**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-
mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a resposta
inflamatória no tecido adiposo branco de ratos
alimentados com ração hiperlipídica**

Mônica Yamada

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Nutrição em
Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

**Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo
Rogerio**

**São Paulo
2013**

**Efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-
mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a resposta
inflamatória no tecido adiposo branco de ratos
alimentados com ração hiperlipídica**

Mônica Yamada

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Nutrição em
Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

**Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo
Rogero**

**São Paulo
2013**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano de dissertação.

Dedicatória

*À minha querida e amada família,
símbolo de paz e amor sincero.*

Agradecimentos

A Deus pela força, vida e por me guiar em todas as minhas atividades.

Aos meus queridos pais, Giuniti e Ana, pela maravilhosa educação e amor sincero. Por terem sempre acreditado no meu potencial e me incentivado nos estudos. À minha irmã, Fabiana, por estar do meu lado nas dificuldades e na alegria, e pela amizade verdadeira.

Ao meu orientador, Professor Marcelo Macedo Rogero, pela oportunidade, confiança e excelente orientação. Exemplo de pesquisador, de professor e de pessoa. Obrigada por tudo! É uma honra trabalhar neste grupo.

Às amigas e companheiras do grupo de pesquisa, pela união, solidariedade, compreensão e inesquecíveis momentos. Tati, agradeço pela sua amizade, pelas conversas e por toda ajuda. Carol, por todo ensinamento e pelo incentivo. Patty, por sua sabedoria e dedicação. Marina, pela companhia e grande contribuição neste estudo. E Lú Carmo, pela sinceridade e apoio.

Às novas companheiras de pesquisa, Rê, Ângela, Marcella, Érica e Bruna, pela convivência e pelo apoio.

Aos professores Julio Tirapegui, Ricardo Fock e à professora Primavera Borelli por terem nos recebido em seus laboratórios gentilmente e por terem nos proporcionado conhecimento e crescimento científico.

À querida Ivanir, que está sempre disposta a nos ajudar. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos, apoio, mas principalmente pela amizade.

Aos colaboradores Léo, Miriam e Isabel, que tanto me auxiliaram nos ensaios de biologia molecular.

Aos professores Rui Curi, Deborah Bastos, Inar Alves de Castro e Silvana Bordin, pela contribuição e colaboração em nosso trabalho.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica da Nutrição, Lú, João, Mari Rezende, Michele, Emídio e Lucas, pelo aprendizado, apoio nos experimentos e pelos momentos de descontração.

Às alunas do laboratório de Hematologia, Grazi, Karina, Amanda e aos técnicos Mariana e Edson por toda ajuda no laboratório.

Às minhas queridas amigas, Angélica, Val, Fê, Sabrina, Aline, Amanda, pelos agradáveis momentos que compartilhamos na faculdade, nos estágios e nos passeios.

Às admiráveis nutricionistas Rô, Fernanda e Sheila, que contribuíram muito para minha formação e pelo exemplo de profissional.

Aos funcionários da Faculdade de Saúde Pública, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências Biológicas e do Instituto de Medicina Tropical pela atenção e ajuda prestada.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro e pela bolsa de mestrado, que permitiu a realização deste projeto.

Yamada M. Efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a resposta inflamatória no tecido adiposo branco de ratos alimentados com ração hiperlipídica [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

Resumo

Introdução - A dieta hiperlipídica é uma das principais causas da obesidade, provocando importantes alterações metabólicas, como aumento de gordura corporal, dislipidemia e resistência à ação da insulina. Além disso, a obesidade gera um quadro inflamatório crônico e de baixa intensidade no tecido adiposo branco, que é caracterizado pela ativação de vias inflamatórias, como a via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que é responsável pela transcrição de genes com ação pró-inflamatória, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contém compostos bioativos, como o ácido clorogênico, a quercetina e o *kaempferol*, os quais apresentam a capacidade de modular a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória. **Objetivo** - Investigar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate sobre os parâmetros metabólicos e sobre a resposta inflamatória no tecido adiposo branco de ratos alimentados com ração hiperlipídica. **Material e métodos** - Ratos machos *Wistar* foram submetidos à ração controle ou hiperlipídica por 12 semanas. Após esse período, 12 animais de cada grupo foram eutanasiados, constituindo os grupos *baseline*. O restante dos animais foi distribuído em quatro grupos que receberam, por gavagem, o extrato aquoso de erva-mate (1 g/kg massa corporal/dia) ou água, durante quatro semanas. Após esse período, todos os animais foram eutanasiados. Durante a 12^a e a 16^a semana do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose e ao teste intraperitoneal de tolerância à insulina. A partir do sangue, foram determinadas as concentrações de glicose, de insulina e de biomarcadores

inflamatórios, bem como o perfil lipídico. A composição corporal foi determinada por meio da análise química da carcaça. A partir do tecido adiposo periepididimal, foi avaliada a expressão das proteínas chaves envolvidas na inflamação crônica e na resistência à ação da insulina, por *Western blot*, bem como a expressão gênica de adipocinas por PCR em tempo real. **Resultados** - A ração hiperlipídica provocou aumento da adiposidade, alteração do perfil lipídico, intolerância à glicose e inflamação sistêmica. No tecido adiposo periepididimal, a ração hiperlipídica provocou redução da fosforilação da AKT nos animais estimulados agudamente com insulina. A ingestão do extrato aquoso de erva-mate, por quatro semanas, reduziu o ganho de peso corporal e melhorou o perfil lipídico nos animais alimentados com a ração hiperlipídica em relação ao correspondente grupo tratado com água. Contudo, o extrato aquoso de erva-mate não foi capaz de reverter as demais alterações metabólicas provocadas pela ingestão da ração hiperlipídica. **Conclusão** - A ingestão da ração hiperlipídica promoveu alterações metabólicas, todavia, não induziu inflamação crônica no tecido adiposo periepididimal. Por outro lado, a ingestão do extrato aquoso de erva-mate foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal e melhorar o perfil lipídico dos animais que consumiram a ração hiperlipídica.

Palavras-chave: obesidade; resistência insulínica; inflamação; tecido adiposo; dieta hiperlipídica; erva-mate.

Yamada M. Efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a resposta inflamatória no tecido adiposo branco de ratos alimentados com ração hiperlipídica./Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract on inflammatory response in white adipose tissue of high-fat diet-fed rats [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2013.

Abstract

Introduction - High-fat diet is one of the main causes of obesity, inducing significant metabolic changes, such as increased fat mass, dyslipidemia and insulin resistance. Furthermore, obesity is associated with a chronic state of low-grade inflammation in white adipose tissue, which is characterized by activation of inflammatory pathways, like nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway, implicated in the transcription of many genes with pro-inflammatory action, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and monocyte chemotatic protein (MCP)-1. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) contains bioactive compounds, such as chlorogenic acid, quercetin and *kaempferol* that have the ability to modulate genes involved in inflammatory response. **Objective** - To investigate the effect of yerba mate aqueous extract consumption on metabolic parameters and on inflammatory response in white adipose tissue of high-fat diet-fed rats. **Material and methods** - Male *Wistar* rats were submitted a control or a high-fat diet for 12 weeks. After this period, 12 rats of each group were euthanized, constituting the baseline groups. The remainder animals were distributed into four groups, which received by intragastric gavage the yerba mate aqueous extract or vehicle (1 g/kg body weight/day) for four weeks and then, all animals were euthanized. Oral glucose and intraperitoneal insulin tolerance tests were performed at 12 and 16 weeks of experimental protocol. Blood glucose, insulin, lipid profile and inflammatory markers were measured. Water, lipid, protein and ash content were analyzed by carcass chemical composition. Periepididymal adipose

tissue were employed to evaluate key proteins involved in inflammatory and insulin signaling pathway by *Western blot*, and adipokines gene expression by real time PCR. **Results** - High-fat diet induced body adiposity, dyslipidemia, glucose intolerance and systemic inflammation. In periepididymal fat, high-fat diet decreased AKT phosphorylation in rats acutely stimulated with insulin. The consumption of yerba mate aqueous extract for four weeks reduced body weight gain and improved lipid profile in high-fat diet group compared to non-treated group. However, yerba mate did not repair others dysfunctions induced by high-fat feeding. **Conclusion** - High-fat feeding produced some metabolic dysfunctions, but did not induce chronic inflammation in periepididymal adipose tissue. On the other hand, the yerba mate aqueous extract consumption reduced body weight gain and improved lipid profile of rats fed a high-fat diet.

Keywords: obesity; insulin resistance; inflammation; adipose tissue; high-fat diet; yerba mate.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1.1	Doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e padrão de dieta ..	17
1.1.2	Lipídios, inflamação crônica e disfunção metabólica	19
1.1.3	Inflamação crônica no tecido adiposo branco	21
1.1.4	Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	26
1.1.5	Erva-mate e modulação da resposta inflamatória e da via de sinalização da insulina	30
2	JUSTIFICATIVA	33
3	HIPÓTESE DO ESTUDO.....	34
4	OBJETIVO.....	35
4.1	OBJETIVO GERAL	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	36
5.1.1	Animais	36
5.1.2	Ração.....	36
5.1.3	Grupos experimentais.....	38
5.1.4	Preparo e administração do extrato aquoso de erva-mate.....	39
5.2	QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DE CAFEÍNA PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE.....	40
5.3	OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	42
5.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	44
5.4.1	Determinação da concentração sérica de glicose.....	44
5.4.2	Determinação da concentração sérica de colesterol total, HDL- colesterol e TAG	44
5.4.3	Determinação da concentração plasmática de insulina, leptina adiponectina, MCP-1, TNF- α , IL-6 e proteína C reativa	44
5.4.4	Determinação da concentração plasmática de AGT	45
5.4.5	Determinação do perfil de ácidos graxos	45
5.4.6	Cálculo do índice HOMA-IR e QUICKI.....	46

5.5	TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À INSULINA.....	46
5.6	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARCAÇA	47
5.7	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO.....	48
5.7.1	Extração de proteínas totais	48
5.8	WESTERN BLOTTING.....	49
5.8.1	Preparo do gel de poliacrilamida	49
5.8.2	Preparo do extrato protéico com dodecil sulfato de sódio.....	49
5.8.3	Transferência de proteínas.....	49
5.8.4	Incubação com anticorpos.....	50
5.8.5	Revelação com sistema Quimioluminescente.....	51
5.9	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA POR PCR EM TEMPO REAL	52
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
6	RESULTADOS	55
6.1	EFEITO DA INGESTÃO DA RAÇÃO HIPERLIPÍDICA.....	55
6.2	EFEITO DA INGESTÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE	70
7	DISCUSSÃO	87
7.1	EFEITO DA INGESTÃO DA RAÇÃO HIPERLIPÍDICA.....	87
7.2	EFEITO DA INGESTÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE	92
8	CONCLUSÃO.....	99
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
	ANEXO 1: Aprovação do projeto pelo comitê de ética.....	114
	ANEXO 2: Manuscrito submetido 1.....	115
	ANEXO 3: Manuscrito submetido 2.....	137

