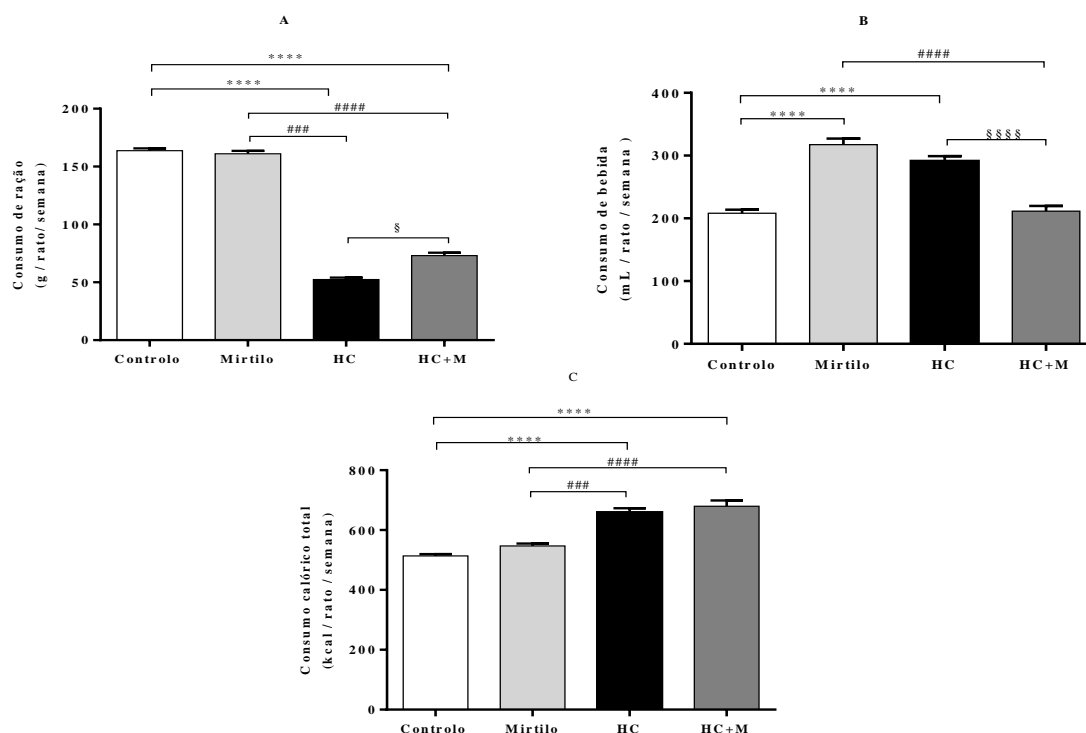


Figura 22 – Registos de consumo acumulado de ração (A) e de bebida (B) e cálculo do consumo calórico total (C) nos grupos Controlo, Mirtilo, HC e HC+M referente às 23 semanas de tratamento. Os valores são expressos em média \pm e.p.m. (n=8–10 por grupo; **** p<0,0001 vs Controlo; ### p<0,001; ##### p<0,0001 vs Mirtilo; § p<0,05; §§§§ p<0,0001 vs HC).

Por outro lado, no que diz respeito ao consumo acumulado de bebida (Figura 22 – B), verificou-se um valor significativamente maior nos ratos do grupo Mirtilo (que consumiam apenas a ração normal e sumo de mirtilo) e do grupo HC, comparativamente aos animais dos grupos Controlo (p<0,0001) e HC+M (p<0,0001).

No que diz respeito ao consumo calórico total (Figura 22 – C), os grupos HC e HC+M apresentaram um valor superior de ingestão calórica em comparação com os grupos Controlo (p<0,0001) e Mirtilo (p<0,0001/p<0,001).

3. Perfil glicémico

3.1. Teste de tolerância à glicose (TTG)

As concentrações iniciais de glicose foram semelhantes em todos os grupos (Figura 23 – A). O pico de glicose foi atingido decorridos 15 minutos para o grupo HC (502,44 \pm 21,49 mg/dL) e 30 minutos para os restantes grupos. Para os grupos HC e HC+M, o pico de glicose e a área sob a curva (AUC) do gráfico de glicose entre o tempo inicial e os 120 minutos foram significativamente superiores aos restantes grupos Controlo e Mirtilo (Figura 23 – B). Ainda assim, no grupo HC+M, a AUC foi significativamente menor (p<0,05) em relação ao

grupo HC, confirmando um grau de intolerância à glicose no grupo HC parcial, mas significativamente, prevenido no grupo HC+M.

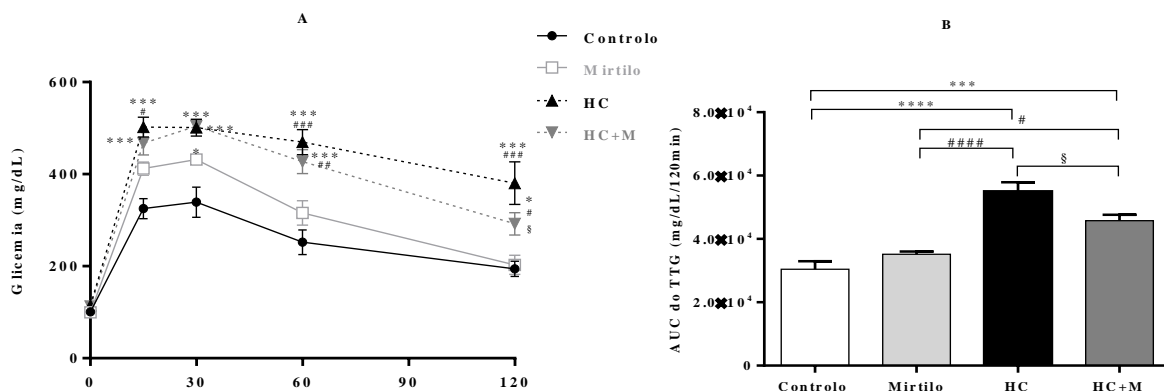


Figura 23 – Teste de tempo (minutos) tolerância à glicose (TTG): A– Evolução dos valores de glicose entre os 0 e os 120 minutos após injeção de uma solução de glicose (2 g/kg de peso corporal); B – Área sob a curva (AUC) da evolução da glicemia, nos grupos Controle, Mirtilo, HC e HC+M. Os dados são expressos em média \pm e.p.m (n=8–10 por grupo; * p<0,05, *** p<0,001, **** p<0,0001 vs Controle; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001, #### p<0,0001 vs Mirtilo; § p<0,05 vs HC).

3.2. Glicemia em jejum e glicemia pós-prandial

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na glicemia em jejum entre os grupos (Figura 24).

Em relação a glicemia em estado pós-prandial, observou-se um valor significativamente superior no grupo HC comparativamente aos restantes grupos (Figura 24). A adição do sumo de mirtilo ao grupo dos animais alimentados com a dieta hipercalórica (grupo HC+M), apresentou um efeito positivo nos valores de glicose no estado pós-prandial, observando-se uma diminuição significativa quando comparado com o grupo alimentado com a dieta hipercalórica sem sumo de mirtilo (grupo HC) (p<0,01).

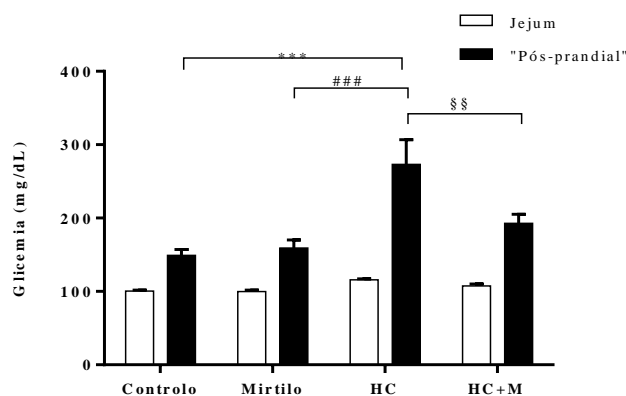


Figura 24 – Valores da glicemia em jejum e pós-prandial nos grupos Controle, Mirtilo, HC e HC+M, após 23 semanas de tratamento. Os dados são expressos em média \pm e.p.m (n=6–9; *** p<0,001 vs Controle; ### p<0,001 vs Mirtilo; §§ p<0,01 vs HC).

3.3. Hemoglobina glicada (HbA1c)

Os valores de HbA1c foram idênticos para os 4 grupos (Figura 25).

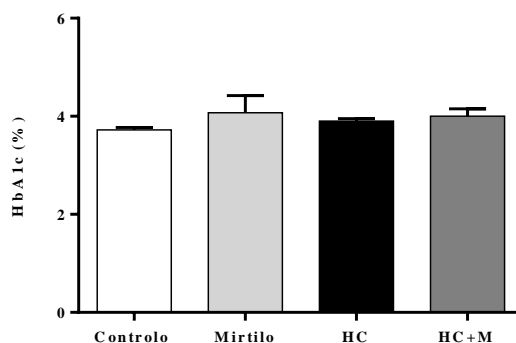


Figura 25 – Hemoglobina glicada (%) nos grupos Controlo (n=4), Mirtilo (n=4), HC (n=5) e HC+M (n=3), após 23 semanas de tratamento. Os dados são expressos em média \pm e.p.m.

4. Perfil insulínico

4.1. Teste de tolerância à insulina (TTI)

Com o intuito de avaliar os efeitos da dieta hipercalórica e do sumo de mirtilo na sensibilidade à insulina, fomos avaliar a resposta à insulina, através do teste de tolerância à insulina. As concentrações iniciais de glicose foram semelhantes nos grupos HC ($125,00 \pm 4,00$ mg/dL) e HC+M ($120,86 \pm 2,85$ mg/dL), e superiores aos grupos Controlo ($100,88 \pm 2,02$ mg/dL) e Mirtilo ($99,50 \pm 2,26$ mg/dL) (Figura 26 – A). Decorridos 45 minutos da injeção de insulina (0,75 U/kg de peso corporal), os níveis de glicose no grupo HC foram significativamente superiores comparativamente com o grupo Controlo ($79,44 \pm 4,99$ vs $59,13 \pm 2,30$ mg/dL; $p < 0,01$) e permanecem mais elevados no resto da experiência (Figura 26 – A). Após os 120 minutos, o grupo HC apresentou valores de glicose significativamente mais elevados que os grupos Controlo e Mirtilo (Figura 26 – A), confirmando uma diminuição da sensibilidade à insulina nestes animais alimentados com a dieta hipercalórica. Por outro lado, no grupo HC+M, após os 120 minutos, observou-se um valor de glicose significativamente inferior ao registado no grupo HC ($p < 0,01$), atingindo valores semelhantes aos do grupo Controlo e Mirtilo, sugerindo uma melhoria na sensibilidade à insulina.

Os valores da AUC do teste de tolerância à insulina (Figura 26 – B) confirmam a resistência à insulina no grupo alimentado com a dieta hipercalórica (HC), *versus* o grupo Controlo ($p < 0,0001$), e uma melhoria da tolerância à insulina no grupo HC+M ($p < 0,01$).

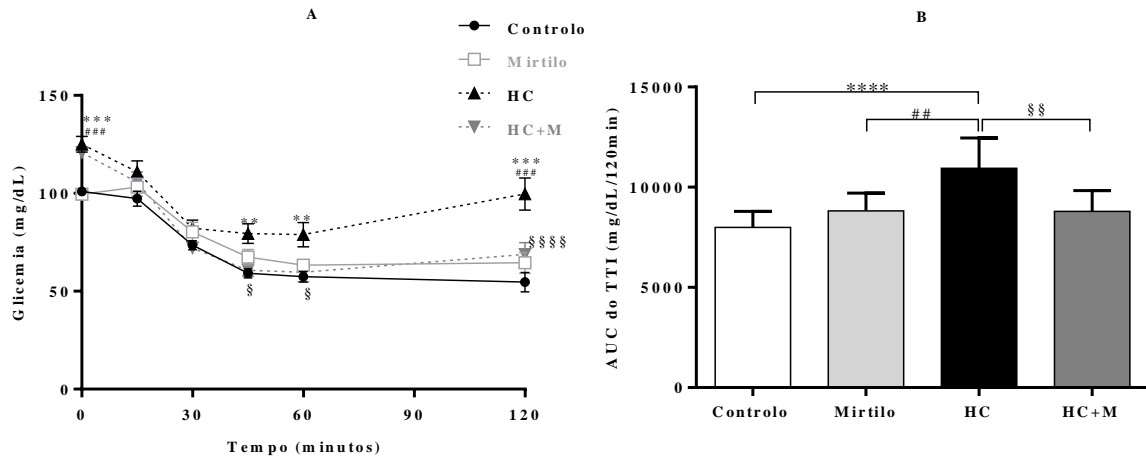


Figura 26 – Teste de tolerância à insulina (TTI): A – Evolução dos níveis de glicose entre 0 e 120 minutos após a injeção intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg de peso corporal); B – Área sob a curva (AUC) da evolução da glicemia, no Controlo, Mirtilo, HC e HC+M. Os dados são expressos em média ± e.p.m (n=8–10; ** p<0,01, *** p<0,001 vs Controlo; # p<0,05, ### p<0,001 vs Mirtilo; § p<0,05, §§§ p<0,001, §§§§ p<0,0001 vs HC).

4.2. Níveis séricos de insulina

Em relação aos valores de insulina sérica em jejum, embora se destaque uma tendência para aumentos nos grupos HC e HC+M, não se verificam diferenças significativas entre os 4 grupos. No entanto, no estado pós-prandial foi observado um valor significativamente superior de insulina no grupo HC, quando comparado com o grupo Controlo (p<0,05), elevação essa que foi tendencialmente, ainda que não estatisticamente, prevenida no grupo HC+M (Figura 27).

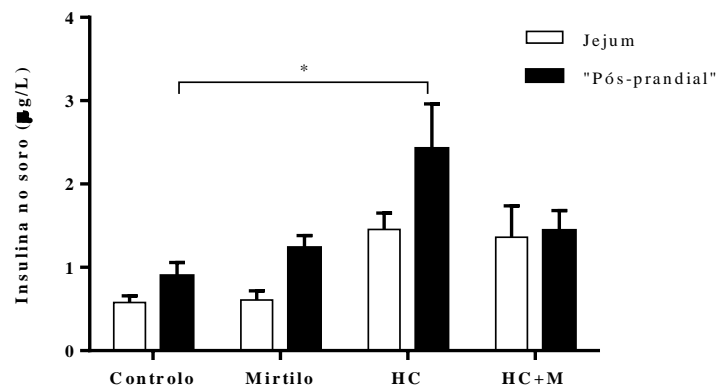


Figura 27 – Níveis séricos de insulina em jejum e no estado pós-prandial, após 23 semanas de tratamento, nos grupos em estudo: Controlo, Mirtilo, HC e HC+M. Os dados são expressos em média ± e.p.m. (n=4–7; * p<0,05 vs Controlo).

5. Parâmetros bioquímicos

5.1. Concentração sérica de triglicerídeos

Relativamente aos valores séricos de TGs no estado pós-prandial, verificaram-se concentrações significativamente superiores no grupo HC ($182,33 \pm 20,33$ mg/dL) comparativamente ao grupo Controlo ($103,20 \pm 5,52$ mg/dL; $p < 0,05$), esse efeito foi prevenido pelo consumo de sumo de mirtilo no grupo HC+M que apresentou valores de TGs significativamente inferiores ($86,29 \pm 9,97$ mg/dL) comparativamente aos grupos HC ($182,33 \pm 20,33$ mg/dL; $p < 0,001$) e Mirtilo ($153,13 \pm 16,09$ mg/dL; $p < 0,05$) (Figura 28).

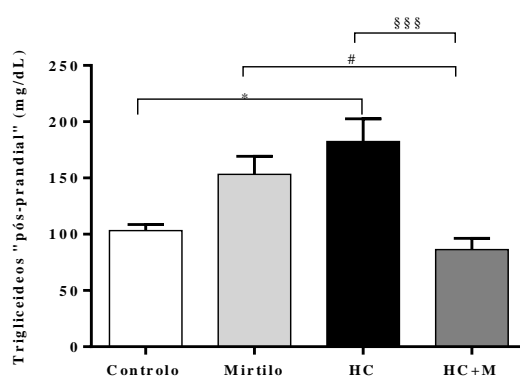


Figura 28 – Níveis séricos de triglicerídeos nos grupos Controlo (n=5), Mirtilo (n=8), HC (n=6) e HC+M (n=7). Os dados são expressos em média \pm e.p.m. (* $p < 0,05$ vs Controlo; # $p < 0,05$ vs Mirtilo; §§§ $p < 0,001$ vs HC).

5.2. Concentração sérica de colesterol

Não se observam diferenças entre os grupos relativamente à concentração sérica de colesterol total (Figura 29).

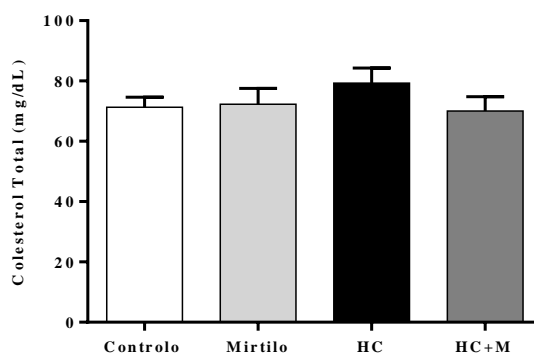


Figura 29 – Valores séricos de colesterol total dos grupos Controlo, Mirtilos, HC e HC+M após 23 semanas de tratamento. Os resultados são expressos em média \pm e.p.m. (n=8 por grupo).

5.3. Atividade das enzimas hepáticas

Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos na atividade da AST (Figura 30 – A). Em relação à atividade da ALT, verificou-se um valor inferior no grupo de animais alimentados com a ração hipercalórica, em comparação com o grupo Mirtilo ($p < 0,05$), sem outras alterações entre os 4 grupos (Figura 30 – B).

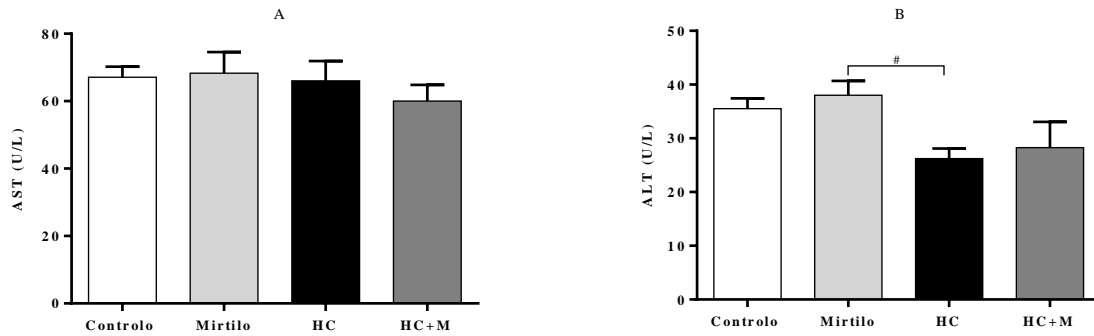


Figura 30 – Atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) (A) e alanina aminotransferase (ALT) (B) nos grupos Controlo, Mirtilo, HC e HC+M após 23 semanas de tratamento. Os resultados são expressos em média \pm e.p.m. ($n=8-10$ por grupo; # $p < 0,05$ vs Mirtilo).

6. Equilíbrio oxidativo

6.1. Peroxidação lipídica no soro

As concentrações de malondialdeído (MDA) foram avaliadas no soro recolhido no dia do sacrifício dos animais, após 23 semanas de estudo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, apenas se registando uma tendência para valores inferiores nos ratos do grupo HC+M (Figura 31).

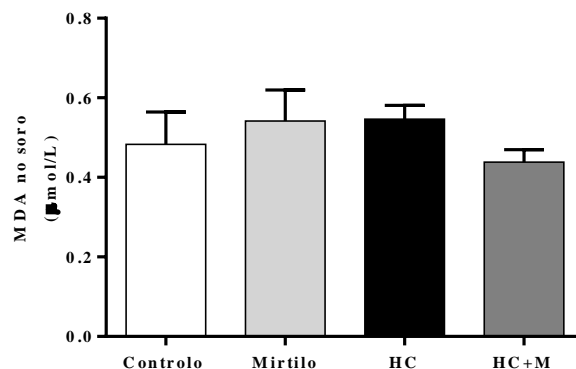


Figura 31 – Concentração sérica de MDA nos grupos Controlo, Mirtilo, HC e HC+M, após 23 semanas de tratamento. Os resultados são expressos em média \pm e.p.m. ($n=6-8$ por grupo).