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Principais compostos bioativos presentes na erva-mate e seus efeitos biológicos	29
Tabela 2 -	Composição das rações experimentais segundo valor energético	37
Tabela 3 -	Peso molecular e diluição dos anticorpos	51
Tabela 4 -	Temperatura de anelamento e sequência dos primers utilizados	53
Tabela 5 -	Composição de ácidos graxos (%) das rações experimentais	55
Tabela 6 -	Peso dos coxins adiposos periepídidimal e retroperitoneal relativo ao peso corporal e composição corporal da carcaça dos grupos <i>baseline</i>	58
Tabela 7 -	Biomarcadores sanguíneos dos grupos <i>baseline</i>	60
Tabela 8 -	Perfil de ácidos graxos no plasma (%) dos grupos <i>baseline</i>	61
Tabela 9 -	Caracterização dos compostos bioativos presentes no extrato de erva-mate e a ingestão média diária por animal	72
Tabela 10 -	Parâmetros de validação do método analítico (UPLC-DAD) para caracterização do chá mate solúvel: precisão intra e inter-dia para tempo de retenção (TR) e área dos picos	72
Tabela 11 -	Peso dos coxins adiposos periepídidimal e retroperitoneal relativo ao peso corporal e composição corporal da carcaça dos grupos experimentais após a intervenção nutricional	75
Tabela 12 -	Biomarcadores sanguíneos dos grupos experimentais após a intervenção nutricional	78
Tabela 13 -	Perfil de ácidos graxos (%) dos grupos experimentais após a intervenção nutricional	79

Lista de Figuras

Figura 1 -	Dieta hiperlipídica, inflamação crônica e disfunção metabólica	21
Figura 2 -	Possível mecanismo de ação dos compostos bioativos presentes no extrato aquoso de erva-mate	32
Figura 3 -	Protocolo experimental	39
Figura 4 -	Esquema de coleta do material biológico	43
Figura 5 -	Consumo médio diário de ração em gramas, consumo total de ração em gramas, consumo médio diário de ração em calorias e consumo total de ração em calorias de ratos <i>Wistar</i> até a 12 ^a semana do protocolo experimental	56
Figura 6 -	Evolução do peso corporal e percentual de ganho de peso de ratos <i>Wistar</i> até a 12 ^a semana do protocolo experimental	57
Figura 7 -	Curva glicêmica e área sob a curva (AUC) do teste oral de tolerância à glicose; e curva glicêmica e taxa de decaimento da glicose (<i>Kitt</i>) do teste intraperitoneal de tolerância à insulina de ratos <i>Wistar</i> na 12 ^a semana do protocolo experimental	59
Figura 8 -	Fosforilação da TAK-1 em treonina 184/187, expressão da TAK-1 total e razão entre TAK-1 fosforilada e TAK-1 total no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> no <i>baseline</i>	63
Figura 9 -	Fosforilação da IKK- α/β em serina 176/180, expressão da IKK- β total e razão entre IKK- α/β fosforilada e IKK- β total no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> no <i>baseline</i>	64
Figura 10 -	Fosforilação da I κ B- α em serina 32, expressão da I κ B- α total e razão entre I κ B- α fosforilada e I κ B- α total no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> no <i>baseline</i>	65
Figura 11 -	Fosforilação da NF κ B (p65) em serina 536 no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> no <i>baseline</i>	66
Figura 12 -	Fosforilação da JNK em treonina 183 e tirosina 185, expressão da JNK total e razão entre JNK fosforilada e JNK total no tecido adiposo periepídimal de ratos no <i>baseline</i>	67

Figura 13 -	Fosforilação da AKT em serina 473, expressão da AKT total e razão entre AKT fosforilada e AKT total no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> no <i>baseline</i>	68
Figura 14 -	Expressão relativa do RNA mensageiro do TNF- α , MCP-1 e adiponectina no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> no <i>baseline</i>	69
Figura 15 -	Cromatograma UPLC-DAD (λ = 324 nm) com compostos fenólicos presentes no chá mate solúvel	70
Figura 16 -	Cromatograma UPLC-DAD (λ = 272 nm) com identificação da cafeína presente no chá mate	71
Figura 17 -	Espectrometria DAD (λ 220 a 400 nm) dos compostos fenólicos e cafeína presentes no extrato de erva-mate	71
Figura 18 -	Consumo médio diário em gramas, consumo total de ração em gramas, consumo médio diário em calorias e consumo total de ração em calorias durante a intervenção nutricional	73
Figura 19 -	Evolução do peso corporal e percentual de ganho de peso de ratos <i>Wistar</i> durante a intervenção nutricional	74
Figura 20 -	Curva glicêmica e área sob a curva (AUC) do teste oral de tolerância à glicose (oGTT), e curva glicêmica e taxa de decaimento da glicose (<i>Kitt</i>) do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) de ratos <i>Wistar</i> na 16ª semana do protocolo experimental	76
Figura 21 -	Fosforilação da TAK-1 em treonina 184/187, expressão da TAK-1 total e razão entre TAK-1 fosforilada e TAK-1 total no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> após a intervenção nutricional	80
Figura 22 -	Fosforilação da IKK- α/β em serina 176/180, expressão da IKK- β total e razão entre IKK- α/β fosforilada e IKK- β total no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> após a intervenção nutricional	81
Figura 23 -	Fosforilação da I κ B- α em serina 32, expressão da I κ B- α total e razão entre I κ B- α fosforilada e I κ B- α total no tecido adiposo periepídimal de ratos <i>Wistar</i> após a intervenção nutricional	82
Figura 24 -	Fosforilação da NF κ B (p65) em serina 536 no tecido adiposo	83

periepídidimal de ratos após a intervenção nutricional

Figura 25 -	Fosforilação da JNK em treonina 183 e tirosina 185, expressão da JNK total e razão entre JNK fosforilada e JNK total no tecido adiposo periepídidimal de ratos <i>Wistar</i> após a intervenção nutricional	84
Figura 26 -	Fosforilação da AKT em serina 473, expressão da AKT total e razão entre AKT fosforilada e AKT total no tecido adiposo periepídidimal de ratos <i>Wistar</i> após a intervenção nutricional	85
Figura 27 -	Expressão relativa do RNA mensageiro do TNF- α , MCP-1 e adiponectina no tecido adiposo periepídidimal de ratos <i>Wistar</i> após a intervenção nutricional	86

Lista de Abreviaturas

5-CQA	ácido 5-cafeoilquínico
ACAT	acil-CoA:colesterol aciltransferase
ACC	acetil CoA carboxilase
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
AGNE	ácidos graxos não esterificados
AGMI	ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	ácidos graxos poli-insaturados
AGS	ácidos graxos saturados
AGT	ácidos graxos totais
AKT	proteína quinase B
AMPK	proteína quinase ativada por AMP
AP1	proteína ativadora 1
AUC	área sob a curva
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CCR2	CC receptor 2
C/EBP- α	proteína ligadora de amplificadores de CCAAT alfa
CPT1	carnitina palmitoil transferase 1
CON	controle
COX	ciclooxigenase
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
DCV	doenças cardiovasculares
DM	diabetes <i>mellitus</i>
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FAS	ácido graxo sintase
GLUT-4	transportador de glicose 4
HDL	lipoproteína de alta densidade
HL	hiperlipídica
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>
ICAM	molécula de adesão intercelular
I κ B	inibidor do NF- κ B
IKK	quinase do inibidor do kappa B
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível

ipITT	teste de tolerância intraperitoneal à insulina
IRAK	quinase associada ao receptor da IL-1
IRS	substrato do receptor da insulina
JNK	c-jun N-terminal kinase-1
Kitt	taxa de decaimento da glicose
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDLR	receptor de LDL
LPS	lipopolissacarídeo
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	proteína quimiotática para monócitos-1
mTOR	proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MyD88	proteína adaptadora citoplasmática 88
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
oGTT	teste de tolerância oral à glicose
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio-1
PGC-1 α	coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PKC	proteína quinase C
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR	receptor ativado por proliferadores de peroxissomas
QUICKI	<i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i>
sICAM	molécula de adesão intracelular solúvel
SR-B1	receptor <i>scavenger</i> de classe B1
TAG	triacilglicerol
TGF- β	fator de transformação do crescimento beta
TAK-1	quinase ativada por TGF- β 1
TLR	receptor do tipo Toll
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TNFR	receptor do TNF
TRAF	fator associado ao receptor do TNF
TZD	tiazolidinediona
UCP-1	proteína desacopladora 1
UPLC	cromatografia líquida de ultra-eficiência
VCAM	molécula de adesão vascular
VCT	valor calórico total
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

1 INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e padrão de dieta

As DCNT constituem a principal causa de morbi-mortalidade mundial, representando importante desafio no campo da Saúde Pública. No Brasil, estimativas do ano de 2008, da Organização Mundial da Saúde, mostram que 74% de todas as mortes são atribuídas às DCNT. As doenças cardiovasculares (DCV), alguns tipos de câncer, as doenças respiratórias crônicas e o diabetes *mellitus* (DM) tipo 2 compõem as DCNT de maior mortalidade brasileira, estando associadas a um conjunto de fatores de risco comportamentais, como: o tabagismo, o consumo excessivo de álcool, a inadequação alimentar e o sedentarismo (WHO, 2010; WHO, 2011).

O cenário das DCNT está inserido num contexto de desenvolvimento econômico e social, marcado por grandes mudanças ambientais, inclusive no âmbito nutricional. Nesse sentido, a industrialização e a mecanização proporcionaram avanços na agricultura e no processamento de alimentos, tornando-os mais disponíveis ao consumo. Além disso, o ambiente moderno e tecnológico também contribuiu para o sedentarismo, provocando a redução do gasto energético. Tais processos resultaram no fenômeno da transição nutricional, caracterizado pelo declínio da subnutrição e pelo aumento da obesidade na população (SWINBURN et al., 2004; HABIB, 2010; FERREIRA, 2010; SCHMIDT et al., 2011).

No Brasil, o aumento expressivo do excesso de peso — que compreende tanto o sobrepeso quanto a obesidade — é considerado um dos maiores problemas de Saúde Pública, afetando todas as faixas etárias. A prevalência da obesidade infantil (5 a 9 anos de idade) aumentou cerca de cinco vezes em 20 anos. Nos adolescentes, 20% apresentam excesso de peso, enquanto na população adulta, o excesso de peso alcançou 48% entre as mulheres e 50% entre os homens (IBGE, 2010).

Dados de disponibilidade domiciliar de alimentos, oriundos da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), mostram intensa e rápida alteração no padrão de dieta da população brasileira, nas últimas décadas, estando diretamente relacionada com o crescente aumento das DCNT. Dentre as principais mudanças, nota-se o aumento da participação dos alimentos processados. Além disso, a participação de frutas e hortaliças manteve-se insuficiente, não atingindo a metade do valor recomendado pelo Guia Alimentar para população brasileira (IBGE, 2010; PNAN, 2012). Outra importante mudança que levou ao aumento da obesidade refere-se à alimentação realizada fora do domicílio, que corresponde a 25% da ingestão calórica total e inclui, principalmente, os alimentos de alta densidade energética, como refrigerantes, sucos e biscoitos industrializados (MONTEIRO et al., 2011). Tal composição alimentar assemelha-se ao padrão de “dieta ocidental” pelo elevado teor de sódio, sacarose e gorduras saturadas e trans, bem como pela baixa ingestão de micronutrientes e de fibras alimentares (ASTRUP et al., 2008).

A gordura saturada, o açúcar de adição, o sódio e as fibras alimentares são considerados importantes marcadores da qualidade da dieta (KENNEDY, 2006). Dados representativos de consumo alimentar brasileiro da POF (2008-2009) revelaram alta prevalência de inadequação para todos os parâmetros acima mencionados. Quase 90% da população com mais de 10 anos de idade não atinge a recomendação de frutas, verduras e legumes, o que se traduz em baixa ingestão de vitaminas, minerais e fibras alimentares. Excessivo consumo de gordura saturada e açúcar estava presente em 82% e 61% da população, respectivamente. Além disso, mais de 70% da população consome quantidades de sódio acima do limite recomendável. Grande parte das disfunções metabólicas associadas às DCNT (excesso de peso, dislipidemias, hiperglicemia e hipertensão arterial sistêmica) pode ser atribuída à baixa qualidade nutricional das dietas e, aliada a outros fatores, como o sedentarismo, configuram o panorama crescente da obesidade e, portanto, representam maior risco para o desenvolvimento das DCNT (IBGE, 2011).

1.1.2 Lipídios, inflamação crônica e disfunção metabólica

No contexto das sociedades modernas, os fatores dietéticos têm papel central na gênese das DCNT. Dentre os macronutrientes, os lipídios merecem maior atenção, uma vez que o consumo de dietas com alto teor de gorduras saturadas e trans está relacionado com o aumento das concentrações séricas de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e redução de lipoproteína de alta densidade (HDL), acarretando em maior risco para o desenvolvimento das DCV, devido ao seu perfil lipídico aterogênico (FERNANDEZ e WEST, 2005). Além disso, o consumo de ácidos graxos saturados (AGS) favorece à resistência insulínica e à intolerância à glicose, condições que favorecem o desenvolvimento do DM tipo 2 (MANCO et al., 2004). Quanto ao papel dos lipídios na inflamação, o consumo de uma dieta rica em AGS está associado com aumento das concentrações plasmáticas de biomarcadores inflamatórios, como a interleucina (IL)-6, E-selectina, proteína C reativa e fibrinogênio (BAER et al., 2004). Sugere-se que uma dieta hiperlipídica (HL) seja capaz de elevar as concentrações desses biomarcadores também no período pós-prandial. Em indivíduos saudáveis, a dieta HL aumenta a concentração plasmática do fator de necrose tumoral (TNF)- α e da IL-6, bem como da molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1 e da molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, responsáveis por favorecer a disfunção endotelial (NAPO et al., 2002).

Sabe-se que a inflamação está envolvida na fisiopatologia de várias DCNT, incluindo as DCV, o DM tipo 2, o câncer e as doenças neurodegenerativas (KOK et al., 2007). A inflamação é caracterizada por uma resposta coordenada a uma infecção ou lesão tecidual, cuja finalidade é restaurar e recuperar a integridade perdida, retornando à homeostase (LUMENG e SALTIEL, 2011). Em geral, muitos componentes da resposta inflamatória clássica podem ser ativados, contudo, ao contrário da inflamação induzida por agentes infecciosos, a inflamação desencadeada na

gênese das DCNT tem origem metabólica e apresenta baixa intensidade (LUMENG e SALTIEL, 2011). Em resumo, a resposta inflamatória crônica inicia-se a partir de sinais metabólicos provocados por uma sobrecarga de nutrientes, ativando vias de sinalização inflamatória, o que produz modesta expressão de mediadores inflamatórios. Na tentativa de reparo, células do sistema imune, como os monócitos e os linfócitos T, são recrutadas e ativadas, intensificando o processo inflamatório. Porém, a restauração do problema não ocorre, uma vez que os sinais metabólicos que originaram a resposta inflamatória persistem, acarretando em um quadro inflamatório crônico (GREGOR e HOTAMISLIGIL, 2011).

O desbalanço energético provocado pelo consumo alimentar excessivo, especialmente pela dieta rica em lipídios, demanda importantes alterações fisiológicas e metabólicas em diversos tecidos. Diante da sobrecarga de nutrientes, o tecido adiposo branco perde a capacidade tamponante de estocar e liberar lipídios, provocando aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na circulação sanguínea. Dessa forma, os AGNE podem atingir e comprometer diversos órgãos, causando lipotoxicidade e resistência à ação da insulina (MONTEIRO e AZEVEDO, 2010). No fígado, os AGNE podem causar esteatose hepática, além de aumentar a síntese de triacilgliceróis e, consequente aumento da secreção de partículas de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Os AGNE também provocam redução da sensibilidade à ação da insulina no músculo esquelético, inibindo a captação de glicose mediada pela insulina. As células β -pancreáticas, inicialmente, aumentam a secreção de insulina para compensar a resistência periférica à insulina e manter a euglicemia. Contudo, a exposição crônica aos AGNE provoca a disfunção das células β -pancreáticas, levando à redução da capacidade de secreção de insulina (CORNIER et al., 2008).

Estudos recentes relacionam a microbiota intestinal ao estado inflamatório que ocorre na obesidade. A composição da população de bactérias intestinais em indivíduos obesos parece ser diferente dos indivíduos magros. Foi demonstrado que uma dieta rica em lipídios altera a

composição da microbiota intestinal, bem como aumenta a permeabilidade intestinal, favorecendo o aumento da concentração de lipopolissacarídeos (LPS) na circulação sanguínea, fenômeno denominado endotoxemia metabólica. O LPS está presente na parede de bactérias gram-negativas e apresenta a capacidade de se ligar aos receptores do tipo toll (TLR)-4, o que resulta na ativação da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB). Dessa forma, a dieta HL não só causa o aumento da concentração sérica de ácidos graxos, bem como aumenta a concentração sérica de LPS, os quais contribuem na resposta inflamatória e no desenvolvimento da resistência à ação da insulina (GREINER e BÄCKHED, 2011).

Figura 1 - Dieta hiperlipídica, inflamação crônica e disfunção metabólica

1.1.3 Inflamação crônica no tecido adiposo branco

O conceito de que o tecido adiposo branco é um órgão endócrino, metabolicamente ativo e que está associado a um quadro de inflamação crônica e de baixa intensidade, foi estabelecido no início da década de 1990, após a constatação da capacidade de síntese do TNF- α a partir do tecido adiposo de roedores obesos. Tal fato colaborou para melhor compreensão da relação entre obesidade, DM tipo 2 e inflamação crônica (HOTAMISLIGIL et al., 1993). Cabe destacar que, além do TNF- α , muitas outras proteínas bioativas — também denominadas adipocinas — são sintetizadas e secretadas pelo tecido adiposo branco, podendo atuar tanto localmente (função autócrina e parácrina) quanto sistemicamente (função endócrina) (KERSHAW e FLIER, 2004; GUSTAFSON, 2009).

A resposta inflamatória induzida pela obesidade é desencadeada predominantemente no tecido adiposo branco, apesar de outros tecidos, como o fígado, também estarem envolvidos nesse processo (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2003). O tecido adiposo branco é um tecido heterogêneo, composto por adipócitos maduros, bem como por uma fração designada estroma-vascular, que inclui pré-adipócitos, fibroblastos, histiócitos, células endoteliais, linfócitos e macrófagos. O adipócito maduro é a principal célula do tecido adiposo, apresenta formato esférico, com 60-80 μ m de diâmetro e uma única gota de gordura, cuja capacidade de armazenamento pode chegar a mais de 85% do seu volume (MCGINTY e YOUNG, 2011).

Em humanos, o tecido adiposo branco está distribuído principalmente na cavidade intra-abdominal (tecido adiposo visceral – omental, mesentérico e perirrenal) e na camada subcutânea (tecido adiposo subcutâneo – abdominal e fêmuro-gluteal), sendo que sua distribuição pode variar conforme a idade, o gênero e a etnia (MCGINTY e YOUNG, 2011). Em indivíduos obesos, a expansão do tecido adiposo é resultante de dois processos: aumento do volume dos adipócitos (hipertrofia) e diferenciação *de novo* de adipócitos (hiperplasia). Com a hipertrofia, os adipócitos perdem a capacidade de retenção de ácidos graxos, podendo estes serem depositados em outros locais, como o músculo esquelético e o fígado. Esse acúmulo de lipídios permite que esses substratos sejam metabolizados,

resultando na produção de metabólitos lipídicos, como a ceramida e o diacilglicerol, que causam lipotoxicidade e desenvolvimento de resistência à insulina (BAYS, 2011).

Dentre as diversas adipocinas secretadas pelo tecido adiposo branco com ação pró-inflamatória destacam-se: o TNF- α , a IL-6, a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1, o angiotensinogênio, o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI)-1, o fator de transformação do crescimento (TGF)- β , a molécula de adesão intracelular solúvel (sICAM), a leptina, a adiposina, entre outras. Em contrapartida, a expressão gênica da adiponectina encontra-se reduzida durante a inflamação induzida pela obesidade. Essa adipocina apresenta ação anti-inflamatória, atuando como potente inibidor da expressão de moléculas de adesão, o que demonstra sua função protetora contra o desenvolvimento da aterosclerose (BASTOS et al., 2009; GREENBERG e OBIN, 2006). Cabe ressaltar que, o tecido adiposo branco possui diferenças quanto ao grau de expressão dessas citocinas de acordo com a sua localização anatômica (MCGINTY e YOUNG, 2011).