6.2. Capacidade antioxidante total (TAS) no soro

A capacidade antioxidante total no soro foi significativamente mais elevada no grupo dos animais que beberam apenas o sumo de mirtilo, quando comparada com os valores obtidos nos restantes grupos: Controlo ($p < 0,05$), HC ($p < 0,001$) e HC+M ($p < 0,01$) (Figura 32).

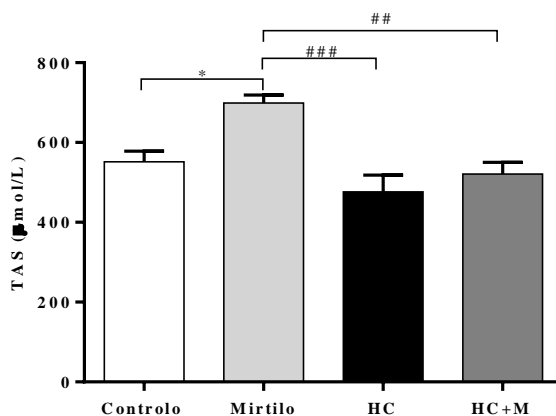


Figura 32 – Capacidade antioxidante total (TAS) no soro nos grupos Controlo, Mirtilo, HC e HC+M ($n=6-8$ por grupo), após 23 semanas de tratamento. Os resultados são expressos em média \pm e.p.m. (* $p < 0,05$ vs Controlo; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs Mirtilo).

6.2.1. Razão MDA/TAS no soro

Em função dos valores de MDA e TAS, verificou-se um aumento significativo na razão MDA/TAS, um marcador de estado oxidativo, no soro dos animais alimentados com a dieta hipercalórica (HC), comparativamente com o grupo de animais que consumiu Mirtilo, não sendo estatisticamente diferente em comparação ao grupo Controlo. Por outro lado, o grupo de animais alimentados com a dieta HC+M reduziu significativamente este parâmetro comparativamente ao grupo com dieta HC (Figura 33).

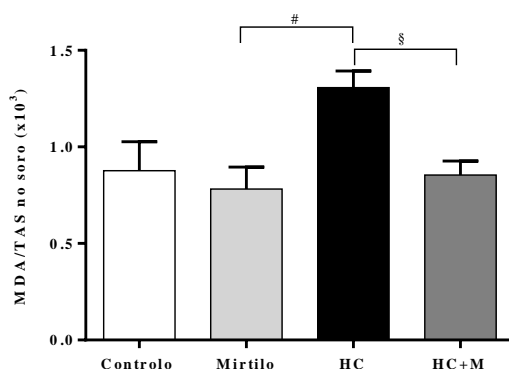


Figura 33 – Razão MDA/TAS no soro nos grupos Controlo, Mirtilo, HC e HC+M, após 23 semanas de tratamento. Os resultados são expressos em média \pm e.p.m. ($n=6-8$ por grupo; # $p < 0,05$ vs Mirtilo; § $p < 0,05$ vs HC).

7. Análise do tecido hepático

7.1. Pesos do fígado e características macroscópicas

No dia do sacrifício dos animais, o fígado foi imediatamente retirado e pesado. Visualmente (macroscopicamente) já se observavam algumas possíveis diferenças entre os grupos (Figura 34) que se confirmaram quando pesados, constatando-se um valor significativamente superior do peso do fígado no grupo HC comparativamente ao Controlo (Tabela 4). Quando avaliado o peso em relação ao peso corporal do animal (peso relativo) verificou-se uma diminuição do peso no grupo HC+M comparativamente ao grupo HC.

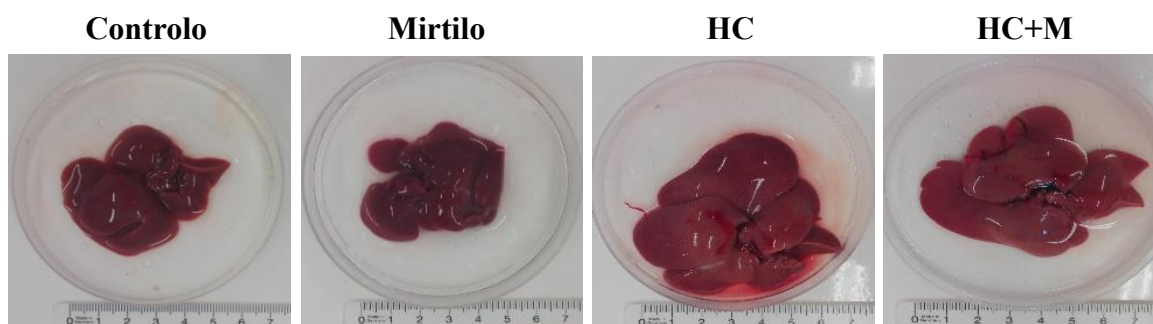


Figura 34 – Fotografias representativas do fígado dos grupos de animais em estudo, após 23 semanas de tratamento.

Tabela 4 – Peso absoluto e peso relativo dos fígados dos animais em estudo, após 23 semanas de tratamento.

Peso absoluto e peso relativo	Controlo (n = 8)	Mirtilo (n = 8)	HC (n = 10)	HC+M (n = 10)
Fígado (g)	13,06 ± 0,40	14,28 ± 0,69	16,82 ± 1,00*	14,25 ± 0,82
Fígado/PC (g/kg)	25,75 ± 0,57	26,85 ± 0,55	28,84 ± 1,31	24,24 ± 0,72 §§

Os dados são expressos em média ± e.p.m. (* p<0,05 vs Controlo; §§ p<0,01 vs HC).

7.2. Histologia hepática

Visualmente (macroscopicamente) já se observavam algumas possíveis diferenças de histologia hepática entre os grupos, que se confirmaram após a realização da coloração com H&E. Com efeito, os animais do grupo HC apresentaram focos de esteatose hepática e histologia característica de deposição de gordura nos hepatócitos. Este efeito foi claramente prevenido no grupo HC+M (Figura 35).

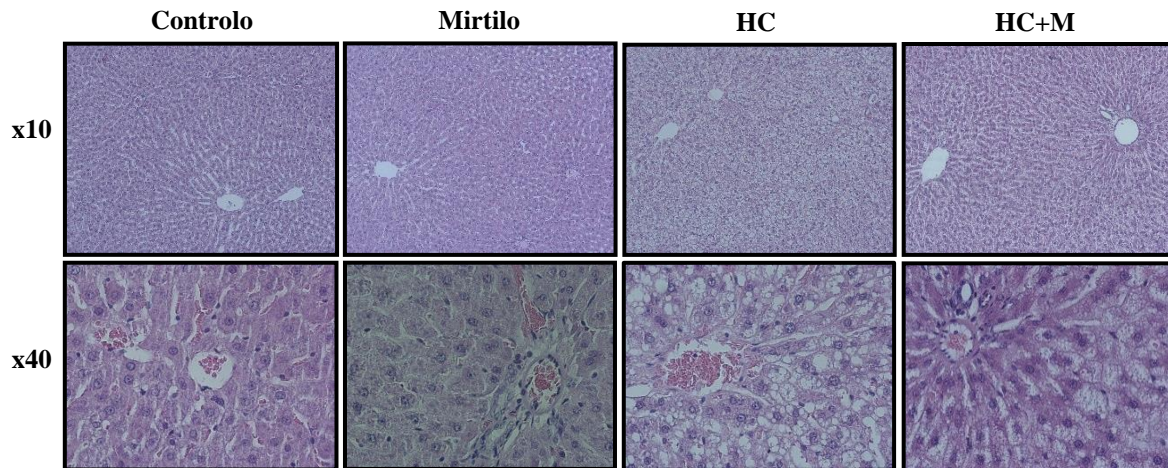


Figura 35 – Microscopia óptica da histologia hepática de animais do grupo Controlo, Mirtilo, HC e HC+M, após 23 semanas de tratamento, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) (Ampliação: 10x e 40x).

8. Bioenergética mitocondrial

8.1. Potencial transmembranar mitocondrial $\Delta\Psi_m$

Com a finalidade de elucidar as alterações no metabolismo energético mitocondrial foram analisadas as flutuações do $\Delta\Psi_m$ (Figura 36), associadas à respiração e ao ciclo fosforilativo, em mitocôndrias isoladas do fígado de animais do grupo Controlo, Mirtilo, HC e HC+M. Após 23 semanas de tratamento os resultados demonstram que o $\Delta\Psi_m$ desenvolvido na presença de succinato como substrato respiratório é significativamente menor nos animais dos grupos Mirtilo e HC, comparativamente com os dos grupos Controlo e HC+M (Tabela 5).

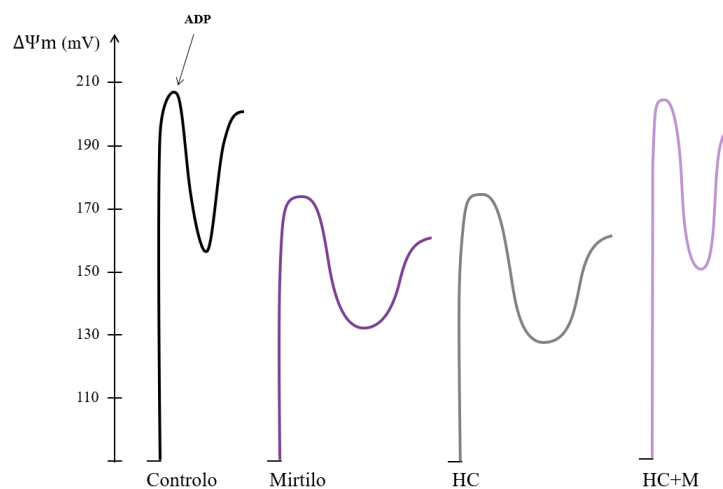


Figura 36 – Visualização do potencial transmembranar mitocondrial no grupo Controlo, Mirtilo, HC e HC+M após 23 semanas de tratamento.

Tabela 5 – Potencial transmembranar ($\Delta\Psi_m$) e *lag-phase* mitocondriais nos grupos Controlo, Mirtilo, HC e HC+M após 23 semanas de tratamento.

Parâmetros	Controlo (n=7)	Mirtilo (n=7)	HC (n=7)	HC+M (n=7)
Potencial Inicial (mV)	208,40 ± 1,66	175,43 ± 0,99 **	175,89 ± 1,55 *	207,53 ± 2,30 ## §
Repolarização (mV)	202,97 ± 1,02	162,04 ± 0,77 **	162,39 ± 1,56 ***	196,83 ± 2,42 §
Lag phase (s)	53,69 ± 1,04	107,89 ± 1,85 *	108,36 ± 1,393 *	53,07 ± 1,59 ## §§

Os dados são expressos em média ± e.p.m. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs Controlo; ## p<0,01 vs Mirtilo; § p<0,05, §§ p<0,01 vs HC). Os ensaios foram realizados em duplicado. As mitocôndrias foram energizadas com succinato.

A repolarização, que expressa a capacidade de recuperação do valor inicial de $\Delta\Psi_m$ e ocorre quando o ciclo fosforilativo é completado, encontrava-se também diminuída nos animais dos grupos Mirtilo e HC.

A *lag-phase*, que corresponde ao tempo de espera que precede a repolarização, um parâmetro indicativo da atividade do sistema fosforilativo, revelou-se superior nos animais dos grupos Mirtilo e HC.

8.2. Respiração mitocondrial

As possíveis alterações na cadeia respiratória e no sistema fosforilativo foram avaliadas através da respiração mitocondrial em estado 3 e em estado 4, o ICR e o acoplamento da fosforilação oxidativa (ADP/O), avaliada na presença de succinato como substrato respiratório. Os resultados encontram-se expressos na Tabela 6.

Tabela 6 – Respiração mitocondrial nos grupos Controlo, Mirtilo, HC e HC+M após 23 semanas de tratamento.

Parâmetros	Controlo (n=7)	Mirtilo (n=7)	HC (n=7)	HC+M (n=7)
Estado 3 (natoms O/min/mg proteína)	108,30 ± 0,57	66,36 ± 0,74 *	65,20 ± 0,80 **	107,01 ± 1,97 # §§
Estado 4 (natoms O/min/mg proteína)	17,81 ± 0,19	20,90 ± 0,16	21,19 ± 0,32 *	17,19 ± 0,21 ## §§§
ICR	6,09 ± 0,07	3,16 ± 0,05 *	3,09 ± 0,03 **	6,03 ± 0,07 # §§
ADP/O	1,89 ± 0,05	1,51 ± 0,03 *	1,43 ± 0,04 ***	1,81 ± 0,04 §§
V FCCP (natoms O/min/mg proteína)	128,89 ± 1,44	85,39 ± 1,08 **	83,64 ± 1,79 **	128,14 ± 1,29 # §§

Os resultados são expressos em média ± e.p.m. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs Controlo; # p<0,05, ## p<0,01 vs Mirtilo; §§ p<0,01, §§§ p<0,001 vs HC). Os ensaios foram realizados em duplicado. As mitocôndrias foram energizadas com succinato.

Após 23 semanas de tratamento, o estado 3 respiratório revelou-se inferior nos animais Mirtilo e HC, quando comparado com os dos ratos Controlo e HC+M, enquanto que o estado 4 foi superior nestes mesmos animais (grupos Mirtilo e HC). Consequentemente, os valores de ICR foram significativamente inferiores nos animais Mirtilo e HC quando comparados com os dos grupos Controlo e HC+M.

O acoplamento entre a utilização de oxigénio pela cadeia respiratória ao nível da citocromo c oxidase e o ADP fosforilado pela ATPsintase foi determinado calculando o quociente ADP/O. A acumulação de gordura hepática induziu alterações estatisticamente significativas a nível do valor de ADP/O nos grupos Mirtilo e HC, revelando a existência de um menor acoplamento entre oxidação e fosforilação.

A estimulação da respiração mitocondrial em condições não fosforilativas com o desacoplador FCCP, na presença de succinato como substrato respiratório, revelou algumas diferenças estatisticamente significativas, verificando-se uma redução nos animais dos grupos Mirtilo e HC, quando comparando com os Controlo e HC+M.

8.3. Indução da permeabilidade transitória mitocondrial

A suscetibilidade das mitocôndrias hepáticas à indução da permeabilidade transitória mitocondrial (PTM) foi avaliada determinando o entumescimento mitocondrial induzido pela acumulação de cálcio nas mitocôndrias (Figura 37). As mitocôndrias possuem uma capacidade finita para acumularem cálcio antes de ocorrer a indução do poro de permeabilidade transitória. As mitocôndrias isoladas do fígado de animais do grupo HC+M revelam melhor capacidade de homeostase mitocondrial de cálcio, quando comparadas com mitocôndrias de animais do grupo Controlo. Já o grupo HC verificou-se uma pior capacidade de homeostase mitocondrial. A pré-incubação com ciclosporina A (CyA), um inibidor específico da PTM (Broekemeier *et al.*, 1989), capacitou a população mitocondrial para acumular e reter o cálcio adicionado, indicando que o entumescimento mitocondrial era resultado da indução da PTM.

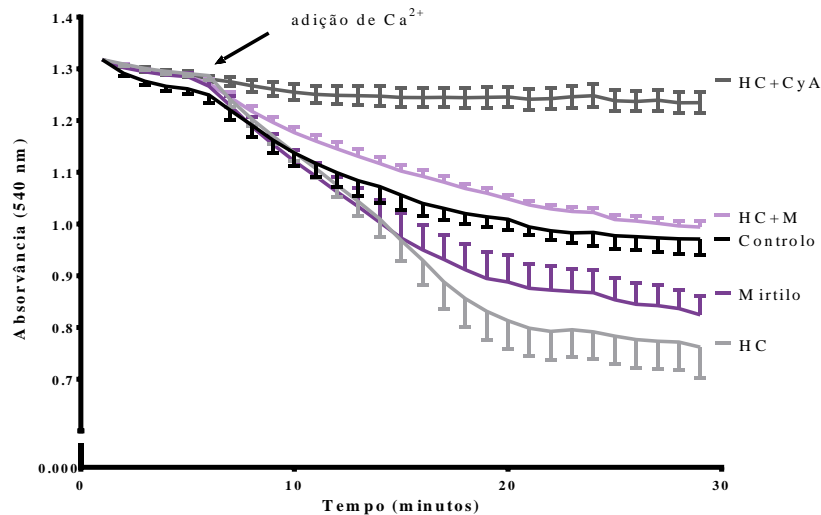


Figura 37 – Suscetibilidade à indução da permeabilidade transitória mitocondrial nos grupos Controlo, Mirtilo, HC e HC+M (n=7), após 23 semanas de tratamento. Os dados são expressos em média ± e.p.m.

8.4. Formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS)

Ao analisar as ROS no nível basal, observou-se uma diminuição da fluorescência nos grupos Controlo ($1086,55 \pm 173,31$ URF (unidades relativas de fluorescência)/dia), HC ($1112,46 \pm 105,347$ URF/dia) e HC+M ($1086,67 \pm 64,24$ URF/dia), comparativamente ao grupo Mirtilo ($1251,64 \pm 76,55$ URF/dia) (Figura 38 – A).

Com a adição da antimicina A houve um aumento da fluorescência nos grupos Controlo ($1605,67 \pm 255,25$ URF/dia), Mirtilo ($1641,87 \pm 148,97$ URF/dia) e HC ($1583,97 \pm 185,85$ URF/dia), comparando com o grupo HC+M ($1314,16 \pm 152,52$ URF/dia) (Figura 38 – B).

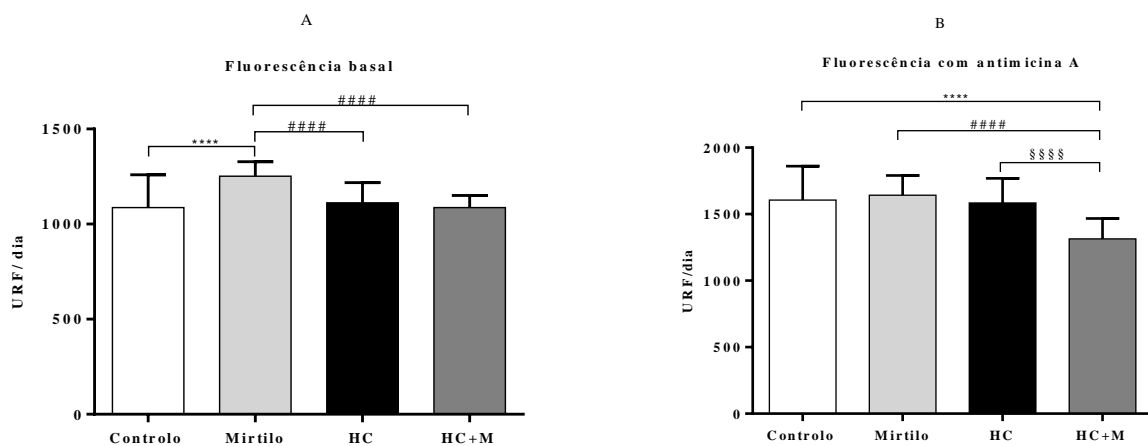


Figura 38 – Fluorescência mitocondrial no estado basal (A) e com antimicina A (B) no grupo Controlo, Mirtilo, HCe HC+M (n=7), após 23 semanas de tratamento. Os resultados são expressos em média ± e.p.m.; **** p<0,0001 vs Controlo; ##### p<0,0001, HC vs Mirtilo; §§§§ p<0,0001 vs HC.

8.5. Conteúdo em proteínas mitocondriais

Atendendo a que a análise da bioenergética mitocondrial sugeriu alterações no sistema fosforilativo de mitocôndrias hepáticas isoladas do grupo de animais com dieta HC e Mirtilo, e que se verificou um efeito protetor quando adicionamos à dieta hipercalórica os mirtilos, existindo uma evidente melhoria nos animais tratados em simultâneo com a dieta hipercalórica e sumo de mirtilo, decidiu-se analisar os níveis de expressão das seguintes proteínas mitocondriais: COX IV, LC3-I e LC3-II, OPA1, p62, SirT3, TFAM e TOM20 (Figura 39).