Determinadas adipocinas, como o TNF- α e a IL-6, merecem destaque por terem maior participação na inflamação crônica, bem como no desenvolvimento de complicações metabólicas, como a resistência periférica à ação da insulina e a síndrome metabólica. Em indivíduos obesos, o aumento da concentração plasmática de TNF- α no tecido adiposo acarreta em maior risco de desenvolvimento da resistência à insulina, uma vez que essa citocina aumenta o processo de lipólise em adipócitos e, conseqüentemente, provoca aumento da liberação de AGNE na circulação sanguínea, os quais atuam em diferentes tecidos, como o músculo esquelético e o fígado. A expressão de IL-6 aumenta no tecido adiposo em indivíduos obesos, sendo este tecido responsável por cerca de 30% da concentração plasmática da IL-6. Além da lipólise, a IL-6 favorece a ocorrência da resistência periférica à ação da insulina, o que favorece o desenvolvimento da DM tipo 2 e do infarto agudo do miocárdio (GREENBERG e OBIN, 2006).

Importante evento que caracteriza o tecido adiposo branco como um foco inflamatório é a infiltração de células do sistema imunológico, particularmente monócitos, os quais, após infiltrarem nesse tecido, diferenciam-se em macrófagos (ELLACOTT et al., 2007; ZEYDA e STULNIG, 2009). Estudos em roedores sugerem que estes são principalmente derivados de células oriundas da medula óssea (TORDJMAN et al., 2008; BOURLIER e BOULOUMIER, 2009). A infiltração de monócitos provavelmente inicia-se com a hipertrofia de adipócitos, sendo estes responsáveis pela síntese de sinais quimiotáticos que levam ao recrutamento dessas células e posterior diferenciação em macrófagos (HOTAMISLIGIL, 2006). Em indivíduos obesos, os macrófagos correspondem a 40% do total de células do tecido adiposo branco, enquanto em indivíduos magros essa proporção é de 10% (WEISBERG et al., 2003). Além disso, estudos demonstram que 90% de todos os macrófagos encontrados no tecido adiposo branco localizam-se ao redor de células adiposas necrosadas, indicando que a morte de adipócitos representa fator relevante para a ocorrência da infiltração de monócitos (CINTI et al., 2005; MURANO et al., 2008). Outros fatores como a hipóxia e a expressão de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias também contribuem para o aumento da infiltração de monócitos/macrófagos (WAJCHENBERG et al., 2009).

A obesidade pode modular o perfil da subpopulação de macrófagos no tecido adiposo, sendo que em indivíduos obesos constata-se o predomínio de macrófagos tipo M1 — fenótipo pró-inflamatório —, enquanto indivíduos magros apresentam predomínio de macrófagos tipo M2, os quais caracterizam-se por elevada capacidade de reparo tecidual, angiogênese e regulação da síntese de fatores anti-inflamatórios, como a IL-10. Estudos mostram que os macrófagos estão em maior quantidade no tecido adiposo visceral em comparação ao subcutâneo, comprovando que o tecido adiposo visceral possui maior participação na etiologia da resistência à ação da insulina (OUCHI et al., 2011). Além disso, o tecido adiposo visceral possui maior vascularização e inervação, menor capacidade de diferenciação, bem como maior síntese e secreção de adipocinas, que são liberadas

diretamente no fígado, por meio da veia porta, ativando mecanismos inflamatórios no fígado, como a síntese da proteína C reativa (IBRAHIN, 2010). Diante dos fatos supracitados, conclui-se que a coexistência de dois focos principais contribui para a geração desse quadro inflamatório crônico, ou seja, de um lado estão os adipócitos e do outro os macrófagos, os quais são responsáveis pela síntese de moléculas com ação pró-inflamatórias e pró-coagulantes, como o TNF- α , a IL-6, a IL-1, o óxido nítrico (NO), o PAI-1, o fator VII e a MCP-1 (WEISBERG et al., 2003; GREENBERG e OBIN, 2006; WAJCHENBERG et al., 2009).

Vários fatores podem contribuir para a ativação de mecanismos inflamatórios no tecido adiposo branco. Processos celulares — como a hipertrofia e a diferenciação dos adipócitos — podem ativar as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que incluem as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), a c-Jun N-amino-terminal (JNK) e a p38 MAPK (SUGANAMI e OGAWA, 2010). Outro fator importante deve-se a condição de estresse exposta às células e às organelas intracelulares, a qual é causada, principalmente, pela sobrecarga metabólica. O retículo endoplasmático e a mitocôndria são as organelas mais sensíveis a esta condição. A hipóxia, caracterizada pelo baixo aporte de oxigênio, ocorre no tecido adiposo de indivíduos obesos devido à hipertrofia dos adipócitos, cujo fato compromete o processo oxidativo mitocondrial (WOOD et al., 2009). Devido à hipóxia, a mitocôndria produz espécies reativas de oxigênio que levam ao desenvolvimento do estresse oxidativo, promovendo a ativação da JNK e de outras quinases envolvidas na gênese da resistência à ação da insulina (KARALIS et al., 2009; WAJCHENBERG et al., 2009).

Vias de sinalização inflamatória também podem ser ativadas por lipídios (ELLACOTT et al., 2007). O principal mecanismo relacionado à inflamação gerada no tecido adiposo branco corresponde à via de sinalização do NF- κ B. AGS ligam-se ao TLR-4, desencadeando uma cascata de eventos, cujo início está relacionado ao recrutamento da proteína de diferenciação mieloide 88 (MyD88), a qual atrai as proteínas quinases associadas ao receptor da IL-1 (IRAK1 e IRAK4) para o complexo. Dessa

forma, o IRAK1 liga-se ao MyD88 e ao fator associado ao TNFR (TRAF)-6, que resulta na ativação do sistema IKK- β /NF- κ B. A ativação da quinase do inibidor do fator de transcrição nuclear kappa B (IKK)- β promove a fosforilação do inibidor do κ B (I κ B)- α , induzindo a poliubiquitinação e posterior degradação dessa proteína no proteasoma 26S. Este fato favorece a translocação do NF- κ B do citosol para o núcleo, onde este promove a ativação transcricional de diversos genes envolvidos na resposta inflamatória, como o TNF- α , a IL-6 e a MCP-1 (TERZIC et al., 2007; KARALIS et al., 2009).

A inflamação crônica induzida pela obesidade também constitui importante desencadeante para o desenvolvimento e patogênese da resistência insulínica. A ativação de proteínas quinases, como a IKK- β e a JNK, promove a fosforilação do resíduo de serina 307 do substrato do receptor de insulina (IRS)-1, comprometendo a via de sinalização da insulina e a captação de glicose pelos adipócitos (SCHENK et al., 2008).

Por outro lado, o receptor nuclear designado receptor ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR)- γ , o qual é expresso no tecido adiposo, apresenta efeito protetor contra a DM tipo 2 e a inflamação. Estudos mostram que a tiazolidinediona (TZD), um ligante sintético do PPAR- γ , inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6, em macrófagos estimulados por LPS. Da mesma forma, esse composto contribui para a diferenciação de pré-adipócitos, gerando adipócitos com maior capacidade de captar glicose, bem como com maior capacidade de síntese de adiponectina. Atualmente, dois mecanismos moleculares têm sido propostos para demonstrar o efeito anti-inflamatório do PPAR- γ : o primeiro, por meio da interferência na via do fator de transcrição NF- κ B; e o segundo, por reduzir a liberação de complexos co-repressores, diminuindo assim, a transcrição de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória (HIRAI et al., 2010).

1.1.4 Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Ilex paraguariensis, popularmente conhecida como erva-mate, é uma planta da família Aquifoliacea, nativa da região subtropical da América do Sul e largamente cultivada no sul do Brasil, norte da Argentina, Uruguai e Paraguai (HECK e MEJIA, 2007). No Brasil, as principais bebidas preparadas à base de erva-mate são: o chimarrão, o tererê e o chá mate. O chimarrão e o tererê são preparados a partir das folhas verdes e secas da erva-mate, sendo que o chimarrão é consumido quente e o tererê gelado. Já o chá mate é preparado a partir da infusão da erva-mate torrada. Na América do Sul, a ingestão média diária da erva-mate chega a ser maior que um litro em algumas regiões (BASTOS et al., 2007a).

De modo geral, o processamento da erva-mate consiste em três etapas: sapeco, secagem e cancheamento. Na fase de sapeco, a planta é chamuscada à lenha, podendo atingir a temperatura de 500 °C, por 3 a 4 minutos. Esse processo permite a inativação de enzimas, como a polifenol oxidase, evitando a fermentação do produto. A secagem ocorre lentamente por meio da fumaça, com duração de 8 a 24 horas, e tem como objetivo reduzir a umidade, além de conferir o aroma característico. O processo de cancheamento consiste na trituração das folhas e talos da planta, que são posteriormente, peneirados e embalados (HECK e MEJIA, 2007; SILVA et al., 2011). Para a obtenção do chá mate tostado, ainda há o processo de torrefação após o cancheamento, no qual a planta passa por um sistema de forno com fogo indireto, processo semelhante ao utilizado na torrefação do café (EMBRAPA, 2013).

A erva-mate tem sido amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de várias enfermidades, porém, estudos científicos sobre suas propriedades biológicas tornaram-se mais frequentes nos últimos 15 anos (BRACESCO et al., 2010). Sabe-se que a erva-mate contém diversos compostos bioativos com importantes funções biológicas, como efeito antioxidante (MIRANDA et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2009), anti-inflamatório (PIMENTEL et al., 2012), anti-obesidade (ARÇARI et al., 2009 ; HUSSEIN et al., 2011b) e hipolipidêmico (MARTINS et al., 2010).

Os principais compostos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas (BASTOS et al., 2007a). Dentre os compostos fenólicos, os cafeoil-derivados são os compostos mais abundantes no chá mate, incluindo o ácido cafeico, o ácido clorogênico e os ácidos 3,4 dicafeoilquínico, 3,5 dicafeoilquínico e o 4,5 dicafeoilquínico (BRACESCO et al., 2010). Estes cafeoil-derivados são potentes antioxidantes e podem atuar como sequestradores de espécies reativas do oxigênio ou como quelantes de metais de transição (SCHINELLA et al., 2000). Outros polifenóis presentes na erva-mate são os flavonóides, como a quercetina, a rutina e o *kaempferol*, os quais possuem ação anti-inflamatória, antioxidante, hipocolesterolêmica e hepatoprotetor (RIVERA et al., 2008; HSU et al., 2009; PANCHAL et al., 2011; MOON et al., 2012). As principais saponinas identificadas na erva-mate são triterpênicas formadas por ácido ursólico, também denominadas matesaponinas, que são responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico e anti-inflamatório da erva-mate (FERREIRA et al., 1997; PUANGPRAPHANT e MEJIA, 2009). Em relação à metilxantinas, a cafeína e a teobromina estão presentes em maior quantidade no chá mate, tendo ação diurética, estimulante no sistema nervoso central, além de propriedades na regulação da função cardíaca e muscular (KOBAYASHI-HATTORI et al., 2005; HECK e MEJIA, 2007). Os principais compostos bioativos da erva-mate e suas propriedades biológicas estão resumidos na **tabela 1**.

Ultimamente, grande atenção tem sido dada às suas propriedades no controle e tratamento das DCNT. Em modelo animal, a administração do extrato aquoso de erva-mate exerceu efeito anti-diabetes e hipocolesterolêmico, interferindo em mecanismos de captação de glicose, sensibilidade periférica à insulina e nas concentrações circulantes de colesterol total, triacilgliceróis (TAG), AGNE e adiponectina (HUSSEIN et al., 2011a). A erva-mate também possui relevante papel no controle da obesidade induzida pela dieta HL, que são regulados por mecanismos envolvendo a lipólise, a oxidação lipídica e o controle da saciedade (PANG et al., 2008; HUSSEIN et al., 2011b).

Tabela 1 - Principais compostos bioativos presentes na erva-mate e seus efeitos biológicos.

Composto	Efeitos biológicos	Estrutura química
Metilxantinas (Cafeína, teobromina e teofilina)	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulador do sistema nervoso central, cardíaco, muscular e renal. • Diurético. • Regulador da saciedade, termogênese, lipólise e oxidação lipídica.	<p>Cafeína Teobromina Teofilina</p>
Flavonóides (Quercetina, rutina)	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflamatório. • Antioxidante. • Hipocolesterolêmico. • Hepatoprotetor.	<p>Quercetina Rutina</p>
Cafeoil-derivados (Ácido cafeico, ácido clorogênico, ácidos dicafeoilquínicos)	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidante. • Anti-inflamatório. • Inibe a oxidação do LDL-c. • Anticarcinogênico e antimutagênico. • Neuroprotetor. • Regulador do metabolismo da glicose.	<p>Ácido cafeico Ácido clorogênico</p>
Saponinas (Matesaponina)	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-inflamatório. • Hipocolesterolêmico.	<p>VII</p> <p>Saponina</p>

1.1.5 Erva-mate e modulação da resposta inflamatória e da via de sinalização da insulina

A erva-mate contém diversos compostos bioativos que possuem a capacidade de modular mecanismos envolvidos na resposta inflamatória. O NO e a prostaglandina E_2 (PGE_2) são importantes mediadores da resposta inflamatória, sintetizadas pela ação das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase (COX)-2, respectivamente. Em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, a saponina e os ácidos dicafeoilquínicos, presentes na erva-mate, são potentes inibidores da expressão de iNOS e COX-2 e da produção de NO e PGE_2 (PUANGPRAPHANT e MEJIA, 2009 e 2011). Do mesmo modo, em células hepáticas, o *kaempferol* é capaz de inibir a expressão desses mediadores inflamatórios, por mecanismos que envolvem o bloqueio da ativação da via do NF- κ B (GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007).

Outros compostos fenólicos presentes na erva-mate — como o ácido clorogênico — também possuem propriedades anti-inflamatórias em modelo animal induzido à fibrose hepática, regulando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , via supressão da via de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B (SHI et al., 2013). A quercetina, composto pertencente ao grupo dos flavonóides, é capaz de atenuar as vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- κ B e proteína ativadora (AP)-1 e inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos e adipócitos humanos (CHUANG et al., 2010; OVERMAN et al., 2011). Além disso, a quercetina melhora a sensibilidade à ação da insulina por mecanismos envolvendo o aumento da expressão do receptor nuclear PPAR- γ e a redução da fosforilação da IRS-1 em serina 307, o que contribui para o aumento da captação de glicose pelas células adiposas (OVERMAN et al., 2011).

O efeito anti-inflamatório da erva-mate também foi verificado em modelos animais induzidos à obesidade, corroborando com os estudos

conduzidos em modelos celulares *in vitro*, nos quais compostos isolados foram empregados. Tais estudos indicam que a ingestão crônica do extrato aquoso de erva-mate melhora o estado inflamatório em órgãos e tecidos metabólicos, como fígado, tecido adiposo branco, hipotálamo e músculo esquelético, pela inibição da via de sinalização do NF- κ B e redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (ARÇARI et al., 2009 e 2011; PIMENTEL et al., 2012). A administração de erva-mate também melhora o quadro de resistência insulínica associada à inflamação crônica no fígado e no músculo esquelético de camundongos obesos, pela ativação em resíduo de tirosina das proteínas IRS-1 e proteína quinase B (AKT), as quais estão envolvidas com a sinalização da insulina e captação de glicose (ARÇARI et al., 2011).

Os possíveis mecanismos de ação dos compostos bioativos presentes no extrato aquoso de erva-mate estão representados na **figura 2**.

Figura 2 - Possível mecanismo de ação dos compostos bioativos presentes no extrato aquoso de erva-mate.

(⊥) indica inibição; (→) indica ativação; (Ub) indica ubiquitinação; (P) indica fosforilação; (★) indica possíveis pontos de atuação de compostos bioativos presentes no extrato aquoso de erva-mate. AGS, ácidos graxos saturados; AKT, proteína quinase B; GLUT-4, transportador de glicose-4; HL, hiperlipídica; IκB-α, inibidor do fator nuclear kappa B; IKK-β, quinase do inibidor do kappa B; IL-6, interleucina-6; IR-β, receptor de insulina-β; IRS-1, substrato do receptor da insulina-1; JNK, c-Jun N terminal quinase; NF-κB, fator de transcrição nuclear kappa B; PI3K, fosfatidil inositol 3-quinase; TNF-α, fator de necrose tumoral-α; MCP-1, proteína quimiotática para monócitos; TAK1, quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento β; TLR4, receptor do tipo toll-4; TNFR, receptor do TNF.

2 JUSTIFICATIVA

Dados epidemiológicos indicam que a dieta rica em lipídios é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das DCNT (WHO, 2010). Tanto em indivíduos obesos, como em diferentes modelos animais, a dieta HL provoca importantes disfunções metabólicas, como aumento da gordura visceral, dislipidemia, intolerância à glicose e esteatose hepática (MELANSON et al., 2009; DE WIT et al., 2012; NEVILLE et al., 2012). Verifica-se que o consumo da dieta HL, particularmente rica em AGS, está associado com o aumento da concentração sanguínea de biomarcadores inflamatórios como proteína C reativa, IL-1 β , IL-6, TNF- α e MCP-1, que é decorrente, em parte, da ativação da via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B no tecido adiposo branco (RAZ et al., 2013; ENOS et al., 2013). Além disso, a inflamação crônica induzida pela obesidade pode comprometer a sinalização à ação da insulina, levando a um quadro de resistência insulínica nesse tecido (HARDY et al., 2012).

Diante desse contexto, é necessária a realização de estudos que identifiquem e caracterizem alimentos, nutrientes e compostos bioativos que possam prevenir e/ou atenuar a inflamação gerada nas doenças metabólicas. Para tanto, optamos por uma intervenção nutricional, o extrato aquoso de erva-mate, pelo fato dele possuir compostos bioativos com propriedade anti-inflamatória, como o ácido clorogênico, a quercetina e o *kaempferol* (GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; CHUANG et al., 2010; SHI et al., 2013). Vale destacar que, bebidas à base de mate são acessíveis à população e constituem hábitos alimentares de milhões de pessoas, podendo representar importante auxílio no tratamento dietético de indivíduos obesos (MOSIMANN et al., 2006). Sendo assim, torna-se fundamental a realização de estudos que avaliem *in vivo* o efeito do consumo do extrato aquoso de erva-mate sobre as alterações metabólicas e sobre a resposta inflamatória no tecido adiposo branco, uma vez que esse tecido tem importante papel no metabolismo corporal e na gênese de DCNT.

3 HIPÓTESE DO ESTUDO

A dieta HL, rica em AGS, provoca importantes alterações metabólicas, bem como ativa a via de sinalização inflamatória do fator de transcrição NF- κ B no tecido adiposo branco, o que acarreta em resistência insulínica. Por outro lado, o extrato aquoso de erva-mate, por meio dos seus compostos bioativos, atenua as disfunções metabólicas e reduz a resposta inflamatória e a resistência à ação da insulina.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre os parâmetros metabólicos e sobre a resposta inflamatória no tecido adiposo branco de ratos alimentados com ração HL.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre:

- a resposta glicêmica após o teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) em ratos submetidos à ração HL;
- a adiposidade e composição corporal de ratos submetidos à ração HL;
- a concentração sanguínea de glicose, insulina, colesterol total, HDL-colesterol, TAG, ácidos graxos totais (AGT), adiponectina, TNF- α , IL-6, proteína C reativa e MCP-1 em ratos submetidos à ração HL;
- o perfil plasmático de ácidos graxos em ratos submetidos à ração HL;
- a expressão das proteínas quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento β (TAK)-1, IKK- β , I κ B- α , JNK e AKT, nas suas formas total e fosforilada, e da proteína NF- κ B, na sua forma fosforilada, no tecido adiposo branco de ratos submetidos à ração HL;
- a expressão gênica do TNF- α , MCP-1 e adiponectina em ratos submetidos à ração HL.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

5.1.1 Animais

Foram utilizados 72 ratos *Wistar*, machos e adultos, com 2 meses de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de criação, sob condições ambientais controladas, temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro (luz acesa às 7:00 h).

Todos os procedimentos realizados com os ratos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, cujo número de protocolo é 048/2009.

5.1.2 Ração

Os animais foram alimentados *ad libitum* com água e ração elaborada para ratos adultos, segundo o *American Institute of Nutrition* (AIN)-93M (REEVES et al., 1993). A ração HL foi baseada no AIN-93M, sendo acrescida de banha de porco em substituição ao amido de milho, visando aumentar o teor de lipídios da ração e, conseqüentemente, favorecer a indução de ganho de peso em ratos.