No grupo de animais alimentados com a dieta HC+M observou-se um aumento significativo da expressão de COX IV (Figura 40), uma proteína responsável pela regulação do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial, comparativamente aos restantes grupos ($p < 0,05$).

Apesar de não existirem diferenças significativas, constatou-se um perfil distinto de LC3II/LC3I e SirT3 para alguns dos grupos, com um aumento tendencial no grupo HC+M relativamente aos restantes grupos. Já em relação à OPA1, foi observada uma expressão tendencialmente superior no grupo HC comparativamente aos restantes, o contrário acontecendo relativamente à p62, com níveis inferiores no grupo HC. Já em relação à expressão de TFAM, constatou-se uma reduzida expressão em ambos os grupos.

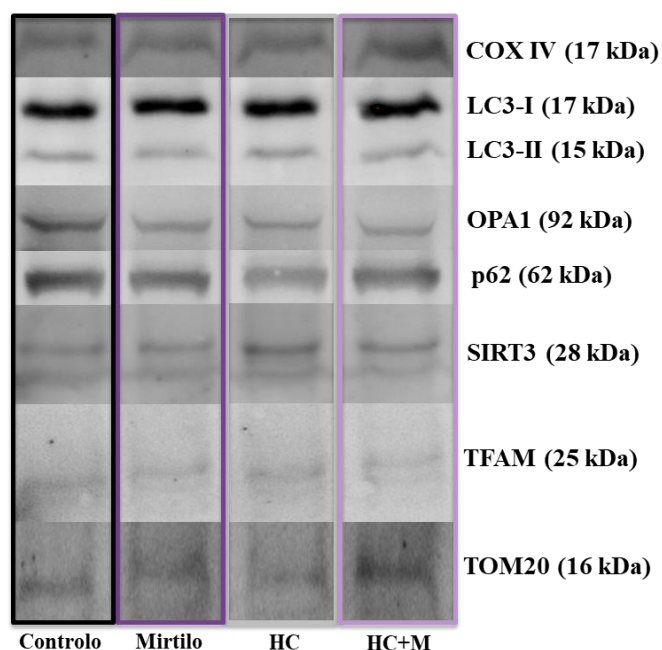


Figura 39 – Visualização do conteúdo mitocondrial em COX IV, LC3-I e LC3-II, OPA1, p62, SIRT3, TFAM e TOM20, no grupo Controlo, Mirtilo, HC e HC+M (n=4), após 23 semanas de tratamento.

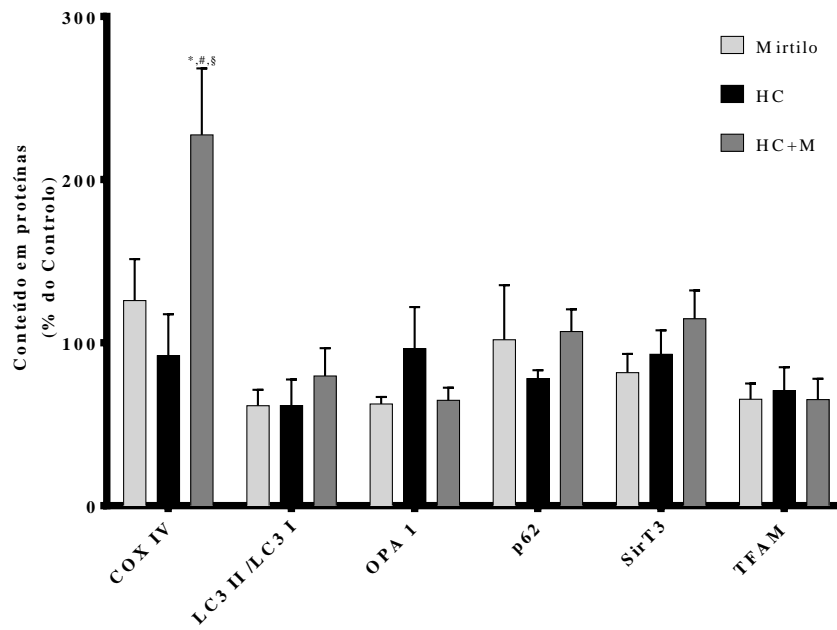


Figura 40 – Níveis de expressão de proteínas mitocondriais: COX IV, LC3-I e LC3-II, OPA1, p62, SIRT3 e TFAM, no grupo Controle, Mirtilo HC e HC+M, após 23 semanas de tratamento. Os resultados são expressos em média \pm e.p.m. (n=2–8 por grupo; * p<0,05 vs Controle; # p<0,05 vs Mirtilo; § p<0,05 vs grupo HC).

Capítulo V – Discussão e Conclusões

1. Discussão

A definição mais comum da pré-diabetes refere-se à TDG e/ou à AGJ, que foram estabelecidas para definir categorias de glicemia associadas a um risco aumentado de desenvolvimento de DMT2 (Buysschaert & Bergman, 2011). Na fase da pré-diabetes, a doença é quase assintomática, dificultando assim o seu diagnóstico, no entanto, muitas das graves complicações associadas à doença já estão em desenvolvimento nesta fase. Assim, são necessárias medidas adicionais para prevenir a sua evolução, sendo que quanto mais precoce for a detecção e intervenção maior a probabilidade de se conseguir retardar, ou até evitar, a progressão para estados mais avançados da doença, com consequências (e complicações) mais gravosas.

Para elucidar se já existem alterações e se estas são coerentes com a fase da pré-diabetes, bem como esclarecer os mecanismos subjacentes, é crucial escolher um modelo animal que apresente alterações metabólicas que mimetizem esta condição inicial da patologia em seres humanos pré-diabéticos (Pagliassotti *et al.*, 1996; Podolin *et al.*, 1998). Neste trabalho, escolhemos como modelo de pré-diabetes, o rato Wistar alimentado com uma ração padrão suplementada com uma solução de elevado teor de sacarose (HSu, 35 %) na água durante 9 semanas, tendo por base estudos anteriores do nosso e de outros grupos (Nunes *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2005; Conde *et al.*, 2011), que descrevem que estes animais desenvolvem resistência à insulina associada com intolerância à glicose, mas com normoglicemia em jejum, sem alterações no peso corporal e na pressão arterial.

O estilo de vida que a população em geral vem gradualmente a adotar, em que o excessivo consumo de grandes quantidades de açúcares simples em refrigerantes é apenas um exemplo, está associado a um aumento do risco de desenvolvimento de DMT2 (Hu, 2013; Malik *et al.*, 2010). Este comportamento alimentar é uma das principais causas do aumento acelerado da prevalência da resistência insulina, da DMT2 e das complicações associadas. Além disso, o frequente consumo de dietas hipercalóricas, ricas em lípidos, está associado ao desenvolvimento de obesidade, aumento dos níveis de insulina em jejum, hepatoesteatose e redução da tolerância oral à glicose (Siersbaek *et al.*, 2017; Takamoto *et al.*, 2014), sem aumento da glicemia em jejum (Lau *et al.*, 2009). Tendo por base estas evidências, e de forma a agravar o estado de pré-diabetes após as 9 semanas de tratamento com HSu, adicionámos uma dieta rica em gordura (60 % de calorias proveniente de lípidos)

durante 14 semanas, para estudar os mecanismos associados a esta evolução e o possível efeito protetor do sumo de mirtilo.

Do ponto de vista nutricional, uma dieta humana de 60 % de kcal de gordura seria considerada extrema em humanos, mas estas são comumente utilizadas para induzir de forma mais rápida alterações metabólicas em roedores, a fim de reduzir os tempos experimentais (Ghibaudi *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2007). Esta dieta está associada ao aumento do peso corporal, deposição de gordura em vários órgãos e desenvolvimento de resistência à insulina em modelos animais. Antes que ocorram aumentos significativos na deposição de gordura periférica, a dieta hiperlipídica tipicamente aumenta os níveis de gordura hepática, assim como a resistência à insulina hepática, o que normalmente acontece no decorrer de poucos dias ou semanas (Samuel *et al.*, 2004). Estudos anteriores empregaram este tipo de dieta rica em gordura em modelos animais, nomeadamente em ratos GK, para induzir resistência à insulina e promover o desenvolvimento da diabetes (Takamoto *et al.*, 2008). As dietas hiperlipídicas têm demonstrado induzir uma desregulação da expressão génica hepática com perturbações nas vias lipídica, inflamatória e oxidativa (Radonjic *et al.*, 2009). Sabe-se que o fígado é um órgão crítico para a regulação da homeostase energética do corpo devido ao seu papel central no metabolismo lipídico e glicídico. A prevalência de DFGNA está a aumentar em paralelo com a epidemia de obesidade e a resistência à insulina, frequentemente devido às dietas ligadas ao estilo de vida ocidental (Smith & Adams, 2011; Tiniakos, 2010). A esteatose hepática é uma consequência bem reconhecida da diabetes, onde assume a forma de DFGNA, com uma frequência relatada de 40 – 70 % (Levinthal & Tavill, 1999). A DFGNA é caracterizada pela acumulação de lípidos, sensibilizando o fígado para mais danos induzidos por stresse oxidativo, inflamação e fibrose (Day & James, 1998; Day, 2002). A acumulação de gordura hepática pode derivar do aumento da ingestão de lípidos na dieta, aumento da síntese de lípidos (lipogénese de novo) e/ou diminuição da oxidação. Além disso, a obesidade e os estados de DMT2 podem associar-se ao aumento da captação de AGL do TA para tecidos não-adiposos, como o fígado (Day, 2002; Bechmann *et al.*, 2012). A esteatose hepática tem graves consequências, especialmente ao nível da mitocôndria, organelo celular responsável pela produção de cerca de 90 % de ATP consumida na célula eucariótica, com um papel central no metabolismo lipídico, sendo visto como um bom modelo para estudar, entre outros aspetos, os efeitos de alimentos a nível do tecido (Nicholls, 1982).

Os tipos de alimentos que ingerimos são importantes para a manutenção de um peso corporal saudável (Boeing *et al.*, 2012) prevenindo a obesidade e a DFGNA. O aumento do consumo de frutas é uma estratégia lógica para aumentar a ingestão de antioxidantes e reduzir o stresse oxidativo. O consumo de frutas e vegetais, ricas em polifenóis, nomeadamente antocianinas, com forte atividade antioxidante e anti-inflamatória, são recomendadas para prevenir o desenvolvimento de doenças metabólicas (Skates *et al.*, 2018; Noratto *et al.*, 2015; Noratto *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018). O mirtilo, por exemplo, tem sido usado na produção de chás para o tratamento da DMT2 na medicina tradicional devido às suas propriedades protetoras de diversos sistemas, incluindo os microvasculares e macrovasculares (Valentová *et al.*, 2007; Bao *et al.*, 2008). Tendo em conta estas evidências, e com o objetivo de perceber o papel do mirtilo na prevenção do efeito de uma dieta hipercalórica em induzir um estado avançado de pré-diabetes, decidimos usar uma intervenção nutracêutica para a prevenção da evolução do estado pré-diabético utilizando sumo de mirtilo numa dose de 25 g/kg de peso corporal/dia.

Em relação à caracterização metabólica do modelo animal de estado avançado de pré-diabetes, avaliámos a evolução do peso corporal, o perfil de glicemia e insulina em jejum e no estado pós-prandial, a tolerância à glicose, a sensibilidade e resistência à insulina, para além do perfil lipídico.

O peso corporal dos animais manteve-se igual até às 9 semanas, nos dois grupos: grupo Controlo (mantido em dieta normal) e grupo HSu (que ingeriu na bebida uma solução de açucarada com 35 % de sacarose). Estes dados corroboram estudos anteriores do nosso grupo, os quais mostraram que os animais submetidos a este regime não desenvolvem obesidade (Nunes *et al.*, 2013; Burgeiro *et al.*, 2017). Após introdução da dieta hipercalórica, das 9 às 23 semanas, houve um distanciamento do peso corporal nos grupos HC e HC+M relativamente aos grupos Controlo e Mirtilo, resultado da dieta gorda e/ou da preferência dos animais pela bebida adocicada. O nosso modelo de pré-diabetes induzido por uma dieta hipercalórica apresentou um aumento de peso corporal que resulta do aumento do aporte calórico, apesar da diminuição significativa da ingestão de alimentos (ração). Isto é, parece haver uma preferência dos ratos pela bebida doce, levando-os a preferir a água com sacarose em vez da ração; contudo, mesmo ingerindo menos ração que os animais dos grupos Controlo e Mirtilo, o facto da dieta ser hipercalórica faz com que o aporte calórico total seja superior no grupo HC do que nos outros grupos. No grupo HC+M, contrariamente ao grupo HC, os animais preferiram a ração e beberam significativamente menos, mas o aporte calórico foi equiparado ao grupo HC, pois existiu uma compensação relativa entre a

quantidade de nutrientes, com aumento do consumo de lípidos e redução de hidratos de carbono. Relativamente ao grupo de ratos tratados com sumo de Mirtilo, verificou-se um consumo equiparado de ração em relação aos controlos, apesar de beberem significativamente mais, o aporte calórico foi equiparado ao grupo controlo, não se observando diferenças no peso corporal destes animais ao longo do estudo. De facto, o sumo de mirtilo apresenta um valor energético relativamente baixo, de cerca de 57 kcal/100 g de fruto.

Sugere-se que o teor de proteína na dieta é um fator determinante do ganho de peso durante a alimentação *ad libitum* (Galgani & Ravussin, 2009). O modelo animal pré-diabético apresentou uma redução da ingestão de proteína e aumentou a ingestão de líquidos (água açucarada), em concordância com estudos prévios (M Brownlee, 2001). Isso significa que os animais tratados com dieta HC ingeriram uma quantidade menor de proteína e uma quantidade maior de lípidos e hidratos de carbono, o que pode ser traduzido por maior massa gorda e menor massa magra, contribuindo para o aumento do peso corporal. A adição de sumo de mirtilo à dieta HC não originou uma diminuição significativa no peso corporal, mas retardou o excesso de peso. De fato, mesmo no grupo com dieta normal que consumiu apenas o sumo de mirtilo (grupo Mirtilo), não foram observadas diferenças no peso corporal quando comparado com o grupo Controlo. Em outros estudos, em ratos obesos, a adição de mirtilos à dieta originou uma diminuição do ganho de peso corporal, associada a aumento da sensibilidade à insulina e redução da acumulação de lípidos no fígado (Roopchand *et al.*, 2013; Vuong *et al.*, 2009; Hoggard *et al.*, 2013). Outros investigadores demonstraram igualmente um aumento da sensibilidade à insulina após o consumo de mirtilo, mas sem impacto no ganho de peso corporal e na adiposidade, em roedores obesos (DeFuria *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2014; Takikawa *et al.*, 2010). Para estudar o efeito dos polifenóis dos mirtilos, foram realizados estudos em que os autores demonstraram que o sumo de mirtilo da cultivar *Lowbush* (biotransformado com bactéria *S.vaccini*), incorporado na água de beber de murganhos KKAy durante 3 semanas, reduziu significativamente o ganho de peso nos ratos. Além disso, o sumo protegeu os murganhos do desenvolvimento de intolerância à glicose e diabetes. Esses resultados mostraram que o sumo de mirtilo biotrasformado possuía potencial antidiabético num modelo *in vivo* (Vuong *et al.*, 2009). Um outro estudo corrobora a ideia de uma dieta gorda suplementada com antocianinas purificadas de mirtilo inibe a obesidade induzida por dieta e restaurava a função das células β (Prior *et al.*, 2010). Outro estudo verificou que a adição de diferentes bagas (groselha e mirtilo) às dietas ricas em gordura prevenia o desenvolvimento de obesidade e fígado gordo em murganhos C57BL/6,

com redução de cerca de 10 % do peso corporal, relativamente ao controlo (Heyman *et al.*, 2014). Estas diferenças entre os estudos podem estar relacionadas com o tipo de dieta, o modelo animal experimental (rato ou murganho), a cultivar de mirtilos e a forma de administração utilizada. Em estudos envolvendo humanos, o peso corporal e a composição de gordura foram explorados como medidas secundárias e a ingestão de mirtilo durante 6 a 8 semanas não alterou a composição corporal em indivíduos obesos (Stull *et al.*, 2010; Basu *et al.*, 2010; Stull *et al.*, 2015).

Em relação ao perfil glicémico, antes do dia do sacrifício os animais foram submetidos ao teste tolerância à glicose (TTG). Verificou-se que a adição de uma dieta hipercalórica (HC) originou uma redução da tolerância à glicose, já que a recuperação dos valores de glicemia para níveis basais foi mais lenta do que a verificada nos animais Controlo e Mirtilo. O grupo de dieta hipercalórica com sumo de mirtilo (HC+M) resultou numa melhor recuperação dos valores de glicemia do que no grupo HC, o que sugere uma proteção relacionada com uma melhoria da tolerância à glicose, ainda que não para valores idênticos aos dos animais controlo. Estes dados foram corroborados pela AUC do TTG, que expressou uma redução significativa da tolerância à glicose nos grupos tratados com dieta hipercalórica, sendo que a resposta foi melhor no grupo HC+M comparativamente aos HC. Neste modelo animal de resistência à insulina, é espectável que ocorra uma produção de glicose *de novo* pelo fígado, levando a uma gliconeogénese elevada, o que resulta em níveis aumentados de glicose no sangue no estado pós-prandial e redução da tolerância à glicose, tal como relatado anteriormente por outros autores (Tal *et al.*, 1991).

Avaliámos ainda a sensibilidade à insulina através de um teste de tolerância à insulina. Os nossos resultados mostraram uma redução da tolerância à insulina no grupo com dieta HC comparativamente aos restantes grupos. O TTI expressou uma maior dificuldade de redução da glicemia após injeção de insulina, revelador de uma redução da sensibilidade à insulina nos animais com dieta HC. Esta observação foi corroborada pela AUC do TTI, na qual se observa um aumento significativo no grupo HC comparativamente com os grupos Controlo, Mirtilo e HC+M. Este resultado confirma que um elevado teor de gordura na dieta leva a uma resistência à insulina diminuída. No grupo HC+M esse efeito foi prevenido, ainda que para valores um pouco superiores aos dos grupos Controlo e Mirtilo. Esta tendência protetora dos mirtilos foi observada em estudos anteriores em que os voluntários resistentes à insulina que consumiram mirtilo (na bebida) viram melhorada a sensibilidade à insulina (Roopchand *et al.*, 2013; Basu & Lyons, 2012). DeFuria *et al.* (2009) verificaram que murganhos C57BL/6 que consumiram 60 % dieta gorda + 4 % de mirtilos durante 8 semanas

tiveram uma menor AUC de glicose (aumento da sensibilidade à insulina) em comparação com os murganhos só com dieta gorda. Além disso, aumentos semelhantes na sensibilidade à insulina (avaliados pelo TTI) foram encontrados em murganhos KKAY diabéticos que consumiram uma dieta de mirtilo durante 5 semanas (Takikawa *et al.*, 2010).

Adicionalmente, o grupo com uma dieta hipercalórica (HC) apresentou tendência para um aumento, mesmo não sendo estatisticamente significativo, na glicemia de jejum comparativamente aos restantes grupos. No entanto, em estado pós-prandial esse aumento de glicemia já foi significativamente superior comparativamente aos restantes grupos. Estes efeitos foram prevenidos (pelo menos parcialmente) nos animais que consumiram sumo de mirtilo e dieta HC. Esses resultados sugerem que o uso de sumo de mirtilo pode prevenir a progressão da pré-diabetes causada por uma dieta hipercalórica. Estudos anteriores mostraram que o mirtilo pode reduzir significativamente os níveis de glicose no sangue (num estado de jejum) (Roopchand *et al.*, 2013). Embora a medição da glicose no sangue seja essencial para avaliar a resposta glicémica aguda, a HbA1c é um indicador importante do controlo glicémico a longo prazo nos últimos dois a três meses (Sherwani *et al.*, 2016). Assim, juntamente com a glicemia de jejum, a avaliação da HbA1c é o teste usado para monitorizar o efeito crónico de um determinado tratamento da diabetes (Sherwani *et al.*, 2016). Mirfeizi *et al.* (2016) observaram que o consumo de mirtilo em pó, em ratos com DMT2, melhorou a glicemia pós-prandial e a HbA1c (em comparação com os valores basais). Relativamente aos valores de HbA1c obtidos no nosso estudo, não se observaram alterações entre os grupos, como seria de esperar, tratando-se ainda de uma situação de pré-diabetes.