Em um estudo piloto, observou-se que os animais submetidos à ração HL apresentavam redução da quantidade de ração consumida (em gramas) em comparação aos animais alimentados com ração controle (CON). Todavia, em razão da maior densidade energética da ração HL, o consumo calórico não diferiu entre os grupos. Sendo assim, optou-se por ajustar a quantidade dos ingredientes das rações experimentais pelo seu valor energético em detrimento do ajuste pelo peso da ração com o objetivo de promover um consumo diário semelhante de proteínas, sacarose,

micronutrientes, ácidos graxos essenciais e fibras alimentares entre os dois grupos (TALLMAN e TAYLOR, 2003; KISHINO et al., 2006; JOBGEN et al., 2009; SAFWAT et al., 2009). Além disso, em razão da maior susceptibilidade da ração HL à oxidação, a quantidade de tertbutil hidroquinona nessa ração foi aumentada (PANG et al., 2008) (**tabela 2**).

Tabela 2 – Composição das rações experimentais segundo valor energético

	Ração Controle	Ração Hiperlipídica
Ingredientes	gramas por 1.000 kcal	
Amido	155,40	29,65
Sacarose	25,04	25,04
Caseína (78,49%)	35,05	35,05
Óleo de soja	10,01	10,01
Banha de porco	0,00	55,44
Celulose	12,52	12,52
Mix minerais	8,76	8,76
Mix de vitaminas	2,50	2,50
L- cistina	0,45	0,45
Bitartarato de colina	0,63	0,63
Tertbutil hidroquinona	0,002	0,007
Macronutrientes (% do VCT)		
Carboidratos	75,8	24,2
Proteínas	14,9	14,9
Lipídios	9,3	60,9

5.1.3 Grupos experimentais

Inicialmente, os animais foram mantidos em período de adaptação às condições ambientais e alimentados com ração CON. Os animais foram então distribuídos em dois grupos, os quais receberam a ração CON (n=36) ou a ração HL (n=36). Após 12 semanas de protocolo, 12 animais de cada grupo foram eutanasiados, os quais constituíram os grupos *baseline*. O restante dos animais foi distribuído em quatro grupos, os quais receberam ou não 1 g/kg de massa corporal/dia do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) tostada (Leão Júnior S.A., Curitiba, PR, Brasil), durante um período de 28 dias. Desse modo, o estudo foi realizado com seis grupos experimentais (**figura 3**):

- **Grupo CONBL:** grupo “*baseline*”, com ração controle, eutanasiado após 12 semanas do início do protocolo (n=12).
- **Grupo CON:** grupo com ração controle, eutanasiado após 16 semanas do início do protocolo (n=12).
- **Grupo CONEM:** grupo com ração controle e administração de extrato aquoso de erva-mate (1 g/kg de massa corporal) entre a 13^a e a 16^a semana de protocolo, eutanasiado após 16 semanas do início do protocolo (n=12).
- **Grupo HLBL:** grupo “*baseline*”, com ração HL, eutanasiado após 12 semanas do início do protocolo (n=12).
- **Grupo HL:** grupo com ração HL, eutanasiado após 16 semanas do início do protocolo (n=12).
- **Grupo HLEM:** grupo com ração HL e administração de extrato aquoso de erva-mate (1 g/kg de massa corporal) entre a 13^a e a 16^a semana de protocolo, eutanasiado após 16 semanas do início do protocolo (n=12).

Figura 3 - Protocolo experimental.

Os símbolos (†) indicam o momento da eutanásia. CON, ração controle; HL, ração hiperlipídica; CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica; CON, grupo alimentado com ração controle e tratado com água; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica e tratado com água; CONEM, grupo alimentado com ração controle e tratado com erva-mate e; HLEM, grupo alimentado com ração hiperlipídica e tratado com erva-mate.

5.1.4 Preparo e administração do extrato aquoso de erva-mate

O extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foi preparado por meio da dissolução e homogeneização do chá mate instantâneo liofilizado (Leão Júnior S.A., Curitiba-PR, Brasil) em água. O mesmo lote do chá mate foi utilizado em todo protocolo experimental. A solução de erva-mate correspondia a 0,2 g/mL, sendo preparada sempre no momento da administração. O chá mate foi administrado por meio de sonda intragástrica

(gavagem) durante as últimas quatro semanas do protocolo experimental. O grupo controle recebeu água via gavagem. A quantidade administrada do extrato aquoso de erva-mate correspondeu a 1 g/kg de massa corporal (ARÇARI et al., 2009; MARTINS et al., 2010).

5.2 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E DE CAFEÍNA PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE

A quantificação e identificação dos compostos fenólicos e da cafeína do chá mate liofilizado foram realizadas por cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC). Para tanto foi utilizado um cromatógrafo líquido modelo Agilent 1200 SL, equipado com detector de arranjos de diodos (DAD) e espectrômetro de massas com fonte de íons *eletrospray* à pressão atmosférica (API-ESI), modelo Agilent 6150 e uma coluna Agilent Zorbax SB-C18 (50 X 2,1 mm, 1,8 µm).

A análise foi processada com amostras em triplicatas diluindo-se 100 mg de extrato solúvel de erva-mate em 100 mL de água deionizada. Alíquotas de 1 mL foram filtradas com filtro para seringa (Millipore, MA, EUA) e 5 µL injetados no cromatógrafo.

A fase móvel foi constituída de ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,1% (v/v) em água deionizada (A) e metanol grau HPLC (Gold, CER Brasil) (B). Os solventes foram filtrados com membrana e desgaseificados em ultrassom antes de serem acoplados ao sistema cromatográfico. O sistema foi equilibrado com uma mistura de 85:15 dos eluentes A e B, respectivamente. A programação do gradiente foi: 15% de B até 1,8 minutos, 15-30% de B até 5 minutos, 35% de B de 6 a 12 minutos, retorno a 15% de B aos 13 minutos e mantendo por 7 minutos nesta condição para equilibrar a coluna. O fluxo de fase móvel foi 320 µL min⁻¹ e temperatura do forno mantida a 40 °C.

As condições do espectrômetro de massas foram: voltagem na fonte de ionização +3.000 volts, fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) a 12 L min⁻¹, temperatura de 350 °C e pressão do nitrogênio à 30 psi. A análise de compostos fenólicos foi realizada no modo de ionização negativo e a análise de cafeína, no modo positivo. Foi realizada primeiramente uma análise *scan* para selecionar os íons mais abundantes de cada pico para análise do modo SIM (*single ion monitoring*).

A identificação do ácido-5-cafeoilquínico (5-CQA) e da cafeína foi realizada de acordo com o tempo de retenção, espectro de absorção UV e espectro de massas, em comparação com os padrões de referência. A identificação dos demais compostos fenólicos, os quais não apresentam padrão de referência, foi realizada pelos espectros de absorção UV e de massas, com base nos resultados anteriormente descritos por Bastos et al. (2007b) e Jailswal et al. (2010).

A quantificação foi realizada pelo DAD, por meio da curva de calibração externa de 5 pontos com padrão de referência: cafeína a 272 nm (5 a 40 µg ml⁻¹, $r^2=0,99998$) e 5-CQA a 324 nm (5 a 45 µg ml⁻¹, $r^2=0,99995$). Os demais compostos fenólicos foram quantificados pela curva do 5-CQA e os resultados, somados ao do 5-CQA pela estimativa do teor de fenólicos totais.

A metodologia foi validada pelo DAD, utilizado para quantificação dos compostos do chá. Foi determinada a precisão das áreas e tempo de retenção do 5-CQA e da cafeína, por meio da análise de oito replicatas do chá intradia (repetibilidade) e interdia (precisão intermediária). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros das curvas de calibração do 5-CQA e cafeína, conforme metodologia proposta pela International Conference of Harmonization (ICH) (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1996) e avaliada por RIBANI et al. (2004): $LD = 3,3*(s/S)$ e $LQ = 10*(s/S)$, sendo o “s” o desvio-padrão residual de regressão e o “S” o coeficiente angular.

5.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Dois lotes de animais foram utilizados, concomitantemente, para obtenção de material biológico, sendo o primeiro lote utilizado para a pesagem dos tecidos, coleta de sangue para análise bioquímica e obtenção da carcaça para análise da composição química, enquanto o segundo lote foi utilizado para a obtenção de amostras de tecido adiposo periepídidimo, antes e após o estímulo de insulina, as quais foram avaliadas a expressão gênica e proteica pelas técnicas de PCR em tempo real e *Western blot*, respectivamente (**Figura 4**).

Em ambos os lotes, a glicemia de jejum (8-12 h) foi determinada a partir do sangue da veia caudal, utilizando glicosímetro Accu-Chek Performa® (Roche Diagnostics, Basel, Suíça). Posteriormente, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (50 mg/kg; Anasedan, Jacaré, Brasil) e cloridrato de quetamina (100 mg/kg; Dopalen, Paulínia, Brasil), aplicada por via intramuscular, por meio de uma seringa de insulina com agulha 20-G.

Após serem anestesiados, os animais do primeiro lote foram decapitados, utilizando-se uma guilhotina apropriada. Esse procedimento foi realizado de forma rápida, visando minimizar qualquer forma de sofrimento ou estresse aos animais. Foram colhidas amostras do sangue com o anticoagulante EDTA a 10% para a obtenção do plasma, a partir do qual foram determinadas as concentrações de insulina, leptina, adiponectina, TNF- α , IL-6, MCP-1, AGT e perfil de AGNE. A partir do soro foram determinadas as concentrações de colesterol total, HDL-colesterol, TAG e proteína C reativa. Após a coleta do sangue, os coxins adiposos periepídidimo e retroperitoneal foram dissecados e pesados. Por último, as carcaças desses animais foram pesadas e utilizadas para a realização da análise da composição corporal.

No segundo lote de animais, a cavidade abdominal foi aberta e uma amostra do tecido adiposo periepídidimo (500 mg) foi coletada. Em seguida,

10 unidades (U) de insulina regular humana (Novolin R, Novo Nordisk, Monte Claros, M.G., 100U/mL) diluídas em solução salina foram injetadas via veia porta. Após 90 segundos do estímulo, outra amostra de tecido adiposo periepídídimal (500 mg) foi coletada (KUBOTA et al., 2008). As amostras foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em freezer -80 °C para futura análise. Os animais foram eutanasiados por decapitação, utilizando-se uma guilhotina apropriada. O sacrifício foi realizado no período da manhã, entre 8 e 12 h.