Em suma, este modelo pré-diabético avançado (HC) apresentou agravamento das alterações metabólicas relacionadas com a homeostase alterada da glicose. Na fase mais inicial já se verificaram desregulações metabólicas, evidenciadas por alterações na tolerância à glicose durante o TTG e o TTI, bem como nos níveis de glicose e insulina, indicativos de resistência à insulina, em concordância com outros estudos (Lírio *et al.*, 2016; Giorelli *et al.*, 2015). Na fase mais avançada, embora os níveis glicémicos em jejum fossem mantidos dentro dos valores normais (normoglicemia) devido à hiperinsulinemia compensatória, no estado pós-prandial já se encontravam aumentados, associando-se à intolerância à glicose e resistência periférica à insulina, concordando com outros relatos (Lírio *et al.*, 2016; Fiorini *et al.*, 1994; Pagliassotti *et al.*, 1996; Dutta *et al.*, 2001). Por outro lado, o consumo de mirtilo nos animais HC preveniu o desenvolvimento das alterações metabólicas ao nível da tolerância à glicose e resistência à insulina.

A hipertrigliceridemia é um dos critérios para o diagnóstico da síndrome metabólica e parece estar presente em ratos Wistar alimentados com dieta HC (Panchal *et al.*, 2010). O aumento do fluxo de AGL para o fígado (a partir de uma massa de tecido adiposo expandida) pode levar à superprodução de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ricas em TGs, resultando, por sua vez, em elevados níveis séricos de TGs. A hipertrigliceridemia é também um reflexo da condição de resistência à insulina (Eckel *et al.*, 2005). Um estudo corrobora um comprometimento da tolerância à glicose, que está relacionado à incapacidade da insulina em promover a captação de glicose e o metabolismo por tecidos sensíveis à insulina, o que foi claramente visível em ratos Wistar alimentados com dieta gorda a partir da 9ª semana do estudo (Panchal *et al.*, 2010).

Estudos com 9 semanas de tratamentos com HSu já apresentam níveis séricos de TGs mais elevados, juntamente com o aumento da deposição lipídica no tecido hepático, observado na coloração H&E (Lírio *et al.*, 2016; Simental-Mendía *et al.*, 2015; Ram *et al.*, 2014; Daly *et al.*, 1997). Os nossos dados corroboram estes resultados. Com efeito, relativamente à concentração sérica de TGs no estado pós-prandial, após 23 semanas de tratamento, verificou-se um aumento significativo no grupo HC, comparativamente ao Controlo, corroborando outros estudos anteriores (Marques *et al.*, 2016). Por outro lado, constatou-se uma diminuição significativa no grupo HC+M comparativamente ao grupo HC, evidenciando assim um efeito protetor dos mirtilos nesta situação de pré-diabetes. Um estudo anterior refere que ratos tratados durante 12 semanas com uma dieta suplementada com mirtilo apresentavam concentração sérica de TGs séricos superior e menor grau de esteatose hepática, comparativamente aos animais não suplementados com mirtilos (Elks *et al.*, 2015), o que está de acordo com os nossos resultados. Com efeito, através da análise histológica do tecido hepático, com recurso à marcação do tecido com Hematoxilina & Eosina, verificou-se um aumento de vesículas lipídicas e de células inflamatórias no grupo HC, sendo este efeito atenuado no grupo HC+M. Estudos anteriores realizados em ratos alimentados com groselhas negras e mirtilos estão em sintonia com estas observações, já que mostraram uma drástica redução na acumulação de gordura no fígado (de cerca de 50 %) comparando com os ratos que recebem uma dieta rica em gordura sem as bagas (Heyman *et al.*, 2014). A característica das bagas é que são ricas em compostos polifenólicos, que possuem diversas propriedades protetoras para saúde e protetoras de doença, nomeadamente os efeitos antioxidantes (Del Rio *et al.*, 2013). Os polifenóis são geralmente metabolizados no intestino e no fígado, recirculam na circulação entero-hepática e sugere-se que certos metabolitos se acumulam em associação com gotículas de gordura hepática e células do sistema

imunológico, produzindo aí os efeitos benéficos, particularmente de carácter antioxidante (Del Rio *et al.*, 2013; Joven *et al.*, 2012).

Sabendo que a evolução da diabetes está acompanhada da ativação de vias promotoras de stresse oxidativo, nomeadamente resultantes de glicotoxicidade, que agravam a doença, pretendemos avaliar se este modelo já apresentava marcas de desequilíbrio oxidativo e, paralelamente, avaliar o potencial antioxidante do sumo de mirtilo. Verificou-se que nesta fase da doença ainda não existem alterações significativas de peroxidação lipídica no soro, avaliada pela concentração de MDA, bem como do conteúdo em antioxidantes, avaliado pelo TAS. Contudo, a razão MDA/TAS, que nos dá uma indicação em relação ao equilíbrio oxidativo, estava significativamente aumentada no grupo HC em comparação com grupo Mirtilo e HC+M. Este resultado está de acordo com um estudo efetuado em ratos alimentados com dietas com alto teor de gordura e sacarose, no qual se verificou um valor elevado de MDA sérico em comparação com ratos controlo (Yao *et al.*, 2017). A redução no grupo HC+M sugere uma proteção antioxidante que seria de esperar face ao conhecido carácter antioxidante deste tipo de frutos.

Com efeito, estudos realizados em humanos mostraram que o consumo de mirtilo leva a um aumento da capacidade antioxidante do plasma (Neto, 2007). Smith *et al.* (2000), utilizando tirosina como modelo da oxidação de proteínas, ou ácido linoleico como modelo da oxidação de lípidos, verificaram que os extratos de mirtilo apresentaram capacidade de inibir a oxidação destas moléculas quando em presença de radicais de oxigénio. Giovanelli & Buratti (2009) sugerem que a atividade antioxidante dos mirtilos parece estar mais diretamente relacionada com a concentração de fenóis totais do que apenas com a sua concentração em antocianinas, embora estas também contribuam para as propriedades antioxidantes destes mesmos frutos (Zheng & Wang, 2003). Os polifenóis presentes nos mirtilos conferiram *in vivo*, uma proteção significativa dos eritrócitos contra o stresse oxidativo (Zafra-Stone *et al.*, 2007), podendo levar a uma diminuição dos efeitos do stresse oxidativo e de estados inflamatórios do sistema vascular (Neto, 2007). Para além disso, as antocianinas, um dos principais grupos de fenólicos presentes nos mirtilos, tem sido descrito como potenciais inibidores da peroxidação lipídica (Brown & Kelly, 2007). Em trabalhos posteriores do nosso grupo será muito importante caracterizar a composição do sumo de mirtilo em termos dos principais compostos bioativos, bem como avaliar o seu potencial antioxidante e antidiabético neste modelo animal de pré-diabetes.

Como atrás referido ao longo do texto, a mitocôndria desempenha um papel muito importante na dinâmica celular pela intervenção nem vasto leque de funções da célula,

incluindo a missão primordial de geração de energia (sob a forma de ATP). Considerando as alterações que encontramos ao nível do fígado neste modelo de pré-diabetes (grupo HC), e a hepatoproteção conferida pelo sumo de mirtilo (grupo HC+M), julgámos importante perceber se estes efeitos estavam associados a modificações da bioenergética e da dinâmica mitocondrial e, para tal, avaliámos um conjunto amplo de parâmetros.

A avaliação do potencial transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) desenvolvido após energização, é essencial para avaliar a função mitocondrial, uma vez que este parâmetro reflete diferenças no potencial elétrico e representa o maior componente do gradiente eletroquímico de prótons através da membrana, contribuindo para mais de 90 % da energia disponível para a fosforilação oxidativa (Nicholls, 1982). A capacidade de desenvolver $\Delta\Psi_m$ e de recuperar após fosforilação do ADP adicionado e manter um potencial semelhante ao inicial, são parâmetros que se encontram alterados nas mitocôndrias de fígados dos ratos tratado com dieta HC e, de forma algo surpreendente, também nos ratos alimentados com sumo de mirtilo sem a dieta HC. A diminuição do potencial nestes mesmos ratos pode ser reflexo de um aumento da permeabilidade passiva da membrana mitocondrial interna a prótons ou de uma diminuição do número de prótons ejetados em associação com o transporte de eletrões através da cadeia respiratória (Murphy, 1989; Brand, 1990). O consumo mitocondrial de oxigénio em repouso, isto é, o estado 4 respiratório, foi significativamente mais elevado nos animais desses dois grupos (HC e Mirtilo). Adicionalmente, o consumo de oxigénio foi avaliado na presença de um inibidor da translocação de prótons através de ATP sintase (oligomicina). Nestas condições, o consumo de oxigénio foi inferior nos mesmos grupos. A *lag phase*, que corresponde ao tempo que precede a repolarização após a adição do ADP, estava aumentada nas mitocôndrias hepáticas dos animais do grupo HC e do grupo Mirtilo, em relação aos ratos dos grupos Controlo e HC+M. Paralelamente, o estado 3 respiratório foi menor nos animais do grupo HC e do grupo Mirtilo, o que sugere que houve uma perda de eficiência na capacidade oxidativa e fosforilativa das mitocôndrias hepáticas. A avaliação do grau de acoplamento entre a utilização de oxigénio pela cadeia respiratória ao nível do citocromo c oxidase e o ADP fosforilado pela ATP sintase (quociente ADP/O), revelou-se menor nos animais do grupo HC e do grupo Mirtilo. Contudo apesar do aumento no estado 4 respiratório, a transferência sequencial de eletrões pela cadeia respiratória estava acoplada de forma eficiente à fosforilação de ADP pela ATP sintase. Concluiu-se assim que a menor capacidade de recuperação do $\Delta\Psi_m$, o decréscimo no estado 3 respiratório e quociente ADP/O, refletem um acoplamento menos eficiente entre o sistema fosforilativo e oxidativo.

Foi também analisada a respiração mitocondrial na presença de FCCP, que é um protonóforo que permeabiliza a membrana mitocondrial a prótons, estimulando desta forma a cadeia respiratória a taxas máximas de consumo de oxigênio. A observação de que a respiração mitocondrial é significativamente inferior na presença de FCCP, nos grupos HC e Mirtilo, associada ao decréscimo do estado 3 respiratório, indica que existem alterações a nível da cadeia respiratória (Du *et al.*, 1998) que podem refletir alterações dos complexos respiratórios devido a alterações membranares, causadas pela acumulação de gordura no hepatócito (Zeisel & Blusztajn, 1994).

Em resumo, a função mitocondrial hepática de animais alimentados com dieta rica em HC, e também de animais mantidos com sumo de mirtilo, revelou disfunções na bioenergética mitocondrial. Ocorreu o desenvolvimento de esteatose com consequente perda de eficiência da função mitocondrial (estado 4 superior, $\Delta\Psi_m$, estado 3, ICR, ADP/O e respiração na presença de FCCP inferiores) o que poderia ser esperada no grupo HC mas é de alguma forma surpreendente no grupo Mirtilo, merecendo futura investigação para avaliar as causas deste efeito.

Independentemente da eficiência da bioenergética mitocondrial, as mitocôndrias isoladas a partir do fígado de animais do grupo HC e do grupo Mirtilo revelaram ao longo do estudo maior suscetibilidade à indução, por cálcio, da permeabilidade transitória mitocondrial (PTM). A indução da PTM está associada a condições patológicas, como a acumulação excessiva de cálcio na mitocôndria, despolarização mitocondrial, stresse oxidativo e depleção do conteúdo celular em ATP (Crompton, 1999; Bernardi *et al.*, 2001). Um estudo refere que hepatócitos de animais Zucker Fatty com 6 a 7 semanas de idade apresentam maior suscetibilidade à indução da PTM por um ácido biliar e que a indução da PTM em hepatócitos está relacionada com o aumento da formação de ROS e disfunção mitocondrial (Kobak *et al.*, 2005). As mitocôndrias desempenham um papel importante na regulação da homeostase do Ca^{2+} intracelular. Relatos anteriores descrevem algumas irregularidades no PPTM associadas à diabetes (Kristal *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2001). Como a abertura do PPTM pode ser induzida pelo aumento da quantidade de Ca^{2+} e pelo stresse oxidativo, e considerando que a diabetes leva ao aumento do stresse oxidativo, devido à hiperglicemia constante (Baynes, 1991; Rosen *et al.*, 2001; Rosen *et al.*, 2000), deve-se esperar um aumento da PTM dependente de Ca^{2+} induzida durante a diabetes (Kowaltowski *et al.*, 2001).

As mitocôndrias são as principais produtoras de ATP em células de mamíferos eucarióticos e também as principais fontes intracelulares e alvo de ROS. O aumento da

geração de ROS está implicado na "toxicidade da glicose: glicotoxicidade" característica da diabetes (Palmeira *et al.*, 2007). Ao analisar as ROS a nível basal, observámos uma diminuição da fluorescência nos grupos Controlo, HC e HC+M comparativamente ao grupo Mirtilo. Com a adição da antimicina A houve um aumento da fluorescência no grupo Controlo Mirtilo e HC, comparando com o grupo HC+M.

Está bem estabelecido que a hiperglicemia provoca um aumento na produção de ROS, devido ao aumento da entrada de equivalentes redutores na cadeia de transporte de eletrões mitocondrial (Nishikawa *et al.*, 2000; Michael Brownlee, 2001). Trabalhos de Yu e colaboradores (2006) mostraram que a exposição a condições de elevada glicose leva a mudanças dinâmicas na morfologia mitocondrial devido à superprodução prolongada de ROS. No entanto, a relação entre a produção de ROS e a biogénese mitocondrial ainda não está clara. Com base na indicação de alteração da função mitocondrial pela hiperglicemia, pressupõe-se que o aumento da produção de ROS induzida pela hiperglicemia desencadeia a diminuição da biogénese mitocondrial (Palmeira *et al.*, 2007).

O estado diabético é caracterizado pela abundância persistente de substrato na circulação. Há um excesso estável dos seguintes substratos metabólicos: glicose, AGL (Boden, 2003), TGs (Frohlich & Steiner, 2000), lactato (Kelley & Mandarino, 1990) e corpos cetónicos (Avogaro *et al.*, 1996). Isso leva a uma diminuição nas atividades de várias vias metabólicas, uma vez que os produtos finais são menos necessários. Assim, o aumento da disponibilidade de substrato (como a glicose) leva a um aumento na secreção de insulina e também a um incremento no stresse oxidativo, nomeadamente uma maior produção de ROS (Hammes *et al.* 2003). O aumento da disponibilidade de substratos oxidáveis leva ao aumento do $\Delta\Psi_m$ que, por sua vez, conduz a uma diminuição da velocidade de fosforilação oxidativa, aumentando a redução parcial de oxigénio e a geração de ROS (Rolo e Palmeira 2006). A elevação da produção de ROS pode ser neutralizada devido à atividade antioxidante presente no mirtilo (Ferreira *et al.*, 2010). À semelhança das nossas observações, um trabalho anterior demonstrou aumento dos níveis de ROS com extrato de mirtilos do Alasca (Scerbak *et al.*, 2016). Xenomose é um fenómeno que explica como as plantas stressadas pelo meio ambiente produzem compostos bioativos que conferem resistência ao stresse e benefícios de sobrevivência aos animais que os consomem (Hooper *et al.*, 2010). Plantas e frutos, como os mirtilos, produzem metabolitos secundários, como polifenóis (Grace *et al.*, 2014). O consumo desses metabolitos vegetais por animais pode ativar vias de resposta ao stresse diferentes dos efeitos antioxidantes regulares, melhorando assim o envelhecimento geral e a saúde (Howitz & Sinclair, 2008; Gems & Partridge, 2008). Além disso, os mirtilos do Alasca

têm mostrado inibir a inflamação em culturas de células neuronais através de mecanismos biológicos diferentes do “tradicionais” efeitos antioxidantes e de diminuição da produção de ROS (Gustafson *et al.*, 2012). Vários estudos demonstram que baixos níveis de ROS podem ser benéficos na ativação de vias de sinalização para iniciar processos biológicos (Van Raamsdonk & Hekimi, 2012; Sasakura *et al.*, 2017). Em *C. elegans*, as ROS em baixas concentrações podem atuar como uma molécula mensageira secundária, levando à acumulação de gordura (Singh *et al.*, 2008). Verificou-se que esse aumento no conteúdo de gordura tem efeitos contrários à longevidade (Singh *et al.*, 2008), possivelmente devido a diferenças na estrutura da gordura, à sua localização ou ao momento da sua acumulação.

A informação relativa à bioenergética e dinâmica mitocondrial foi complementada com estudo da expressão proteica de algumas proteínas importantes nos processos em que a mitocôndria participa de forma muito particular. Verificou-se um aumento no conteúdo de COXIV no grupo de dieta HC+M comparativamente aos restantes grupos. Como a citocromo c oxidase (COX, complexo IV) é a última enzima da cadeia respiratória mitocondrial e é um local de regulação do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial, ela catalisa a transferência de elétrons do citocromo c reduzido para o oxigênio molecular (Brunori & Wilson, 1995; Calhoun *et al.*, 1994) numa reação acoplada ao bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, auxílio assim o estabelecimento do gradiente eletroquímico mitocondrial (Hatefi, 1985). Não existiram alterações ao nível dos grupos no que diz respeito ao TFAM, um dos reguladores da biogénese mitocondrial.

Em relação à Opa-1, apesar de não existirem diferenças significativas, verificou-se um aumento no grupo HC relativamente aos restantes. A expressão da proteína de Opa-1 e da GTPase mitofusina-2 (Mfn2) duas proteínas da dinâmica de fusão mitocondrial, estão dramaticamente alteradas em indivíduos obesos e resistentes à insulina (Zorzano *et al.*, 2009). A Opa-1 também controla a estrutura da crista da membrana interna mitocondrial, e assim, a liberação de citocromo c durante a apoptose (Olichon *et al.*, 2006). O processo de fusão mitocondrial é finamente regulado pelas proteínas mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2), presentes na membrana externa da mitocôndria (Santel & Fuller, 2001) e pela Opa-1, presente na membrana interna (Delettre *et al.*, 2001). Embora a Opa-1 esteja localizado na membrana mitocondrial interna, ela também regula a fusão da membrana mitocondrial externa, provavelmente pela interação com as mitofusinas (Cipolat *et al.*, 2004; Sesaki, 2003). O processo de fusão das membranas mitocondriais é regulado pela clivagem proteolítica de Opa-1 pela Oma-1, o qual ocorre quando há um decréscimo no $\Delta\Psi_m$ (Head *et al.*, 2009). Assim, caso ocorra uma perda do $\Delta\Psi_m$, o processo de fusão não ocorrerá

devido à clivagem de Opa-1. São disto exemplos o músculo estriado esquelético, células endoteliais e células β pancreáticas de doentes com DMT2, nas quais foi observado que as mitocôndrias são menores e apresentam morfologia alterada, apresentando vacúolos, além de possuírem um conteúdo proteico reduzido de Mfn2 e Opa-1 e maior expressão de Fis1 (Anello *et al.*, 2005; Bach *et al.*, 2005; Bach *et al.*, 2003; Kelley *et al.*, 2002; Shenouda *et al.*, 2011). Estas alterações na dinâmica mitocondrial foram também observadas em modelos animais de DMT2 (Bach *et al.*, 2003; Bindokas *et al.*, 2003). O aumento na fragmentação mitocondrial foi relacionado com um decréscimo na fusão, devido a uma redução no conteúdo proteico e do RNAm de Mfn2 (Bach *et al.*, 2003). Tem sido também demonstrado que altas concentrações de glicose induzem a fissão mitocondrial em linhagem de células do fígado, do coração, do endotélio, das ilhotas pancreáticas e em culturas primárias de neurónios e de células do sistema cardiovascular, parecendo ser este o gatilho para a desregulação da dinâmica mitocondrial na DMT2 (Leininger *et al.*, 2006; Paltauf-Doburzynska *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008).

A p62, proteína que promove a ubiquitinação mitocondrial, encontra-se reduzida no grupo HC. A p62 contém um local de ligação a ubiquitina e um local de ligação a LC3 (Bitto *et al.*, 2014). Foi demonstrado que durante a mitofagia a p62 liga mitocôndrias ubiquitinadas a autofagossomas associados a LC3 (Katsuragi *et al.*, 2015; Manley *et al.*, 2013).

Os nossos resultados revelam não existir mudanças significativas na Sirt3, apesar de tendencialmente elevada no grupo HC+M quando comparando com os restantes grupos. Os níveis de acetilação global na família das sirtuínas são controlados em parte pelas proteínas desacetilases dependentes de NAD⁺ (Schwer & Verdin, 2008), sendo a SIRT3 a desacetilase mitocondrial primária (Lombard *et al.*, 2007). Estudos estabeleceram um papel para a SIRT3 na adaptação ao stresse metabólico induzido pela privação de nutrientes (Hirschey *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2010; Hallows *et al.*, 2011; Shimazu *et al.*, 2010). Publicações recentes de Hirschey *et al.* (2011) e Jing *et al.* (2011) demonstram que a expressão e atividade da SIRT3 é afetada pela alimentação rica em gordura e desempenha um papel na prevenção de doenças metabólicas relacionadas com o envelhecimento, incluindo obesidade, resistência à insulina e diabetes. Hirschey *et al.* (2011) mostram que os níveis de RNAm e proteína SIRT3 no fígado são reduzidos quando os ratos são alimentados cronicamente com dieta hiperlipídica, resultando em hiperacetilação de proteínas na mitocôndria, à semelhança de outros trabalhos (Cantó & Auwerx, 2009; Kendrick *et al.*, 2011). No nosso estudo, contudo, não verificámos alterações significativas.

2. Conclusões

Os nossos resultados mostraram que este modelo pré-diabético de 23 semanas de dieta hipercalórica (grupo HC), composta por elevados teores de hidratos de carbono (35 % de sacarose) e durante 9 semanas, acompanhados de dieta hiperlipídica (60 %) nas 14 semanas seguintes, que mimetiza pelo menos em parte as dietas ocidentais, origina aumento do peso corporal, hiperglicemia no estado pós-prandial (com normoglicemia em jejum), redução da tolerância à glicose (verificada pelo TTG), aumento da concentração sérica de insulina no estado pós-prandial (não em jejum), resistência à insulina (confirmada pelo TTI), aumento da concentração sérica de TGs, e redução da capacidade antioxidante total no soro e aumento do estado oxidativo (avaliado pela razão MDA/TAS). Para além disso, esteve associado ao desenvolvimento de esteatose hepática focal constatada pela acumulação de gordura visível através da análise histológica, para além de diversas alterações relacionadas com a bioenergética mitocondrial hepática, incluindo perturbações ao nível do $\Delta\Psi_m$ (aumento da *lag-phase*, indicativo de alterações a nível do sistema fosforilativo), aumento da respiração mitocondrial, diminuição da permeabilidade mitocondrial e um aumento da expressão proteica de COXIV (indicativa da existência de alterações ao nível do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial).

A adição de sumo de mirtilo à dieta hipercalórica (grupo HC+M) foi capaz de prevenir o desenvolvimento de grande parte das modificações metabólicas induzidas pela dieta. Especificamente, melhorou a sensibilidade (e a resistência) à insulina e a tolerância à glicose, preveniu a hipertrigliceridemia e o estado oxidativo sérico, para além de que atenuou as alterações hepáticas, tanto a nível da esteatose focal como dos processos associados à dinâmica mitocondrial. O impacto aparentemente nefasto do sumo de mirtilo, per se (sem dieta HC), ao nível da bioenergética e dinâmica mitocondrial é merecedor de um estudo posterior mais aprofundado para compreender os mecanismos eventualmente envolvidos.

Serão igualmente necessários estudos adicionais para perceber melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos protetores do sumo de mirtilo nesta fase da pré-diabetes, agravada por uma dieta hipercalórica, incluindo a avaliação de outros tempos de exposição, outras doses de sumo de mirtilo e/ou dos seus principais componentes, bem como análise de outros marcadores, nomeadamente a nível hepático, mas também nos restantes tecidos periféricos associados à intolerância à glicose, à resistência à insulina e à glico e lipotoxicidade.

Capítulo VII – Bibliografía

- ADA** - American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33(1): 62–69.
- ADA** - American Diabetes Association (2012). Diagnosis of diabetes and prediabetes. *Diabetes Care*, 35(1): 11–63.
- Adams, L.A. & Angulo, P. (2006)**. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic Medicine*, 22(9): 1129–1133.
- Ali, R. & Cusi, K. (2009)**. New diagnostic and treatment approaches in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Annals of Medicine*, 41(4): 265–278.
- Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., Del Prato, S., Rabuazzo, A., Purrello, F., & Marchetti, P. (2005)**. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 48(2): 282–289.
- Angulo, P. (2002)**. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *New England Journal of Medicine*, 346(16): 1221–1231.
- Anty, R. & Lemoine, M. (2011)**. Liver fibrogenesis and metabolic factors. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 35(1): 10–20.
- Apostolova, N. & Victor, V.M. (2015)**. Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(8): 686–729.
- Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L.A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P., & Poniachik, J. (2004)**. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Science*, 106(6): 635–643.
- Arnaud, C.D. & Sanchez, S.D. (1990)**. The role of calcium in osteoporosis. *Annual Review of Nutrition*, 10(1): 397–414.
- Artal-Sanz, M. & Tavernarakis, N. (2009)**. Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature*, 461(7265): 793–797.
- Auberval, N., Dal, S., Bietiger, W., Pinget, M., Jeandidier, N., Maillard-Pedracini, E., Schini-Kerth, V., & Sigrist, S. (2014)**. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6(1): 130.
- Avogaro, A., Toffolo, G., Miola, M., Valerio, A., Tiengo, A., Cobelli, C., & Del Prato, S. (1996)**. Intracellular lactate-and pyruvate-interconversion rates are increased in muscle tissue of non-insulin-dependent diabetic individuals. *Journal of Clinical Investigation*, 98(1): 108.
- Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-henriksson, H., Manco, M., Calvani, M., Castagneto, M., Palaci, M., Mingrone, G., Zierath, J.R., Vidal, H., & Zorzano, A. (2005)**. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6. *Diabetes*, 54(9): 2685–2693.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dagaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., & Zorzano, A. (2003)**. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: a novel regulatory mechanism altered in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19): 17190–17197.
- Bajaj, M., Suraamornkul, S., Pratipanawat, T., Hardies, L.J., Pratipanawat, W., Glass, L., Cersosimo, E., Miyazaki, Y., & Defronzo, R.A. (2003)**. Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52(6): 1364–1370.
- Bao, L., Yao, X.S., Yau, C.C., Tsi, D., Chia, C.S., Nagai, H., & Kurihara, H. (2008)**. Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17): 7803–7807.
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A., & Bernardi, P. (2005)**. Properties of the permeability transition pore in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28): 1–11.
- Basu, A., Du, M., Leyva, M.J., Sanchez, K., Betts, N.M., Wu, M., Aston, C.E., & Lyons, T.J. (2010)**. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. *Journal of Nutrition*, 140(9): 1582–1587.

- Basu, A. & Lyons, T.J. (2012).** Strawberries, blueberries, and cranberries in the metabolic syndrome: clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23): 5687–5692.
- Basu, S., Yoffe, P., Hills, N., & Lustig, R.H. (2013).** The relationship of sugar to population-level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data. *PLOS ONE*, 8(2): e57873.
- Baynes, J.W. (1991).** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40(4): 405–412.
- Bechmann, L.P., Hannivoort, R.A., Gerken, G., Hotamisligil, G.S., Trauner, M., & Canbay, A. (2012).** The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 56(4): 952–964.
- Begrache, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., & Fromenty, B. (2006).** Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*, 6(1): 1–38.
- Belfort, R., Harrison, S.A., Brown, K., Darland, C., Finch, J., Hardies, J., Balas, B., Gastaldelli, A., Tio, F., Pulcini, J., Berria, R., Ma, J.Z., Dwivedi, S., Havranek, R., Fincke, C., DeFronzo, R., Bannayan, G.A., Schenker, S., & Cusi, K. (2006).** A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *New England Journal of Medicine*, 355(22): 2297–2307.
- Belfort, R., Mandarino, L., & Kashyap, S. (2005).** Dose-response effect of elevated plasma fatty acid on insulin signaling. *Diabetes*, 54(6): 1640–1648.
- Bellentani, S., Tiribelli, C., Saccoccio, G., Sodde, M., Fratti, N., De Martin, C., & Christianini, G. (1994).** Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. *Hepatology*, 20(6): 1442–1449.
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.-P., Casteilla, L., Letellier, T., & Rossignol, R. (2006).** Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 291(6): C1172–C1182.
- Bernardi, P., Petronilli, V., Di Lisa, F., & Forte, M. (2001).** A mitochondrial perspective on cell death. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(2): 112–117.
- Berridge, M.J., Lipp, P., & Bootman, M.D. (2000).** The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1): 11–21.
- Bessesen, D. (2001).** The role of carbohydrates in insulin resistance. *The Journal of Nutrition*, 131(10): 2782–2786.
- Biddinger, S.B., Hernandez-Ono, A., Rask-Madsen, C., Haas, J.T., Aleman, J.O., Suzuki, R., Scapa, E.F., Agarwal, C., Carey, M.C., Stephanopoulos, G., Cohen, D.E., King, G.L., Ginsberg, H.N., & Kahn, C.R. (2008).** Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metabolism*, 7(2): 125–134.
- Bilous, R. & Donnelly, R. (2010).** Handbook of Diabetes. *Wiley-Blackwell*, 1(4): 1–248.
- Bindokas, V.P., Kuznetsov, A., Sreenan, S., Polonsky, K.S., Roe, M.W., & Philipson, L.H. (2003).** Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11): 9796–9801.
- Björntorp, P. & Sjöström, L. (1978).** Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 27(12): 1853–1865.
- Boden, G. (2003).** Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 Diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 111(3): 121–124.
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, M.J., Oberitter, H., Schulze, M., Stehle, P., & Watzl, B. (2012).** Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51(6): 637–663.
- Boelsterli, U.A. & Lim, P.L.K. (2007).** Mitochondrial abnormalities - a link to idiosyncratic drug hepatotoxicity? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220(1): 92–107.
- Boon, L., Geerts, W.J.C., Jonker, A., Lamers, W.H., & Van Noorden, C.J.F. (1999).** High protein diet induces pericentral glutamate dehydrogenase and ornithine aminotransferase to provide sufficient glutamate for pericentral detoxification of ammonia in rat liver lobules. *Histochemistry and Cell Biology*, 111(6): 445–452.

- Brand, M.D. (1990).** The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1018(2–3): 128–133.
- Brenner, C. & Moulin, M. (2012).** Physiological roles of the permeability transition pore. *Circulation Research*, 111(9): 1237–1247.
- Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E., & Pfeiffer, D.R. (1989).** Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 264(14): 7826–7830.
- Brown, J.E. & Kelly, M.F. (2007).** Inhibition of lipid peroxidation by anthocyanins, anthocyanidins and their phenolic degradation products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(1): 66–71.
- Browning, J. & Horton, J. (2004).** Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(2): 147–152.
- Brownlee, M. (2001).** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865): 813–820.
- Brownlee, M. (2001).** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414 813–820.
- Brunori, M. & Wilson, M.T. (1995).** Electron transfer and proton pumping in cytochrome oxidase. *Biochemie*, 77(7–8): 668–676.
- Bugianesi, E., Gastaldelli, A., Vanni, E., Gambino, R., Cassader, M., Baldi, S., Ponti, V., Pagano, G., Ferrannini, E., & Rizzetto, M. (2005).** Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*, 48(4): 634–642.
- Bugianesi, E., McCullough, A.J., & Marchesini, G. (2005).** Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, 42(5): 987–1000.
- Burant, C.F., Sivitz, W.I., Fukumoto, H., Kayano, T., Nagamatsu, S., Seino, S., Pessin, J.E., & Bell, G.I. (1991).** Mammalian glucose transporters: structure and molecular regulation. *Proceedings of the 1990 Laurentian Hormone Conference*, 47(1): 348–349.
- Burgeiro, A., Cerqueira, M.G., Varela-Rodríguez, B.M., Nunes, S., Neto, P., Pereira, F.C., Reis, F., & Carvalho, E. (2017).** Glucose and lipid dysmetabolism in a rat model of prediabetes induced by a high-sucrose diet. *Nutrients*, 9(6): 638.
- Buyschaert, M. & Bergman, M. (2011).** Definition of prediabetes. *Medical Clinics of North America*, 95(2): 289–297.
- Calder, P., Ahluwalia, N., Brouns, F., Buetler, T., Clement, K., Cunningham, K., Esposito, K., Jönsson, L., H, K., Lansink, M., Marcos, A., Margioris, A., Matusheski, N., Nordmann, H., O'Brien, J., Pugliese, G., Rizkalla, S., Schalkwijk, C., Tuomilehto, J., Wärnberg, J., Watzl, B., & Winklhofer-Roob, B. (2011).** Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*, 106(S3): S1–S78.
- Calhoun, M.W., Thomas, J.W., & Gennis, R.B. (1994).** The cytochrome-oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(8): 325–330.
- Calvo, S.E. & Mootha, V.K. (2010).** The mitochondrial proteome and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 11(1): 25–44.
- Camara, A.K.S., Lesnefsky, E.J., & Stowe, D.F. (2010).** Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(3): 279–347.
- Campbell, J.S., Hughes, S.D., Gilbertson, D.G., Palmer, T.E., Holdren, M.S., Haran, A.C., Odell, M.M., Bauer, R.L., Ren, H., Haugen, H.S., Yeh, M.M., & Fausto, N. (2005).** Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9): 3389–3394.
- Cantó, C. & Auwerx, J. (2009).** Caloric restriction, SIRT1 and longevity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7): 325–331.
- Carter-Kent, C., Zein, N.N., & Feldstein, A.E. (2008).** Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *American Journal of Gastroenterology*, 103(4): 1036–1042.
- Cayman Chemical (2017).** Research tools for fatty liver diseases. *Cayman Chemical*, 1–4.
- Cefalu, W.T. (2006).** Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. *ILAR Journal*, 47(3): 186–198.

- Chan, D.C. (2006).** Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125(7): 1241–1252.
- Chance, B. & Williams, G.R. (1956).** The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 17(1): 65–134.
- Chavin, K.D., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Chatham, J., Chacko, V.P., Hock, J.B., Walajtys-Rode, E., Rashid, A., Chen, C.H., Huang, C.C., Wu, T.C., Lane, M.D., & Diehl, A.M. (1999).** Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9): 5692–5700.
- Chen, L., Chen, R., Wang, H., & Liang, F. (2015).** Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. *International Journal of Endocrinology*, 508409(1): 1–9.
- Chiaverini, N. & De Ley, M. (2010).** Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radical Research*, 44(6): 605–613.
- Chinopoulos, C. & Adam-Vizi, V. (2010).** Mitochondrial Ca²⁺ sequestration and precipitation revisited. *The FEBS Journal*, 277(18): 3637–3651.
- Choi, K. & Kim, Y.-B. (2010).** Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 25(2): 119–129.
- Cigremis, Y., Turel, H., Adiguzel, K., Akgoz, M., Kart, A., Karaman, M., & Ozen, H. (2009).** The effects of acute acetaminophen toxicity on hepatic mRNA expression of SOD, CAT, GSH-Px, and levels of peroxynitrite, nitric oxide, reduced glutathione, and malondialdehyde in rabbit. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 323(1–2): 31–38.
- Cipolat, S., de Brito, O.M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004).** OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45): 15927–15932.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jörns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D.L. (2005).** Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, 54(2): 97–107.
- Cohen, J., Horton, J., & Hobbs, H. (2011).** Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, 332(6037): 1519–1523.
- Collins, T.J., Berridge, M.J., Lipp, P., & Bootman, M.D. (2002).** Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *The EMBO Journal*, 21(7): 1616–1627.
- Conde, S., Silva, T., Constancio, G., Carmo, M., Monteiro, E., & Guarino, M. (2011).** Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. *British Journal of Nutrition*, 107(1): 86–95.
- Cortez-Pinto, H., Chatham, J., Chacko, V.P., Arnold, C., Rashid, A., & Diehl, A.M. (1999).** Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Journal of the American Medical Association*, 282(17): 1659–1664.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., & Rofe, A.M. (2002).** Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(4): 627–647.
- Crompton, M. (1999).** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*, 341(2): 233–249.
- Daly, M.E., Vale, C., Walker, M., Alberti, K.G., & Mathers, J.C. (1997).** Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66(5): 1072–1085.
- Day, C.P. (2002).** Pathogenesis of steatohepatitis. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, 16(5): 663–678.
- Day, C.P. & James, O.F.W. (1998).** Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*, 114(4): 842–845.
- DeFronzo, R.A. (2004).** Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America*, 88(4): 787–835.
- DeFronzo, R.A. & Abdul-Ghani, M.A. (2011).** Preservation of β -cell function: the key to diabetes prevention. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(8): 2354–2366.
- DeFronzo, R.A. & Tripathy, D. (2009).** Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32(suppl 2): 157–163.

- DeFuria, J.**, Bennett, G., Strissel, K.J., Perfield, J.W., Milbury, P.E., Greenberg, A.S., & Obin, M.S. (2009). Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *Journal of Nutrition*, 139(8): 1510–1516.
- Delettre, C.**, Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., & Hamel, C.P. (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Human Genetics*, 109(6): 584–591.
- Desai, V.G.**, Aidoo, A., Li, J., Lyn-Cook, L.E., Casciano, D.A., & Feuers, R.J. (2000). Effects of bleomycin on liver antioxidant enzymes and the electron transport system from ad libitum-fed and dietary-restricted female and male Fischer 344 rats. *Nutrition and Cancer*, 36(1): 42–51.
- Diaconeasa, Z.**, Leopold, L., Rugină, D., Ayvaz, H., & Socaciu, C. (2015). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2): 2352–2365.
- Diaz-Morales, N.**, Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Escribano-Lopez, I., Marañón, A., Lopez-Domenech, S., Orden, S., Roldan-Torres, I., Alvarez, A., Veses, S., Jover, A., Rocha, M., Hernandez-Mijares, A., & Victor, V. (2016). Are mitochondrial fusion and fission impaired in leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxid & Redox Signaling*, 25(2): 1–26.
- Donath, M.Y.**, Schumann, D.M., Faulenbach, M., Ellingsgaard, H., Perren, A., & Ehses, J.A. (2008). Islet inflammation in type 2 diabetes: from metabolic stress to therapy. *Diabetes Care*, 31(Suppl 2): S161–S164.
- Dorn, G.W. & Kitsis, R.N.** (2015). The mitochondrial dynamism-mitophagy-cell death interactome: Multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble. *Circulation Research*, 116(1): 167–182.
- Dourmashkin, J.T.**, Chang, G.Q., Gayles, E.C., Hill, J.O., Fried, S.K., Julien, C., & Leibowitz, S.F. (2005). Different forms of obesity as a function of diet composition. *International Journal of Obesity*, 29(11): 1368–1378.
- Dowman, J.K.**, Tomlinson, J.W., & Newsome, P.N. (2011). Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 33(5): 525–540.
- Du, G.**, Mouithys-Mickalad, A., & Sluse, F.E. (1998). Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(9): 1066–1074.
- Duchen, M.** (2004). Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(4): 365–451.
- Duchen, M.** (2004). Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*, 53(Suppl 1): S96–S102.
- Duke, J.** (1992). Handbook of phytochemical constituent GRAS, herbs and other economic plants. *CRC Press, London*, 412.
- Duthie, S.J.** (2007). Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(6): 665–674.
- Dutta, K.**, Podolin, D.A., Davidson, M.B., & Davidoff, A.J. (2001). Cardiomyocyte dysfunction in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Diabetes*, 50(5): 1186–1192.
- Dykens, J.A. & Will, Y.** (2007). The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development. *Drug Discovery Today*, 12(17–18): 777–785.
- Eccleston, H.B.**, Andringa, K.K., Betancourt, A.M., King, A.L., Mantena, S.K., Swain, T.M., Tinsley, H.N., Nolte, R.N., Nagy, T.R., Abrams, G.A., & Bailey, S.M. (2011). Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(2): 447–459.
- Eckel, R., Grundy, S., & Zimmet, P.** (2005). The metabolic syndrome. *The Lancet*, 365(9468): 1415–1428.
- Ekstedt, M.**, Franzén, L.E., Mathiesen, U.L., Thorelius, L., Holmqvist, M., Bodemar, G., & Kechagias, S. (2006). Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*, 44(4): 865–873.