Figura 4 - Esquema de coleta do material biológico.

5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.4.1 Determinação da concentração sérica de glicose

A concentração sérica de glicose foi determinada a partir do sangue coletado pela veia caudal, utilizando glicosímetro *Accu-Chek Performa*[®] (Roche Diagnostics, Basel, Suíça).

5.4.2 Determinação da concentração sérica de colesterol total, HDL-colesterol e TAG

As dosagens de colesterol total e TAG foram realizadas por meio de *kit* comercial, baseado em método enzimático (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EUA). A determinação da concentração sérica de HDL-colesterol também foi realizada por método enzimático, utilizando o *kit* comercial *Randox HDL Cholesterol Direct* (Randox Laboratories, Crumlin, Reino Unido). O HDL-não colesterol foi calculado pela diferença entre o colesterol total e o HDL-colesterol.

5.4.3 Determinação da concentração plasmática de insulina, leptina, adiponectina, MCP-1, TNF- α , IL-6 e proteína C reativa

As concentrações séricas de insulina, leptina, adiponectina, MCP-1, TNF- α e IL-6 foram quantificadas com o auxílio do *kit* Lincoplex (Linco Research Inc., St. Charles, MO). O *kit* baseia-se no imunoensaio e na tecnologia Luminex[™] xMAP. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados a microesferas por meio de ligações covalentes não reversíveis. Tais microesferas são coradas com proporções diferentes de dois fluoróforos, o que lhes confere diferentes códigos de cores. Depois que o analito se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das

microesferas, a retenção final é feita por meio de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única por meio de feixes de dois lasers diferentes em citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

A concentração sérica de proteína C reativa foi quantificada por meio de *kit* PCR Turbilatex Ref. 20.015.00 (Biotécnica – Biotecnologia Avançada, Minas Gerais, Brasil).

5.4.4 Determinação da concentração plasmática de AGT

A concentração de AGT no plasma foi determinada por meio de *kit* (Biovision, Mountain View, EUA). Neste método, os ácidos graxos foram convertidos em CoA-derivados e oxidados, gerando cor e fluorescência. O octanoato e os ácidos graxos de cadeia longa foram quantificados por método colorimétrico em espectrofotômetro a 570 nm.

5.4.5 Determinação do perfil de ácidos graxos

Os lipídios totais plasmáticos foram extraídos de acordo com o método proposto por Shirai et al. (2005). A composição dos ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa pelo equipamento Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), equipado com coluna capilar DB-23 (J&W 122-2361) de 60 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme 0,15 µm. Para tanto, foi utilizado hélio como gás de arraste sob temperatura inicial de 140 °C e subsequente acréscimo de 1 °C/min, até atingir a estabilidade de 225 °C. A temperatura de injeção e de detecção foi ajustada em 250 °C e 260 °C, respectivamente. A identificação

do pico dos ácidos graxos nas amostras foi determinada pela comparação dos tempos de retenção da mistura padrão comercial FAME Supelco 37 Component mix; 47885-U e C4-C24 Even Carbon 49453-U (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). Os resultados foram expressos em percentual do total de ácidos graxos encontrados na amostra.

5.4.6 Cálculo do índice HOMA-IR e QUICKI

Para avaliação da resistência à ação da insulina foi utilizado o índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*), que utiliza como parâmetros a glicemia e a insulinemia de jejum. O índice HOMA-IR consiste no produto da concentração da glicose (mmol/L) e da concentração de insulina (μ IU/mL), dividido pelo fator 22,5 (MATTHEWS et al., 1985). A sensibilidade à ação da insulina foi estimada pelo índice QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*), calculada da seguinte forma: $QUICKI = 1/[\log(\text{Insulina de jejum } (\mu\text{U/mL})) + \log(\text{Glicemia de jejum } (\text{mg/dL}))]$ (KATZ et al., 2000).

5.5 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Foram realizados o oGTT e o ipITT na décima segunda e na décima sexta semanas do protocolo experimental. Em ambos os testes, os animais foram deixados 10 a 12 horas em jejum. No oGTT, uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal de cada rato (tempo 0), os quais receberam, imediatamente após, via gavagem, 2 g de glicose/kg de peso corporal, a partir de uma solução de glicose (20%) (JOBGEN et al., 2009). Após esse procedimento, amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. O cálculo da área sob a curva (AUC) foi utilizado para avaliar a tolerância à glicose.

Para o ipITT, injetou-se intraperitonealmente uma dose de insulina regular (Novolin R, 75 mU/100 g de peso corporal). A glicemia foi determinada em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 5 a 30 minutos foram utilizados para calcular a constante da taxa de decaimento da glicose (*Kitt*), de acordo com método proposto por BONORA et al. (1989).

Tanto a AUC, como o *Kitt* foram calculados no programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A glicemia foi obtida utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Performa® (Roche Diagnostics, Basel, Suíça).

5.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARÇAÇA

A composição corporal (água, lipídios, proteína e cinzas) foi determinada por meio de análise química da carcaça. Inicialmente, a carcaça foi submetida à secagem em uma estufa ventilada (aproximadamente 70 °C) durante sete dias. O conteúdo de umidade foi determinado por meio da diferença entre os valores obtidos na pesagem da carcaça antes e após a secagem da mesma. Posteriormente, a carcaça foi triturada e envolta em gaze e papel de filtro para a determinação do conteúdo total de lipídios, por meio da técnica de extração por solvente utilizando um extrator Soxhlet e éter etílico como solvente. A carcaça seca e ausente de lipídios foi completamente moído (IKA M20 grinder, Labortechnik, Wasserburg, Alemanha) e, posteriormente, peneirado para a remoção de pêlos, os quais podem reduzir a homogeneidade da amostra. Esse processo resultou em um pó altamente homogêneo, o qual foi utilizado para a determinação do conteúdo de proteína da carcaça pelo método de micro-Kjeldahl (ALBANESE e ORTO, 1963). Esse pó homogêneo também foi utilizado para a determinação de cinzas. Para tanto, dois gramas do pó

foram colocados em uma mufla, por 12 horas, a 550 °C e, após ser resfriado, o peso das cinzas foi determinado. A quantidade de massa magra foi calculada a partir da diferença entre a massa total da carcaça e a massa total de lipídios presentes na carcaça. O conteúdo de água, lipídios, proteínas, massa magra e de cinzas foi expresso em valor absoluto, bem como em percentual em relação à massa total da carcaça.

5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO ADIPOSEO BRANCO

5.7.1 Extração de proteínas totais

Para a realização da extração de proteínas totais, uma amostra de 400 mg de tecido adiposo periepididimal foi imersa em 1 mL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% Triton-X 100, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 20 mM NaF, 30 mM pirofosfato de sódio, 0.2% SDS, 0.5% deoxicolato de sódio e PMSF), contendo inibidores de fosfatase e protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Essa solução foi homogeneizada com o auxílio de um *polytron* (IKA, Werke Staufen, Alemanha) e centrifugada à 0 °C e 14.000 rpm por 15 minutos. O processo de centrifugação possibilitou a separação das fases e a remoção do extrato proteico (VICHAIWONG et al., 2009). A concentração de proteína total foi determinada por meio de ensaio colorimétrico, utilizando o *kit BCA Protein Assay* (Pierce Biotechnology, Rockford, EUA).

A partir do extrato proteico foram realizados os ensaios de determinação da expressão das proteínas TAK-1, IKK- β , I κ B- α , JNK e AKT, nas suas formas total e fosforilada, e do NF- κ B, na sua forma fosforilada. A expressão da proteína β -actina, a qual é expressa constitutivamente na célula, foi utilizada como normalizador nos ensaios de *Western blotting* (KAWAMOTO et al., 2008).

5.8 WESTERN BLOTTING

5.8.1 Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado conforme protocolo de Sambrook et al. (1989) e Harlow e Lane (1988), descrito sucintamente a seguir. Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1 % TEMED. O gel inferior (separação) foi preparado com 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris HCl (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

5.8.2 Preparo do extrato protéico com dodecil sulfato de sódio

O extrato proteico de tecido adiposo branco periepídimal foi preparado a partir de 65 µg de proteína. Ao extrato proteico foi adicionado o tampão Laemmli (5 x concentrado, 300 mM Tris.HCL, pH 6,8, 10% β-mercaptoetanol, 10% SDS, 50% glicerol, 0,01 % azul de bromofenol) na proporção 4:1. As amostras foram fervidas em banho seco à temperatura de 100 °C, por 5 minutos e, posteriormente, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular *Full-range Rainbow™ Molecular Weight Markers* (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, EUA).

5.8.3 Transferência de proteínas

Inicialmente, a membrana de nitrocelulose foi ativada em água milli-Q, em temperatura ambiente, por 1 minuto. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, 2 papéis de filtro, gel, membrana, 2 papéis

de filtro e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 200-400 mA, por 90 minutos. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5-10 minutos com corante Ponceau (1% Ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com PBST (NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e Tween).

5.8.4 Incubação com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados por uma hora com solução de bloqueio (*Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit*, Buckinghamshire, Reino Unido) a 2%, em tampão PBST. Os anticorpos (Cell Signaling, MA, EUA), os pesos moleculares e suas respectivas diluições estão listadas na **tabela 3**. As membranas foram incubadas *overnight*, sob agitação e à temperatura de 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 minutos, com PBST. As proteínas foram então marcadas com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído em tampão PBST e (*Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit*, Buckinghamshire, Reino Unido), a 2%, por 1 hora, com agitação. A membrana foi lavada com PBST 3 vezes, por 5 minutos, com agitação. Em seguida, a β -actina foi incubada, por 1 hora, diluída em tampão PBST e (*Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit*, Buckinghamshire, Reino Unido).