- Elks, C.M., Terrebbonne, J.D., Ingram, D.K., & Stephens, J.M. (2015).** Blueberries improve glucose tolerance without altering body composition in obese postmenopausal mice. *Obesity*, 23(3): 573–580.
- Escribano-Lopez, I., Diaz-Morales, N., Rovira-Llopis, S., de Marañon, A.M., Orden, S., Alvarez, A., Bañuls, C., Rocha, M., Murphy, M.P., Hernandez-Mijares, A., & Victor, V.M. (2016).** The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ modulates oxidative stress, inflammation and leukocyte-endothelium interactions in leukocytes isolated from type 2 diabetic patients. *Redox Biology*, 10(1): 200–205.
- Estabrook, R.W. (1967).** Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:o ratios. *Methods in Enzymology*, 10(1): 41–47.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., & Grodsky, G.M. (2002).** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23(5): 599–622.
- Fabbrini, E., Sullivan, S., & Klein, S. (2010).** Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51(2): 679–689.
- Farrell, G.C., Wong, V.W.S., & Chitturi, S. (2013).** NAFLD in Asia - as common and important as in the West. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(5): 307–318.
- Federico, A., Zulli, C., Sio, I. de, Prete, A. Del, Dallio, M., Masarone, M., Federico, A., Zulli, C., Sio, I. de, & Del, A. (2014).** Focus on emerging drugs for the treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(45): 16841–16857.
- Fernandes, M.A.S., Custódio, J.B.A., Santos, M.S., Moreno, A.J.M., & Vicente, J.A.F. (2006).** Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat liver mitochondria from oxidative stress. *Mitochondrion*, 6(4): 176–185.
- Ferreira, F.M., Peixoto, F.P., Nunes, E., Sena, C., Seica, R., & Santos, M.S. (2010).** Vaccinium myrtillus improves liver mitochondrial oxidative phosphorylation of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(8): 692–696.
- Fiorini, F., Raffa, M., Patrone, E., & Castelluccio, A. (1994).** Glucose metabolism and chronic renal insufficiency. *Archivio Italiano di Urologia, Andrologia*, 66(1): 51–56.
- Fiuza, M., Cortez-Dias, N., & Martins, S. (2008).** Síndrome metabólica em Portugal: prevalência e implicações no risco cardiovascular - Resultados do estudo VALSIM. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 27(12): 1495–1529.
- Fowler, M.J. (2008).** Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes*, 26(2): 77–82.
- Friedman, S. (2000).** Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4): 2247–2250.
- Frohlich, J. & Steiner, G. (2000).** Dyslipidaemia and coagulation defects of insulin resistance. *International Journal of Clinical Practice*, 1(113): 14–22.
- Galgani, J. & Ravussin, E. (2009).** Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. *International Journal of Obesity*, 32(7): 109–119.
- Galloway, C.A. & Yoon, Y. (2013).** Mitochondrial morphology in metabolic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(4): 415–430.
- Garcia-Compean, D., Jaquez-Quintana, J.O., Gonzalez-Gonzalez, J.A., & Maldonado-Garza, H. (2009).** Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World Journal of Gastroenterology*, 15(3): 280–288.
- Gazzotti, P., Malmstrom, K., & Crompton, M. (1979).** Preparation and assay of animal mitochondria & submitochondrial vesicles. *Membrane Biochemistry*, 1(1): 62–76.
- Gems, D. & Partridge, L. (2008).** Stress-response hormesis and aging: “That which does not kill us makes us stronger.” *Cell Metabolism*, 7(3): 200–203.
- Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., Van Heek, M., & Hwa, J.J. (2002).** Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. *Obesity Research*, 10(9): 956–963.
- Giestas, S., Giestas, A., & Agostinho, C. (2015).** Doença hepática e diabetes mellitus – uma relação bi-direcional. *Revista Portuguesa de Diabetes*, 10(4): 158–166.

- Giorelli, G. de V., Matos, L.N. de, Saado, A., Soibelman, V.L., & Dias, C.B. (2015).** No association between 25-hydroxyvitamin D levels and prediabetes in Brazilian patients. A cross-sectional study. *Sao Paulo Medical Journal*, 133(2): 73–77.
- Giovanelli, G. & Buratti, S. (2009).** Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, 112(4): 903–908.
- Gloyn, A.L., Tribble, N.D., van de Bunt, M., Barrett, A., & Johnson, P.R. V (2008).** Glucokinase (GCK) and other susceptibility genes for beta-cell dysfunction: the candidate approach. *Biochemical Society Transactions*, 36(3): 306–11.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., & David, M.M. (1949).** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177(2): 751–766.
- Grace, M.H., Esposito, D., Dunlap, K.L., & Lila, M.A. (2014).** Comparative analysis of phenolic content and profile, antioxidant capacity, and anti-inflammatory bioactivity in wild Alaskan and commercial *Vaccinium* berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18): 4007–4017.
- Grace, M.H., Ribnicky, D.M., Kuhn, P., Poulev, A., Logendra, S., Yousef, G.G., Raskin, I., & Lila, M.A. (2009).** Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*, 16(5): 406–415.
- Grattagliano, I., de Bari, O., Bernardo, T.C., Oliveira, P.J., Wang, D.Q.H., & Portincasa, P. (2012).** Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease—from origin to propagation. *Clinical Biochemistry*, 45(9): 610–618.
- Griffin, M.E., Marcucci, M.J., Cline, G.W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L.J., Kraegen, E.W., White, M.F., & Shulman, G.I. (1999).** Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*, 48(6): 1270–4.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V, Puri, V., Czech, M.P., Guilherme, A., Virbasius, J. V, Virbasius, J. V, Puri, V., Puri, V., Czech, M.P., & Czech, M.P. (2008).** Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(5): 367–377.
- Guiu, B., Loffroy, R., Ben Salem, D., Masson, D., Hervé, G., Petit, J.M., Krausé, D., & Cercueil, J.P. (2007).** Stéatose hépatique et séquence phase-opposition de phase: aspects théoriques et applications pratiques à 3T. *Journal de Radiologie*, 88(12): 1845–1853.
- Gunter, T.E., Gunter, K.K., Sheu, S.S., & Gavin, C.E. (1994).** Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *The American Journal of Physiology*, 267(2): C313–C339.
- Gunter, T.E. & Gunter, K.K. (2002).** Uptake of calcium by mitochondria: transport and possible function. *IUBMB Life*, 52(3): 197–204.
- Guo, H., Xia, M., Zou, T., Ling, W., Zhong, R., & Zhang, W. (2012).** Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(4): 349–360.
- Gustafson, S.J., Dunlap, K.L., McGill, C.M., & Kuhn, T.B. (2012).** A nonpolar blueberry fraction blunts NADPH oxidase activation in neuronal cells exposed to tumor necrosis factor- α . *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012(1): 1–12.
- Guven, A., Yavuz, O., Cam, M., Ercan, F., Bukan, N., Comunoglu, C., & Gokce, F. (2006).** Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. *Acta Histochemica*, 108(2): 85–93.
- Halestrap, A.P. & Pasdois, P. (2009).** The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(11): 1402–1415.
- Hallows, W., Yu, W., Smith, B., & Devires, M. (2011).** Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Molecular Cell*, 41(2): 139–149.
- Haque, M. & Sanyal, A.J. (2002).** The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 16(5): 709–731.
- Hatefi, Y. (1985).** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1): 1015–1069.

- Head, B.**, Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S., & Van Der Blik, A.M. (2009). Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 187(7): 959–966.
- Heinonen, I.M.**, Meyer, A.S., & Frankel, E.N. (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10): 4107–4112.
- Hensley, K.**, Robinson, K. a, Gabbita, S.P., Salsman, S., & Floyd, R. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10): 1456–1462.
- Hernandez-Mijares, A.**, Rocha, M., Apostolova, N., Borrás, C., Jover, A., Banuls, C., Sola, E., & Victor, V.M. (2011). Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(10): 1215–1221.
- Heyman, L.**, Axling, U., Blanco, N., Sterner, O., Holm, C., & Berger, K. (2014). Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J mice. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2014(1): 1–12.
- Hirschey, M.**, Shimazu, T., & Jin, E. (2011). SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Molecular Cell*, 44(2): 177–190.
- Hirschey, M.D.**, Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., & Al, E. (2010). SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*, 464(7285): 121–125.
- Hoeks, J.**, Hesselink, M.K.C., Russell, a P., Mensink, M., Saris, W.H.M., Mensink, R.P., & Schrauwen, P. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and insulin resistance: acute effect of fatty acids. *Diabetologia*, 49(10): 2419–26.
- Hoggard, N.**, Cruickshank, M., Moar, K.M., Bestwick, C., Holst, J.J., Russell, W., & Horgan, G. (2013). A single supplement of a standardised bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract (36 % wet weight anthocyanins) modifies glycaemic response in individuals with type 2 diabetes controlled by diet and lifestyle. *Journal of Nutritional Science*, 2(1): 1–9.
- Hooper, P.L.**, Hooper, P.L., Tytell, M., & Vigh, L. (2010). Xenohormesis: health benefits from an eon of plant stress response evolution. *Cell Stress and Chaperones*, 15(6): 761–770.
- Horton, J.D.**, Goldstein, J.L., & Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9): 1125–31.
- Howitz, K.T. & Sinclair, D.A.** (2008). Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. *Cell*, 133(3): 387–391.
- Hu, F.B.** (2013). Resolved: There is sufficient scientific evidence that decreasing sugar-sweetened beverage consumption will reduce the prevalence of obesity and obesity-related diseases. *Obesity Reviews*, 14(8): 606–619.
- Huang, W.**, Yan, Z., Li, D., Ma, Y., Zhou, J., & Sui, Z. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory effects of blueberry anthocyanins on high glucose-induced human retinal capillary endothelial cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(1): 1–10.
- IDF (2015)**. IDF Diabetes Atlas. *International Diabetes Federation*, (7th Edition): 1–163.
- IDF (2017)**. IDF Diabetes Atlas. *International Diabetes Federation*, (8th Edition): 1–148.
- Iozzo, P.**, Bucci, M., Roivainen, A., Nagren, K., Jarvisalo, M.J., Kiss, J., Guiducci, L., Fielding, B., Naum, A.G., Borra, R., Virtanen, K., Savunen, T., Salvadori, P.A., Ferrannini, E., Knuuti, J., & Nuutila, P. (2010). Fatty acid metabolism in the liver, measured by positron emission tomography, is increased in obese individuals. *Gastroenterology*, 139(3): 846–856.
- Irani, K.** (2000). Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. *Circulation Research*, 87(3): 179–183.
- Islam, M.S. & Loots, D.T.** (2009). Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 31(4): 249–261.
- Jensen, B.D. & Gunter, T.R.** (1984). The use of tertaphenylphosphonium (TPP+) to measure membrane potentials in mitochondria: membrane binding and respiratory effects. *Biophysical Journal*, 45(2): A92–A92.

- Jing, E., Emanuelli, B., Hirschev, M.D., Boucher, J., Lee, K.Y., Lombard, D., Verdin, E.M., & Kahn, C.R. (2011).** Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35): 14608–14613.
- Johnson, E.F., Palmer, C.N., Griffin, K.J., & Hsu, M.H. (1996).** Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in cytochrome P450 4A gene regulation. *The FASEB Journal*, 10(11): 1241–1248.
- Johnson, M., De Mejia, E., Fan, J., Lila, M., & Yousef, G. (2013).** Anthocyanins and proanthocyanidins from blueberry-blackberry fermented beverages inhibit markers of inflammation in macrophages and carbohydrate-utilizing enzymes in vitro. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(7): 1182–1197.
- Johnston, S.L., Souter, D.M., Tolkamp, B.J., Gordon, I.J., Illius, A.W., Kyriazakis, I., & Speakman, J.R. (2007).** Intake compensates for resting metabolic rate variation in female C57BL/6J mice fed high-fat diets. *Obesity*, 15(3): 600–606.
- Joseph, J.A., Arendash, G., Gordon, M., Diamond, D., Morgan, D., Denisova, N.A., Arendash, G., Gordon, M., & Diamond, D. (2003).** Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an alzheimer disease model. *Nutritional Neuroscience*, 6(3): 153–162.
- Jou, J., Choi, S.S., & Diehl, A.M. (2008).** Mechanisms of Disease Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*, 28 370–379.
- Joven, J., Espinel, E., Rull, A., Aragonès, G., Rodríguez-Gallego, E., Camps, J., Micol, V., Herranz-López, M., Menéndez, J.A., Borrás, I., Segura-Carretero, A., Alonso-Villaverde, C., & Beltrán-Debón, R. (2012).** Plant-derived polyphenols regulate expression of miRNA paralogs miR-103/107 and miR-122 and prevent diet-induced fatty liver disease in hyperlipidemic mice. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(7): 894–899.
- Kalt, W., Hanneken, A., Milbury, P., & Tremblay, F. (2010).** Recent research on polyphenolics in vision and eye health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7): 4001–4007.
- Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R., & Kobatake, Y. (1979).** Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *The Journal of Membrane Biology*, 49(2): 105–121.
- Kaneto, H. & Matsuoka, T. aki (2012).** Involvement of oxidative stress in suppression of insulin biosynthesis under diabetic conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(10): 13680–13690.
- Kang, J., Thakali, K., Jensen, G., & Wu, X. (2015).** Phenolic acids of the two major blueberry species in the US Market and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(1): 56–62.
- Kashyap, S.R., Belfort, R., Berria, R., Suraamornkul, S., Pratipranawat, T., Finlayson, J., Barrentine, A., Bajaj, M., Mandarino, L., DeFronzo, R., & Cusi, K. (2004).** Discordant effects of a chronic physiological increase in plasma FFA on insulin signaling in healthy subjects with or without a family history of type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287(3): E537-546.
- Kashyap, S.R. & Defronzo, R.A. (2007).** The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 4(1): 13–19.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., & Kobori, M. (2003).** Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1): 68–75.
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y., & Komatsu, M. (2015).** P62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *The FEBS Journal*, 282(24): 4672–4678.
- Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M., & Natori, T. (1992).** Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, 41(11): 1422–1428.
- Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E. V, & Ritov, V.B. (2002).** Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(10): 2944–2950.

- Kelley, D.E.,** Mokan, M., Simoneau, J.-A., & Mandarino, L.J. (1993). Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 92(1): 91.
- Kelley, D.E. & Mandarino, L.J. (1990).** Hyperglycaemia normalizes insulin-stimulated skeletal muscle glucose oxidation and storage in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 86(6): 1999–2007.
- Kendrick, A.A.,** Choudhury, M., Rahman, S.M., McCurdy, C.E., Friederich, M., Van Hove, J.L.K., Watson, P.A., Birdsey, N., Bao, J., Gius, D., Sack, M.N., Jing, E., Kahn, C.R., Friedman, J.E., & Jonscher, K.R. (2011). Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. *Biochemical Journal*, 433 505–514.
- Kierszenbaum, A. (2002).** Histology and cell biology - an introduction to pathology. *Mosby Publishers*, 1(1): 1–720.
- Kim, J.H.,** Nishina, P.M., & Naggert, J.K. (1998). Genetic models for non insulin dependent diabetes mellitus in rodents. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 9(2–4): 325–345.
- Kim, W.R.,** Poterucha, J.J., Porayko, M.K., Dickson, E.R., Steers, J.L., & Wiesner, R.H. (1996). Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis following liver transplantation. *Transplantation*, 62(12): 1802–1805.
- King, A. (2012).** The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3): 877–894.
- King, A. & Bowe, J. (2015).** Animal models for diabetes: understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochemical Pharmacology*, 1(1): 1–10.
- Kobak, G.E.,** Dahl, R., Devereaux, M.W., Gumprich, E., Traber, M., Doctor, R.B., & Sokol, R.J. (2005). Increased susceptibility of fat-laden Zucker-rat hepatocytes to bile acid-induced oncotic necrosis: an in vitro model of steatocholestasis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 145(5): 247–262.
- Kolehmainen, M.,** Mykkänen, O., Kirjavainen, P. V., Leppänen, T., Moilanen, E., Adriaens, M., Laaksonen, D.E., Hallikainen, M., Puupponen-Pimiä, R., Pulkkinen, L., Mykkänen, H., Gylling, H., Poutanen, K., & Törrönen, R. (2012). Bilberries reduce low-grade inflammation in individuals with features of metabolic syndrome. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(10): 1501–1510.
- Koliaki, C.,** Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W.T., Schlensak, M., & Roden, M. (2015). Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 21(5): 739–746.
- Kotronen, A.,** Seppälä-Lindroos, A., Bergholm, R., & Yki-Järvinen, H. (2008). Tissue specificity of insulin resistance in humans: fat in the liver rather than muscle is associated with features of the metabolic syndrome. *Diabetologia*, 51(1): 130–138.
- Kowaltowski, A.J.,** Castilho, R.F., & Vercesi, A.E. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters*, 495(1–2): 12–15.
- Krikorian, R.,** Shidler, M.D., Nash, T.A., Kalt, W., Vinqvit-Tymchuk, M.R., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J.A. (2010). Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7): 3996–4000.
- Kristal, B.S.,** Matsuda, M., & Yu, B.P. (1996). Abnormalities in the mitochondrial permeability transition in diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222(2): 519–523.
- Kröner, H. (1986).** Ca²⁺ ions, an allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(2): 525–535.
- Kulkarni, S.S.,** Joffraud, M., Boutant, M., Ratajczak, J., Gao, A.W., Maclachlan, C., Hernandez-Alvarez, M.I., Raymond, F., Metairon, S., Descombes, P., Houtkooper, R.H., Zorzano, A., & Cantó, C. (2016). Mfn1 deficiency in the liver protects against diet-induced insulin resistance and enhances the hypoglycemic effect of metformin. *Diabetes*, 65(12): 3552–3560.
- Kuntz, E. & Kuntz, H.-D. (2008).** *Hepatology Textbook and Atlas*, 1(1): 937

- Kytövuori, L.,** Lipponen, J., Rusanen, H., Komulainen, T., Martikainen, M.H., & Majamaa, K. (2016). A novel mutation m.8561CG in MT-ATP6/8 causing a mitochondrial syndrome with ataxia, peripheral neuropathy, diabetes mellitus, and hypergonadotropic hypogonadism. *Journal of Neurology*, 263(11): 2188–2195.
- Lambadiari, V.,** Triantafyllou, K., & Dimitriadis, G.D. (2015). Insulin action in muscle and adipose tissue in type 2 diabetes: the significance of blood flow. *World Journal of Diabetes*, 6(4): 626–33.
- Lammens, M. & Laak, H. (2004).** Contribution of histopathological examination to the diagnosis of OXPHOS disorders. *Oxidative Phosphorylation in Health and Disease*, 1(1): 53–78.
- Larter, C.Z. & Farrell, G.C. (2006).** Insulin resistance, adiponectin, cytokines in NASH: Which is the best target to treat? *Journal of Hepatology*, 44(2): 253–261.
- Lau, C.,** Toft, U., Tetens, I., Carstensen, B., Jørgensen, T., Pedersen, O., & Borch-Johnsen, K. (2009). Dietary patterns predict changes in two-hour post-oral glucose tolerance test plasma glucose concentrations in middle-aged adults. *The Journal of Nutrition*, 139(3): 588–93.
- Lazo, M. & Mejía, C. (2013).** Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. *Agricultural and Biological Sciences*, 9(1): 209–231.
- Leal, A.M.O. & Voltarelli, J.C. (2010).** Perspectivas da terapia com células-tronco para o diabetes mellitus tipo 2. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32(4): 329–334.
- Leclercq, I.A.,** Da Silva Morais, A., Schroyen, B., Van Hul, N., & Geerts, A. (2007). Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *Journal of Hepatology*, 47(1): 142–156.
- Lee, Y.S.,** Kim, A.Y., Choi, J.W., Kim, M., Yasue, S., Son, H.J., Masuzaki, H., Park, K.S., & Kim, J.B. (2008). Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Molecular Endocrinology*, 22(9): 2176–2189.
- Leininger, G.,** Edwards, J., Lipshaw, M., & Feldman, E. (2006). Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nature Reviews Neurology*, 2(11): 620–628.
- Lenzen, S. (2008).** Oxidative stress: the vulnerable β -cell. *Biochemical Society Transactions*, 36(3): 343–347.
- Lenzen, S. (2008).** The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2): 216–226.
- Levinthal, G.N. & Tavill, A.S. (1999).** Liver disease and diabetes mellitus. *Clinical Diabetes*, 17(2): 1–19.
- Lewis, G.,** Carpentier, A., Adeli, K., & Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23(2): 201–229.
- Lewis, J.R. & Mohanty, S.R. (2010).** Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(3): 560–578.
- Li, D.,** Zhang, Y., Liu, Y., Sun, R., & Xia, M. (2015). Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients. *Journal of Nutrition*, 145(4): 742–748.
- Liangyou, R. (2014).** Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1): 177–197.
- Liesa, M. & Shirihai, O.S. (2013).** Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.*, 17(4): 491–506.
- Lírio, L.M.,** Forechi, L., Zanardo, T.C., Batista, H.M., Meira, E.F., Nogueira, B.V., Mill, J.G., & Baldo, M.P. (2016). Chronic fructose intake accelerates non-alcoholic fatty liver disease in the presence of essential hypertension. *Journal of Diabetes and its Complications*, 30(1): 85–92.
- Liu, R.H.,** Mizuta, M., Kurose, T., & Matsukura, S. (2002). Early events involved in the development of insulin resistance in Zucker fatty rat. *International Journal of Obesity*, 26(3): 318–326.
- Lombard, D.B.,** Alt, F.W., Cheng, H.-L., Bunkenborg, J., Streeper, R.S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M.D., Bronson, R.T., Haigis, M., Guarente, L.P., Farese, R. V., Weissman, S., Verdin, E., & Schwer, B. (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(24): 8807–8814.

- Loria, P.,** Lonardo, A., & Anania, F. (2013). Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatology Research*, 43(1): 51–64.
- Lupsor, M. & Badea, R. (2005).** Imaging diagnosis and quantification of hepatic steatosis: is it an accepted alternative to needle biopsy? *Romanian Journal of Gastroenterology*, 14(4): 419–425.
- Madeira, V. (1975).** A rapid and ultrasensitive method to measure Ca⁺⁺ movements across biological membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 64(3): 870–876.
- Maechler, P. & Wollheim, C.B. (2001).** Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature*, 414(6865): 807.
- Malik, V.S.,** Popkin, B.M., Bray, G.A., Despres, J.-P., Willett, W.C., & Hu, F.B. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(11): 2477–24783.
- Malpass, K. (2013).** Neurodegenerative disease: defective mitochondrial dynamics in the hot seat - a therapeutic target common to many neurological disorders? *Nature Reviews Neurology*, 9(8): 417.
- Manley, S.,** Williams, J.A., & Ding, W.X. (2013). Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis. *Experimental Biology and Medicine*, 238(5): 525–538.
- Manna, P.,** Das, J., Ghosh, J., & Sil, P.C. (2010). Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IκBα/NF-κB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(11): 1465–1484.
- Manning, P.J.,** Sutherland, W.H.F., McGrath, M.M., De Jong, S.A., Walker, R.J., & Williams, M.J.A. (2008). Postprandial cytokine concentrations and meal composition in obese and lean women. *Obesity*, 16(9): 2046–2052.
- Marchesini, G.,** Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A.J., Natale, S., Forlani, G., & Melchionda, N. (2001). Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes*, 50(8): 1844–1850.
- Marques, C.,** Meireles, M., Norberto, S., Leite, J., Freitas, J., Pestana, D., Faria, A., & Calhau, C. (2016). High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*, 5(1): 11–21.
- Martin, R.J. (1974).** In vivo lipogenesis and enzyme levels in adipose and liver tissues from paired genetically obese and lean rats. *Life Sciences*, 14(8): 1447–1453.
- Martineau, L.C.,** Couture, A., Spoor, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Harris, C., Meddah, B., Leduc, C., Burt, A., Vuong, T., Le, P.M., Prentki, M., Bennett, S.A., Arnason, J.T., & Haddad, P.S. (2006). Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. *Phytomedicine*, 13(9): 612–623.
- Masharani, U. & German, M. (2011).** Pancreatic hormones and diabetes mellitus. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, 8(1): 573–656.
- Masini, A.,** Ceccarelli-Stanzani, D., & Muscatello, U. (1984). An investigation on the effect of oligomycin on state-4 respiration in isolated rat-liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 767(1): 130–137.
- Mayerson, A.B.,** Hundal, R.S., Dufour, S., Lebon, V., Befroy, D., Cline, G.W., Enocksson, S., Inzucchi, S.E., Shulman, G.I., & Petersen, K.F. (2002). The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(3): 797–802.
- McGilvery, R. (1979).** Biochemistry: a functional approach. *In Biochemistry*, 415(32): 1–862.
- Memon, R.A.,** Grunfeld, C., Moser, A.H., & Feingold, K.R. (1994). Fatty acid synthesis in obese insulin resistant diabetic mice. *Hormone and Metabolic Research*, 26(2): 85–87.
- Michael, M.D.,** Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., & Kahn, C.R. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Molecular Cell*, 6(1): 87–97.
- Miele, L.,** Grieco, A., Armuzzi, A., Candelli, M., Forgione, A., Gasbarrini, A., & Gasbarrini, G. (2003). Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by 13 C-octanoate breath test. *The American Journal of Gastroenterology*, 98(10): 2335–2336.

- Mirfeizi, M.**, Mehdizadeh Tourzani, Z., Mirfeizi, S.Z., Asghari Jafarabadi, M., Rezvani, H.R., & Afzali, M. (2016). Controlling type 2 diabetes mellitus with herbal medicines: A triple-blind randomized clinical trial of efficacy and safety. *Journal of Diabetes*, 8 647–656.
- Mitchell, P.** (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews*, 41(3): 445–501.
- Mizuno, C.S. & Rimando, A.M.** (2009). Blueberries and metabolic syndrome. *Silpakorn University Science and Technology Journal*, 3(2): 7–17.
- Mizushima, N. & Komatsu, M.** (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4): 728–41.
- Molan, A.L.**, Lila, A.L., Mawson, J., & De, S. (2009). In vitro and in vivo evaluation of the prebiotic activity of water-soluble blueberry extracts. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 25(7): 1243–1249.
- Molan, A.L.**, Lila, M.A., & Mawson, J. (2008). Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 107(3): 1039–1044.
- Mootha, V.K.**, Bunkenborg, J., Olsen, J. V, Hjerrild, M., Wisniewski, J.R., Stahl, E., Bolouri, M.S., Ray, H.N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E.S., & Mann, M. (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, 115(5): 629–640.
- Moreno-Indias, I. & Tinahones, F.J.** (2015). Impaired adipose tissue expandability and lipogenic capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *Journal of Diabetes Research*, 2015(1): 1–12.
- Muoio, D.M. & Newgard, C.B.** (2008). Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3): 193–205.
- Muratsugu, M., Kamo, N., Kurihara, K., & Kobatake, Y.** (1977). Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 464(3): 613–619.
- Murphy, M.P.** (1989). Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 977(2): 123–141.
- Mykkänen, O.T.**, Huotari, A., Herzig, K.H., Dunlop, T.W., Mykkänen, H., & Kirjavainen, P. V. (2014). Wild blueberries (*Vaccinium myrtillus*) alleviate inflammation and hypertension associated with developing obesity in mice fed with a high-fat diet. *PLOS ONE*, 9(12): e114790.
- Nachman-Clewner, M.**, Giblin, F.J., Dorey, C.K., Blanks, R.H.I., Dang, L., Dougherty, C.J., & Blanks, J.C. (2008). Selective degeneration of central photoreceptors after hyperbaric oxygen in normal and metallothionein-knockout mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(7): 3207–3215.
- Nair, A.R.**, Elks, C.M., Vila, J., Del Piero, F., Paulsen, D.B., & Francis, J. (2014). A blueberry-enriched diet improves renal function and reduces oxidative stress in metabolic syndrome animals: potential mechanism of TLR4-MAPK signaling pathway. *PLOS ONE*, 9(11): e111976.
- Nassir, F. & Ibdah, J.** (2014). Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5): 8713–8742.
- Neto, C.C.** (2007). Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(6): 652–664.
- Nicholls, D.** (1982). Bioenergetics - an introduction to the chemiosmotic theory. *Acedemic Press, New York*, 1(1): 190.
- Nile, S.H. & Park, S.W.** (2014). Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2): 134–144.
- Nishikawa, T.**, Edelstein, D., & Brownlee, M. (2000). The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International*, 58(1): S26–S30.
- Nisoli, E.** (2003). Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, 299(5608): 896–899.

- Noratto, G.,** Martino, H.S.D., Simbo, S., Byrne, D., & Mertens-Talcott, S.U. (2015). Consumption of polyphenol-rich peach and plum juice prevents risk factors for obesity-related metabolic disorders and cardiovascular disease in Zucker rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(6): 633–641.
- Noratto, G.D.,** Chew, B.P., & Atienza, L.M. (2017). Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetic (db/db) mice. *Food Chemistry*, 227(1): 305–314.
- Norberto, S.,** Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., & Calhau, C. (2013). Blueberry anthocyanins in health promotion: a metabolic overview. *Journal of Functional Foods*, 5(4): 1518–1528.
- Nouette-Gaulain, K.,** Quinart, A., Letellier, T., & Sztark, F. (2007). Mitochondria in anaesthesia and intensive care. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*, 26(1): 319–333.
- Nunes, S.,** Soares, E., Fernandes, J., Viana, S., Carvalho, E., Pereira, F.C., & Reis, F. (2013). Early cardiac changes in a rat model of prediabetes: brain natriuretic peptide overexpression seems to be the best marker. *Cardiovascular Diabetology*, 12(1): 1–11.
- Nunes, S.,** Soares, E., Pereira, F., & Reis, F. (2012). The role of inflammation in diabetic cardiomyopathy. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 4(1): 59–73.
- Olichon, A.,** Guillou, E., & Delettre, C. (2006). Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(1): 500–509.
- Oliveira, P.J.,** Rolo, A.P., Seça, R., Palmeira, C.M., Santos, M.S., & Moreno, A.J. (2001). Decreased susceptibility of heart mitochondria from diabetic GK rats to mitochondrial permeability transition induced by calcium phosphate. *Bioscience reports*, 21(1): 45–53.
- Orchard, T.J.,** Temprosa, M., Goldberg, R., Haffner, S., Ratner, R., Marcovina, S., & Fowler, S. (2005). The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 142(8): 611–619.
- Pagliassotti, M.,** Prach, P., Koppenhafer, T., & Pan, D. (1996). Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory*, 271(5): 1319–1326.
- Palikaras, K.,** Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2015). Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature*, 521(7553): 525–528.
- Palmeira, C.M.,** Rolo, A.P., Berthiaume, J., Bjork, J.A., & Wallace, K.B. (2007). Hyperglycemia decreases mitochondrial function: the regulatory role of mitochondrial biogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(2): 214–220.
- Palmeira, C.M.,** Moreno, A.J., & C, M.V.M. (1994). Interactions of herbicides 2,4-D and dinosod with liver mitochondrial bioenergetics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 127(1): 50–57.
- Palmeira, C.M. & Wallace, K.B. (1997).** Benzoquinone inhibits the voltage-dependent induction of the mitochondrial permeability transition caused by redox-cycling naphthoquinones. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143(2): 338–347.
- Palsamy, P.,** Sivakumar, S., & Subramanian, S. (2010). Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 186(2): 200–210.
- Paltauf-Doburzynska, J.,** Malli, R., & Graier, W.F. (2004). Hyperglycemic conditions affect shape and Ca²⁺ homeostasis of mitochondria in endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 44(4): 423–436.
- Panchal, S.,** Poudyal, H., Iyer, A., & Nazer, R. (2010). High-carbohydrate Diet – induced and high-fat diet – induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57(1): 611–624.
- Parola, M. & Robino, G. (2001).** Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, 35(2): 297–306.

- Patterson, R.E.**, Kalavalapalli, S., Williams, C.M., Nautiyal, M., Mathew, J.T., Martinez, J., Reinhard, M.K., McDougall, D.J., Rocca, J.R., Yost, R.A., Cusi, K., Garrett, T.J., & Sunny, N.E. (2016). Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 310(7): E484–E494.
- Pereira, C.**, Moreira, A., Pereira, S., Machado, N., Carvalho, F., Sardao, V., & Oliveira, P. (2009). Investigating drug-induced mitochondrial toxicity: a biosensor to increase drug safety? *Current Drug Safety*, 4(1): 34–54.
- Pérez-Carreras, M.**, Del Hoyo, P., Martín, M.A., Rubio, J., Martín, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J., & Solis-Herruzo, J. (2003). Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 38(4): 999–1007.
- Pessayre, D.** (2007). Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(1): S20–S27.
- Pessayre, D. & Fromenty, B.** (2005). NASH: A mitochondrial disease. *Journal of Hepatology*, 42(6): 928–940.
- Petrosillo, G.**, Matera, M., Casanova, G., Ruggiero, F.M.M., & Paradies, G. (2008). Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochemistry International*, 53(5): 126–31.
- Podolin, D.**, Gayles, E., Wei, Y., Thresher, J., & Pagliassoti, M. (1998). Menhaden oil prevents but does not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory*, 274(3): 840–848.
- Poitout, V. & Robertson, R.P.** (2008). Glucolipototoxicity: fuel excess and β -cell dysfunction. *Endocrine Reviews*, 29(3): 351–366.
- Poli, G.** (2000). Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(3): 49–98.
- Pratley, R.E.** (2013). The early treatment of type 2 diabetes. *The American Journal of Medicine*, 126(9): S2–S9.
- Preston, C.C.**, Oberlin, A.S., Holmuhamedov, E.L., Gupta, A., Sagar, S., Syed, R.H., Siddiqui, S.A., Raghavakaimal, S., Terzic, A., & Jahangir, A. (2008). Aging-induced alterations in gene transcripts and functional activity of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes in the heart. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(6): 304–312.
- Prior, R.L.**, Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., Brien, C.O., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., & Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of Vaccinium species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7): 2686–2693.
- Prior, R.L.**, Wilkes, S.E., Rogers, T.R., Khanal, R.C., Wu, X., & Howard, L.R. (2010). Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7): 3970–3976.
- Prior, R.L.**, Wu, X., Gu, L., Hager, T.J., Hager, A., & Howard, L.R. (2008). Whole berries versus berry anthocyanins: Interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3): 647–653.
- Puskin, J.S.**, Gunter, T.E., Gunter, K.K., & Russell, P.R. (1976). Evidence for more than one Ca²⁺ transport mechanism in mitochondria. *Biochemistry*, 15(17): 3834–3842.
- Qiu, X.**, Brown, K., Hirschey, M.D., Verdin, E., & Chen, D. (2010). Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metabolism*, 12(6): 662–667.
- Quirós, P.M.**, Ramsay, A.J., Sala, D., Fernández-Vizarra, E., Rodríguez, F., Peinado, J.R., Fernández-García, M.S., Vega, J.A., Enríquez, J.A., Zorzano, A., & López-Otín, C. (2012). Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. *The EMBO Journal*, 31(9): 2117–2133.
- Van Raamsdonk, J.M. & Hekimi, S.** (2012). Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15): 5785–5790.
- Rachek, L.I.**, Yuzefovych, L. V, Ledoux, S.P., Julie, N.L., & Wilson, L. (2009). Troglitazone, but not Rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3): 348–354.

- Radonjic, M.,** De Haan, J.R., Van Erk, M.J., Van Dijk, K.W., Van den Berg, S.A.A., De Groot, P.J., Müller, M., & Van Ommen, B. (2009). Genome-wide mRNA expression analysis of hepatic adaptation to high-fat diets reveals switch from an inflammatory to steatotic transcriptional program. *PLOS ONE*, 4(8): e6646.
- Ragab, S.,** Elghaffar, S., El-Metwally, T., Badr, G., Mahmoud, M., & Omar, H. (2015). Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. *Lipids in Health and Disease*, 14(1): 83.
- Ram, J.,** Snehalatha, C., Nanditha, A., Selvam, S., Shetty, S.A., Godsland, I.F., Johnston, D.G., & Ramachandran, A. (2014). Hypertriglyceridaemic waist phenotype as a simple predictive marker of incident diabetes in Asian-Indian men with prediabetes. *Diabetic Medicine*, 31(12): 1542–1549.
- Ramlo-Halsted, B.A. & Edelman, S. V. (1999).** The natural history of type 2 diabetes: implications for clinical practice. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 26(4): 771–790.
- Randle, P.,** Garland, P., & Hales, C. (1963). The glucose fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *The Lancet*, 281(7285): 785–789.
- Rao, V.K.,** Carlson, E.A., & Yan, S.S. (2014). Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(8): 1267–1272.
- Rebello, C.,** Burton, J., Heiman, M., & Greenway, F. (2015). Gastrointestinal microbiome modulator improves glucose tolerance in overweight and obese subjects: a randomized controlled pilot trial. *Journal of Diabetes and its Complications*, 29(8): 1272–1276.
- Rector, R.S.,** Thyfault, J.P., Uptergrove, G.M., Morris, E.M., Naples, P., Borengasser, S.J., Mikus, C.R., Laye, M.J., Harold, M., Booth, F.W., Ibdah, J.A., Naples, S.P., Borengasser, S.J., Mikus, C.R., Laye, M.J., Laughlin, M.H., Booth, F.W., & Ibdah, J.A. (2010). Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *Journal of Hepatology*, 52(5): 727–736.
- Reddy, J.K. & Mannaerts, G.P. (1994).** Peroxisomal lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 14(1): 343–370.
- Redman, L.M.,** Heilbronn, L.K., Martin, C.K., Alfonso, A., Smith, S.R., & Ravussin, E. (2007). Effect of calorie restriction with or without exercise on body composition and fat distribution. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(3): 865–872.
- Rhodes, C.J. (2005).** Type 2 diabetes-a matter of β -cell life and death? *Science*, 307(5708): 380–384.
- Ribeiro, R.,** Lutt, W., Legare, D., & Macedo, M. (2005). Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia*, 48(5): 976–983.
- Ribeiro, T.,** Afonso, R.A., Guarino, M.P., & Macedo, M.P. (2008). Loss of postprandial insulin sensitization during aging. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(6): 560–565.
- Ricci, C.,** Pastukh, V., Leonard, J., Turrens, J., Wilson, G., Schaffer, D., & Schaffer, S.W. (2008). Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294(2): C413–C422.
- Rickwood, D.,** Wilson, M.T., & Darley-Usmar, V.M. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. *Mitochondria*, 1(1): 1–16.
- Riihinen, K.,** Jaakola, L., Kärenlampi, S., & Hohtola, A. (2008). Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and ‘northblue’ blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, 110(1): 156–160.
- Rimbert, V.,** Boirie, Y., Bedu, M., Hocquette, J.F., Ritz, P., & Morio, B. (2004). Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity. *The FASEB Journal*, 18(6): 737–739.
- Del Rio, D.,** Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14): 1818–1892.

- Rizzuto, R.**, Pinton, P., Ferrari, D., Chami, M., Szabadkai, G., Magalhães, P.J., Di Virgilio, F., & Pozzan, T. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*, 22(53): 8619–8627.
- Rizzuto, R.**, Duchen, M., & Pozzan, T. (2004). Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Science Signaling*, 2004(215): 1–9.
- Robertson, P.**, Harmon, J., Tran, P.O., Tanaka, Y., & Takahashi, H. (2003). Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, 52(3): 581–587.
- Rodrigues, P.M.**, Afonso, M.B., Simaõ, A.L., Carvalho, C.C., Trindade, A., Duarte, A., Borralho, P.M., MacHado, M. V., Cortez-Pinto, H., Rodrigues, C.M., & Castro, R.E. (2017). MiR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Cell Death and Disease*, 8(4): e2748.
- Rolo, A.P.**, Teodoro, J.S., & Palmeira, C.M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1): 59–69.
- Romagnoli, M.**, Gomez-Cabrera, M.C., Perrelli, M.G., Biasi, F., Pallardó, F. V., Sastre, J., Poli, G., & Viña, J. (2010). Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF- κ B and inflammation in the liver of type I diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(2): 171–177.
- Roopchand, D.E.**, Kuhn, P., Rojo, L.E., Lila, M.A., & Raskin, I. (2013). Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacological Research*, 68(1): 59–67.
- Rosen, P.**, Nawroth, P.P., King, G., Moller, W., Tritschler, H.J., & Packer, L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 17(3): 189–212.
- Rosen, P.**, Du, X., & Guang-Zhi, S. (2000). Oxidative stress in diabetes: why does hyperglycemia induce the formation of reactive oxygen species? *Oxidative Stress and Disease*, 4(1): 17–32.
- Rossetti, L.**, Giaccari, A., & DeFronzo, R.A. (1990). Glucose toxicity. *Diabetes Care*, 13(6): 610–630.
- Rovira-Llopis, S.**, Díaz-Morales, N., Bañuls, C., Blas-García, A., Polo, M., López-Domenech, S., Jover, A., Rocha, M., Hernández-Mijares, A., & Víctor, V.M. (2015). Is autophagy altered in the leukocytes of type 2 diabetic patients? *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(13): 1050–1056.
- Rovira-Llopis, S.**, Banuls, C., Diaz-Morales, N., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., & Victor, V.M. (2017). Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: pathophysiological implications. *Redox Biology*, 11(1): 637–645.
- Salgado, A.L.F.A.**, Carvalho, L., Oliveira, A.C., Santos, V.N., Vieira, J.G., & Parise, E.R. (2010). Insulin resistance index (HOMA-IR) in the differentiation of patients with non-alcoholic fatty liver disease and healthy individuals. *Arquivos de Gastroenterologia*, 47(2): 165–169.
- Samuel, V.T.**, Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J., & Shulman, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31): 32345–32353.
- Santel, A. & Fuller, M.T.** (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 5): 867–874.
- Sanyal, A.**, Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W., Contos, M., Sterling, R., Luketic, V., Shiffman, M., & Clore, J. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalitie. *Gastroenterology*, 120(5): 1183–1192.
- Sasakura, H.**, Moribe, H., Nakano, M., Ikemoto, K., Takeuchi, K., & Mori, I. (2017). Lifespan extension by peroxidase and dual oxidase-mediated ROS signaling through pyrroloquinoline quinone in *C. elegans*. *Journal of Cell Science*, 130(15): 2631–2643.
- Satapati, S.**, Sunny, N.E., Kucejova, B., Fu, X., He, T.T., Méndez-Lucas, A., Shelton, J.M., Perales, J.C., Browning, J.D., & Burgess, S.C. (2012). Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *Journal of Lipid Research*, 53(6): 1080–1092.

- Scerbak, C.,** Vayndorf, E., Hernandez, A., McGill, C., & Taylor, B. (2016). Mechanosensory neuron aging: differential trajectories with lifespan-extending alaskan berry and fungal treatments in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(1): 173.
- Schwer, B. & Verdin, E. (2008).** Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metabolism*, 7(1): 104–112.
- Scott, I.,** Webster, B.R., Chan, C.K., Okonkwo, J.U., Han, K., & Sack, M.N. (2014). GCN5-like protein 1 (GCN5L1) controls mitochondrial content through coordinated regulation of mitochondrial biogenesis and mitophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 289(5): 2864–2872.
- Sebastian, D.,** Hernandez-Alvarez, M.I., Segales, J., Sorianello, E., Munoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., Oresic, M., Pich, S., Burcelin, R., Palacin, M., & Zorzano, A. (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14): 5523–5528.
- Seeram, N.P. (2008).** Berry fruits : compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3): 627–629.
- Seppälä-Lindroos, A.,** Vehkavaara, S., Häkkinen, A.M., Goto, T., Westerbacka, J., Sovijärvi, A., Halavaara, J., & Yki-Järvinen, H. (2002). Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(7): 3023–3028.
- Sesaki, H. (2003).** Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Molecular Biology of the Cell*, 14(6): 2342–2356.
- Seymour, E.M.,** Tanone, I.I., Urcuyo-Llanes, D.E., Lewis, S.K., Kirakosyan, A., Kondoleon, M.G., Kaufman, P.B., & Bolling, S.F. (2011). Blueberry intake alters skeletal muscle and adipose tissue peroxisome proliferator-activated receptor activity and reduces insulin resistance in obese rats. *Journal of Medicinal Food*, 14(12): 1511–1518.
- Shenouda, S.M.,** Widlansky, M.E., Chen, K., Xu, G., Holbrook, M., Tabit, C.E., Hamburg, N.M., Frame, A.A., Caiano, T.L., Kluge, M.A., Duess, M.-A., Levit, A., Kim, B., Hartman, M.-L., Joseph, L., Shirihai, O.S., & Vita, J.A. (2011). Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation*, 124(4): 444–453.
- Shepherd, P.R. & Kahn, B.B. (1999).** Glucose transporters and insulin action - implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 341(4): 248–257.
- Sherwani, S.I.,** Khan, H.A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M.K. (2016). Significance of HbA1c test in diagnosis and prognosis of diabetic patients. *Biomarker Insights*, 11(1): 95–104.
- Sheth, S.G.,** Gordon, F.D., & Chopra, S. (1997). Nonalcoholic steatohepatitis. *Annals Internal Medicine*, 126(2): 137–145.
- Shi, M.,** Loftus, H., McAinch, A., & Su, X. (2017). Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes, and chronic inflammation. *Functional Foods*, 30(1): 16–29.
- Shimazu, T.,** Hirschey, M.D., Hua, L., Dittenhafer-Reed, K.E., Schwer, B., Lombard, D.B., Li, Y., Bunkenborg, J., Alt, F.W., Denu, J.M., Jacobson, M.P., & Verdin, E. (2010). SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metabolism*, 12(6): 654–661.
- Shimomura, I.,** Shimano, H., Korn, S., Bashmakov, Y., Horton, J.D., Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B.S., Bashmakov, Y., & Horton, J.D. (1998). Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(52): 35299–35306.
- Shulman, G.I. (2000).** Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(2): 171–176.
- Siersbaek, M.,** Varticovski, L., Yang, S., Baek, S., Nielsen, R., Mandrup, S., Hager, G.L., Chung, J.H., & Grontved, L. (2017). High fat diet-induced changes of mouse hepatic transcription and enhancer activity can be reversed by subsequent weight loss. *Scientific Reports*, 7.

- Silva, S.D.A.**, Antunes, L.E.C., Anthonisen, D.G., Lemões, J.S., & Gonçalves, E.D. (2008). Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30(1): 180–184.
- Silveira, N.G.Á.**, Vargas, P.N., & Rosa, C.S. (2007). Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbush. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18(4): 365–370.
- Simental-Mendía, L.E.**, Rodríguez-Morán, M., & Guerrero-Romero, F. (2015). The hypertriglyceridemia is associated with isolated impaired glucose tolerance in subjects without insulin resistance. *Endocrine Research*, 40(2): 70–73.
- Singh, P.**, Niemczyk, M., Zimniak, L., & Zimniak, P. (2008). Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* by the electrophilic lipid peroxidation product 4 - Hydroxynonenal (4 - HNE). *Aging (Albany NY)*, 1(1): 68–80.
- Skates, E.**, Overall, J., DeZego, K., Wilson, M., Esposito, D., Lila, M.A., & Komarnytsky, S. (2018). Berries containing anthocyanins with enhanced methylation profiles are more effective at ameliorating high fat diet-induced metabolic damage. *Food and Chemical Toxicology*, 111(1): 445–453.
- Skupień, K.** (2006). Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Folia Horticulturae*, 18(2): 47–56.
- Smith, B.W.** & **Adams, L.A.** (2011). Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: Pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(8): 456–465.
- Smith, M.A.L.**, Marley, K.A., Seigler, D., Singletary, K.W., & Meline, B. (2000). Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science*, 65(2): 352–356.
- Smith, U.**, Axelsen, M., Carvalho, E., Eliasson, B., Jansson, P.A., & Wesslau, C. (1999). Insulin signaling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 892(1): 119–126.
- Soares, E.**, Prediger, R.D., Nunes, S., Castro, A.A., Viana, S.D., Lemos, C., De Souza, C.M., Agostinho, P., Cunha, R.A., Carvalho, E., Fontes Ribeiro, C.A., Reis, F., & Pereira, F.C. (2013). Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. *Neuroscience*, 250(1): 565–577.
- SPD - Sociedade Portuguesa de Diabetologia** (2016). Diabetes - Factos e Números - O ano de 2015. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes - Edição de 2016. 0–67.
- Srivastava, A.**, Akoh, C.C., Fischer, J., & Krewer, G. (2007). Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8): 3180–3185.
- Storlien, L.H.**, Kraegen, E.W., Jenkins, A.B., & Chisholm, D.J. (1988). Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 47(3): 420–7.
- Stull, A.J.**, Cash, K.C., Johnson, W.D., Champagne, C.M., & Cefalu, W.T. (2010). Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *The Journal of Nutrition*, 140(10): 1764–1768.
- Stull, A.J.**, Cash, K.C., Champagne, C.M., Gupta, A.K., Boston, R., Beyl, R.A., Johnson, W.D., & Cefalu, W.T. (2015). Blueberries improve endothelial function, but not blood pressure, in adults with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutrients*, 7(6): 4107–4123.
- Stumvoll, M.**, Goldstein, B., & Van Haeften, T. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467): 1333–1346.
- Suganami, T.**, Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., Kamei, Y., & Ogawa, Y. (2007). Role of the toll-like receptor 4/NF-κB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(1): 84–91.
- Sunny, N.E.**, Parks, E.J., & Burgess, S.C. (2011). Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metabolism*, 14(6): 1–8.
- Szendroedi, J.**, Phielix, E., & Roden, M. (2012). The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(2): 92–103.

- Szewczyk, A. & Wojtczak, L. (2002).** Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacological Reviews*, 54(1): 101–127.
- Tabák, A., Herder, C., Rathmann, W., Brunner, E., & Kivimäki, M. (2012).** Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *The Lancet*, 379(9833): 2279–2290.
- Tahan, G., Tarcin, O., Tahan, V., Eren, F., Gedik, N., Sahan, E., Biberoglu, N., Guzel, S., Bozbas, A., Tozun, N., & Yucel, O. (2007).** The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(12): 3348–3354.
- Tahan, V., Ozaras, R., Canbakan, B., Uzun, H., Aydin, S., Yildirim, B., Aytekin, H., Ozbay, G., Mert, A., & Senturk, H. (2004).** Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Journal of Pineal Research*, 37(2): 78–84.
- Takamoto, I., Terauchi, Y., Kubota, N., Ohsugi, M., Ueki, K., & Kadowaki, T. (2008).** Crucial role of insulin receptor substrate-2 in compensatory β -cell hyperplasia in response to high fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10(4): 147–156.
- Takamoto, I., Terauchi, Y., Kadowaki, N., Kubota, M., Ohsugi, K., & Ueki, T. (2014).** Improved glucose tolerance with restored expression of glucose transporter 4 in C57BL/6 mice after a long period of high-fat diet feeding. *Animal Cells and Systems*, 18(3): 197–203.
- Takikawa, M., Inoue, S., Horio, F., & Tsuda, T. (2010).** Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-Activated Protein Kinase in diabetic mice. *Journal of Nutrition*, 140(3): 527–533.
- Tal, M., Kahn, B.B., & Lodish, H.F. (1991).** Expression of the low Km GLUT-1 glucose transporter is turned on in perivenous hepatocytes of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology*, 129(4): 1933–1941.
- Tandra, S., Yeh, M.M., Brunt, E.M., Vuppalanchi, R., Cummings, O.W., Ünalp-Arida, A., Wilson, L.A., & Chalasani, N. (2011).** Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 55(3): 654–659.
- Teodoro, J., Rolo, A.P., Oliveira, P.J., & Palmeira, C.M. (2006).** Decreased ANT content in Zucker fatty rats: relevance for altered hepatic mitochondrial bioenergetics in steatosis. *FEBS Letters*, 580(8): 2153–2157.
- Teodoro, J.S., Rolo, A.P., Duarte, F. V., Simões, A.M., & Palmeira, C.M. (2008).** Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: Understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion*, 8(5–6): 367–376.
- Tiniakos, D.G. (2010).** Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: Histological diagnostic criteria and scoring systems. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(6): 643–650.
- Toledo, F., Menshikova, E., & Ritov, V. (2007).** Effects of physical activity and weight loss on skeletal muscle mitochondria and relationship with glucose control in type 2 diabetes. *Diabetes*, 56(8): 2142–2147.
- Tolman, K.G., Fonseca, V., Dalpiaz, A., & Tan, M.H. (2007).** Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care*, 30(3): 734–743.
- Tong, M. & Sadoshima, J. (2016).** Mitochondrial autophagy in cardiomyopathy. *Current Opinion in Genetics and Development*, 38(1): 8–15.
- Torres, D. & Harrison, S. (2008).** Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 134(6): 1682–1698.
- Turner, N., Cooney, G.J., Kraegen, E.W., & Bruce, C.R. (2014).** Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *Journal of Endocrinology*, 220(2): T61–T79.
- Twig, G., Hyde, B., & Shirihai, O.S. (2008).** Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1777(9): 1092–1097.
- Unger, R.H. (2003).** Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14(9): 398–403.
- Utzschneider, K.M. & Kahn, S.E. (2006).** The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(12): 4753–4761.

- Valentová, K.,** Ulrichová, J., Cvak, L., & Šimánek, V. (2007). Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes. *Food Chemistry*, 101(3): 912–917.
- Vanni, E.,** Bugianesi, E., Kotronen, A., De Minicis, S., Yki-Järvinen, H., & Svegliati-Baroni, G. (2010). From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digestive and Liver Disease*, 42(5): 320–330.
- Veltri, K.L.,** Espiritu, M., & Singh, G. (1990). Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *Journal of Cellular Physiology*, 143(1): 160–164.
- Vendrame, S.,** Zhao, A., Merrow, T., & Klimis-Zacas, D. (2015). The effects of wild blueberry consumption on plasma markers and gene expression related to glucose metabolism in the obese Zucker rat. *Journal of Medicinal Food*, 18(6): 619–624.
- Vendrame, S.,** Daugherty, A., Kristo, A.S., & Klimis-Zacas, D. (2014). Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*)-enriched diet improves dyslipidaemia and modulates the expression of genes related to lipid metabolism in obese Zucker rats. *British Journal of Nutrition*, 111(02): 194–200.
- Vendrame, S.,** Daugherty, A., Kristo, A.S., Riso, P., & Klimis-Zacas, D. (2013). Wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption improves inflammatory status in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8): 1508–1512.
- Viscomi, C.,** Bottani, E., Civiletto, G., Cerutti, R., Moggio, M., Fagiolari, G., Schon, E.A., Lamperti, C., & Zeviani, M. (2011). In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1 α axis. *Cell Metabolism*, 14(1): 80–90.
- Vuong, T.,** Benhaddou-Andaloussi, A., Brault, A., Harbilas, D., Martineau, L.C., Vallerand, D., Ramassamy, C., Matar, C., & Haddad, P.S. (2009). Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKAy mice. *International Journal of Obesity*, 33(10): 1166–1173.
- Vuong, T.,** Martineau, L.C., Ramassamy, C., Matar, C., & Haddad, P.S. (2007). Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85(9): 956–965.
- Wahren, J., Sato, Y., & Ostman, J.** (1984). Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids and ketones in insulin-dependent diabetics at rest and in response to exercise. *Journal of Clinical Investigation*, 73(5): 1362–1376.
- Wai, T. & Langer, T.** (2016). Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(2): 105–117.
- Wang, G.,** Fu, Y., Xu, W., & Feng, Y. (2009). Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1–FOXO1 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(3): 644–649.
- Wang, L.,** Ishihara, T., Ibayashi, Y., Tatsushima, K., Setoyama, D., Hanada, Y., Takeichi, Y., Sakamoto, S., Yokota, S., Mihara, K., Kang, D., Ishihara, N., Takayanagi, R., & Nomura, M. (2015). Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced obesity and metabolic deterioration. *Diabetologia*, 58(10): 2371–2380.
- Wang, Y.,** Cheng, M., Zhang, B., Nie, F., & Jiang, H. (2013). Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats. *PLOS ONE*, 8(3): e58659.
- Wartier, D.C.,** Muravchick, S., Levy, R.J., & Stanley Muravchick, M.D., Ph.D.,* Richard J. Levy, M.D. (2006). Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology*, 105(4): 819–837.
- Weisberg, S.P.,** McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., & Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with acrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12): 1796–1808.
- Wenz, T.,** Diaz, F., Spiegelman, B.M., & Moraes, C.T. (2008). Activation of the PPAR/PGC-1 α pathway prevents a bioenergetic deficit and E effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metabolism*, 8(3): 249–256.
- Westermann, B.** (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews.Molecular cell biology*, 11(12): 872–884.

- WHO - World Health Organization (2016).** Global Report on Diabetes. *Health. I. World Health Organization*, 978(1): 0–88.
- Wilcox, G. (2005).** Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*, 26(2): 19–39.
- William, I. & Sivitz, M. (2001).** Lipotoxicity and glucotoxicity in type 2 diabetes. *Postgraduate Medicine*, 109(4): 55–64.
- Wingrove, D.E. & Gunter, T.E. (1985).** Na⁺ dependent Ca²⁺ efflux in rat liver mitochondria. *Federation Proceedings*, 44(4): 1082–1082.
- World Health Organization (2006).** Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. *WHO/IDF*.
- Wredenberg, A., Wibom, R., Wilhelmsson, H., Graff, C., Wiener, H.H., Burden, S.J., Oldfors, A., Westerblad, H., & Larsson, N.-G. (2002).** Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23): 15066–15071.
- Wu, H., Naya, F.J., McKinsey, T.A., Mercer, B., Shelton, J.M., Chin, E.R., Simard, A.R., Michel, R.N., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., & Williams, R.S. (2000).** MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *The EMBO Journal*, 19(9): 1963–1973.
- Wu, T., Tang, Q., Gao, Z., Yu, Z., Song, H., Zheng, X., & Chen, W. (2013).** Blueberry and mulberry juice prevent obesity development in C57BL/6 mice. *PLOS ONE*, 8(10): e77585.
- Xu, H., Barnes, G., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C., Sole, J., Nichols, A., Ross, J., Tartaglia, L., & Chen, H. (2003).** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12): 1821–1830.
- Yamashina, S., Sato, N., Kon, K., Ikejima, K., & Watanabe, S. (2009).** Role of mitochondria in liver pathophysiology. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 6(1–4): 25–30.
- Yao, X., Dong, X., Zhang, H.S., Wang, Y., & Liu, S.X. (2017).** Preventive effect of *Aster tataricus* on oxidative stress and biomarker of renal function in rat fed with high fat diet and sucrose diet. *Biomedical Research*, 28(4): 1647–1653.
- Yoon, Y., Galloway, C.A., Jhun, B.S., & Yu, T. (2011).** Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(3): 439–457.
- York, L.W., Puthalappattu, S., & Wu, G.Y. (2009).** Nonalcoholic fatty liver disease and low-carbohydrate diets. *Annual Review of Nutrition*, 29(1): 365–379.
- Youle, R.J. & Van Der Blik, A.M. (2012).** Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098): 1062–1065.
- Youle, R.J. & Narendra, D.P. (2011).** Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1): 9–14.
- Younossi, Z. (2008).** Practical management of liver diseases. *Cambridge University Press*, 2(1): 355.
- Younossi, Z.M., Stepanova, M., Afendy, M., Fang, Y., Younossi, Y., Mir, H., & Srishord, M. (2011).** Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9(6): 524–530.
- Yu, T., Sheu, S.-S., Robotham, J.L., & Yoon, Y. (2008).** Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*, 79(2): 341–51.
- Yu, T., Robotham, J.L., & Yoon, Y. (2006).** Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8): 2653–2658.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., & Bagchi, D. (2007).** Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(6): 675–683.
- Zafrani, E.S. (2004).** Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch*, 444(1): 3–12.
- Zeisel, S.H. & Blusztajn, J.K. (1994).** Choline and human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 14(1): 269–296.
- Zheng, W. & Wang, S.Y. (2003).** Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2): 502–509.

- Zhou, Y.,** Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A., MacKinnon, R., Zhou, Y., Morais-Cabral, J., Kaufman, A., & MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature*, 414(6859): 43–48.
- Zimmet, P.,** Alberti, K., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865): 782–787.
- Zorzano, A.,** Liesa, M., & Palacín, M. (2009). Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(10): 1846–1854.