Tabela 3 - Peso molecular e diluições dos anticorpos

Anticorpo	Peso molecular	Diluição
TAK-1	80 kDa	1:1.000
p-TAK-1 (thr 184/187)	80 kDa	1:250
IKK- β	87 kDa	1:1.000
p-IKK- α/β (ser 176/180)	87 kDa	1:250
I κ B- α	40 kDa	1:1.000
p-I κ B- α (ser 32)	40 kDa	1:250
p-NF- κ B p65 (ser 536)	65 kDa	1:1.000
JNK	46/ 54 kDa	1:1.000
p-JNK (thr 183/tyr 185)	46/ 54 kDa	1:500
AKT	60 kDa	1:1.000
p-AKT (ser 473)	60 kDa	1:500
β -actina	42 kDa	1:50.000
IgG (secundário)		1:1.000

5.8.5 Revelação com sistema Quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura dos reagentes do kit ECL (*Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit*, Buckinghamshire, Reino Unido) na proporção de 1:1 (1 parte da solução A para 1 parte da solução B). Essa solução foi colocada sobre a membrana, o que resulta em uma reação de quimioluminescência. A imagem resultante foi captada por meio de um sistema de imagem digital (IMAGE QUANT™ 400 versão 1.0.0, Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA), utilizando o *software ImageQuant™ Capture Software*. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria pelo *software Quantity One* (Quantity One® Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA)

5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE mRNA POR PCR EM TEMPO REAL

A avaliação da expressão gênica de TNF- α , MCP-1 e adiponectina (mRNA) foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (HIGUCHI et al., 1992), utilizando o equipamento Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, San Diego, CA, EUA). O RNA total foi extraído utilizando o *QIAzol Lysis Reagent* e o *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EUA), conforme descrito por Chomczynski e Sacchi (1987).

Uma amostra de 100-150 mg de tecido adiposo periepididimal foi extraída com 1 mL de *QIAzol*[®] (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EUA), com auxílio do homogeneizador IKA T10 Basic Ultra-Turrax[®] (IKA, Werke Staufen, Alemanha). Em seguida, 200 μ L de clorofórmio foram adicionados aos tubos e centrifugados a 12.000 x *g*. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescida de etanol a 70% na mesma proporção. A solução foi colocada em coluna e centrifugada a 12.000 x *g* por 15 segundos. Tampões de lavagem foram adicionados à coluna e novamente centrifugados a 12.000 x *g*, por 15 segundos. O RNA foi eluído em 20 μ L de água livre de RNase. Após a extração, realizou-se a transcrição reversa. O RNA foi quantificado por meio da medida da sua absorbância a 260 nm no equipamento *NanoVue*[™] (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, EUA). A pureza do RNA foi avaliada pela razão 260/280 nm (SAMBROOK et al., 1989).

O cDNA foi sintetizado utilizando 1 μ g de RNA e o reagente *High Capacity RNA to DNA master mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação ocorreu por meio de incubação em termociclador nas seguintes etapas: 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 30 minutos e 85 °C por 5 minutos. O cDNA foi armazenado a -20 °C antes da realização da reação de PCR.

Para a realização da reação de PCR em tempo real, 1 μ L de cDNA foi adicionado a um volume final de 20 μ L, contendo 0,1 μ M de cada *primer*

(sense e antisense) e 10 µL de *SYBR FAST* (1000 x diluído) (Kapa Biosystem, Massachusetts, EUA) como sonda fluorescente. A reação foi submetida a 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos para a fase de denaturação, 60 °C por 30 segundos para a fase de anelamento e 72 °C por 1 segundo para a fase de extensão. As sequências dos *primers* foram desenhadas usando informação disponibilizada no BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A temperatura de anelamento e a sequência dos *primers* estão descritas na **tabela 3**. A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método descrito por Liu & Saint (LIU e SAINT, 2002), usando o gene ciclofilina como controle interno.

Tabela 4 - Temperatura de anelamento e sequência dos *primers* utilizados

Gene	Primer sense	Primer antisense	Temperatura de anelamento (°C)
MCP-1	TGCCCCACTCACCTGCTGCT	TGGGGTCAGCACAGATCTCTCTCT	60 °C
TNF-α	GCGTGTTTCATCCGTTCTCTA	GAGCCACAATTCCCTTTCTAA	60 °C
Adiponectina	AATGCTGGACCAAACACAAA	CCTTCTTTCACCTTCCCAAA	60 °C
Ciclofilina	AATGCTGGACCAAACACAAA	CCTTCTTTCACCTTCCCAAA	60 °C

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de dados referentes ao efeito da ingestão da ração HL foram avaliadas quanto à normalidade de distribuição pelo teste Kolmogorov-Smirnov e suas variâncias comparadas pelo teste F. A comparação das médias foi realizada pelo teste *t* de Student não pareado. Quando os valores não obedeciam à distribuição gaussiana, o teste de Mann-Whitney foi utilizado.

Os resultados de cada parâmetro relativos ao efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foram inicialmente avaliados quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste Kolmogorov-Smirnov e à homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett, e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para identificação dos contrastes significantes. Em caso de distribuição não gaussiana, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para identificação das diferenças significativas. As análises foram realizadas por meio do software GraphPad.Prism® (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6.1 EFEITO DA INGESTÃO DA RAÇÃO HIPERLIPÍDICA

A **tabela 5** mostra a composição percentual de ácidos graxos das rações CON e HL. Nota-se que, a ração HL apresenta maior percentual de AGS (36.6%) e alto teor de ácido oleico (40.1%), bem como maior percentual da razão n-6:n-3 (14.8%) em comparação à ração CON. Em contrapartida, a ração CON apresenta maior teor de ácidos graxos poli-insaturados, tendo como principal representante o ácido linoleico (48.4%).

Tabela 5 - Composição de ácidos graxos (%) das rações experimentais

	CON	HL
Ácidos graxos saturados		
Ácido mirístico (C 14:0)	0,8 ± 0,01	1,3 ± 0,03
Ácido palmítico (C 16:0)	14,1 ± 0,03	23,3 ± 0,13
Ácido esteárico (C 18:0)	4,4 ± 0,01	12,0 ± 0,22
Soma AGS	19,3 ± 0,03	36,6 ± 0,20
Ácidos graxos monoinsaturados		
Ácido oleico (C 18:1)	27,1 ± 0,03	40,1 ± 0,06
Soma AGMI	27,1 ± 0,03	40,1 ± 0,06
Ácidos graxos poli-insaturados		
Ácido linoleico (C 18:2 n-6)	48,4 ± 0,07	21,9 ± 0,22
Ácido γ-linolênico (C 18:3 n-6)	0,2 ± 0,00	nd
Ácido α-linolênico (C 18:3 n-3)	5,0 ± 0,01	1,5 ± 0,03
EPA (C 20:5 n3)	0,06 ± 0,00	nd
Soma AGPI	53,6 ± 0,06	23,4 ± 0,25
Soma AGPI n-6	48,6 ± 0,07	21,9 ± 0,22
Soma AGPI n-3	5,0 ± 0,01	1,5 ± 0,03
Razão n-6:n-3	9,7 ± 0,03	14,8 ± 0,18

Os resultados são expressos em média ± desvio-padrão (n=2-3). A sigla nd representa ácidos graxos não detectados. AGS, ácidos graxos saturados; AGMI, ácidos graxos monoinsaturados; AGPI, ácidos graxos poli-insaturados; EPA, ácido eicosapentaenoico; n-3, ômega 3; n-6, ômega 6; CON, ração controle; HL, ração hiperlipídica.

Assim como observado no estudo piloto, os animais *baseline* submetidos à ração HL apresentaram consumo de ração (em gramas) estatisticamente menor que o grupo submetido à ração controle ao longo de todo protocolo experimental. Contudo, devido à maior densidade energética, o consumo calórico não diferiu entre os grupos CONBL e HLBL, exceto na 12^a semana do protocolo, conforme mostra a **figura 5**.

Figura 5 - Consumo médio diário de ração em gramas (A), consumo total de ração em gramas (B), consumo médio diário de ração em calorias (C) e consumo total de ração em calorias (D) de ratos *Wistar* até a 12^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 12/ grupo). Teste *t* de *Student*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao grupo CONBL. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Os animais do grupo HLBL não apresentaram aumento significativo do peso corporal quando comparados ao grupo CONBL, exceto na sexta e na sétima semana do protocolo experimental (**figura 6A**). Também não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao percentual de ganho de peso ao final da 12^a semana (**figura 6B**). Contudo, a ração HL promoveu aumento significativo do peso relativo dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal, bem como aumento do conteúdo de lipídios (em gramas) da carcaça. Ao analisar o percentual de gordura e de massa magra na carcaça do grupo HLBL, estes diferiram estatisticamente quando comparados ao grupo CONBL (**tabela 6**).

Figura 6 - Evolução do peso corporal (A) e percentual de ganho de peso (B) de ratos *Wistar* até a 12^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 12/grupo). Teste *t* de *Student*: * $p < 0.05$ em relação ao grupo CONBL. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Tabela 6 - Peso dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal relativo ao peso corporal e composição corporal da carcaça dos grupos *baseline*

	CONBL	HLBL
Adiposidade		
TA periepididimal (g/100 g p.c.)	1,99 ± 0,26	2,94 ± 0,77*
TA retroperitoneal (g/100 g p.c.)	2,08 ± 0,39	3,11 ± 0,81*
Composição corporal		
Água (g)	255,6 ± 22,7	255,2 ± 33,6
Água (%)	55,4 ± 5,5	50,4 ± 5,3
Massa magra (g)	382,6 ± 33,5	401,0 ± 32,4
Massa magra (%)	82,6 ± 1,5	79,3 ± 3,3*
Lipídios (g)	80,53 ± 7,6	105,3 ± 20,8*
Lipídios (%)	17,4 ± 1,5	20,7 ± 3,3*
Proteínas (g)	96,2 ± 27,2	106,7 ± 15,7
Proteínas (%)	20,6 ± 4,6	21,4 ± 3,2
Cinzas (g)	22,7 ± 6,1	23,8 ± 7,1
Cinzas (%)	4,8 ± 1,3	4,7 ± 1,4

Os resultados são expressos em média ± desvio-padrão (n = 6-12/ grupo). Teste *t* de Student. *p<0.05 em relação ao grupo CONBL. TA, tecido adiposo; p.c., peso corporal. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Ao serem submetidos ao oGTT, os animais do grupo HLBL apresentaram valores de glicemia significativamente maiores que o grupo CONBL, em todos os tempos avaliados (**figura 7A**). Da mesma forma, a **figura 7B** mostra que o grupo HLBL apresentou área sob a curva (AUC) estatisticamente superior ao grupo CONBL, indicando maior intolerância à glicose. Além disso, a glicemia nos tempos 0, 5 e 40 minutos no ipITT foi significativamente superior no grupo HLBL em relação ao grupo CONBL (**figura 7C**). No entanto, a taxa de decaimento da glicose no ipITT não diferiu entre os grupos. Da mesma forma, a ração HL não afetou a concentração plasmática de insulina, nem os valores de HOMA-IR e QUICKI, conforme indica a **tabela 7**.

Figura 7 - Curva glicêmica (A) e área sob a curva (AUC) (B) do teste oral de tolerância à glicose (oGTT), curva glicêmica (C) e taxa de decaimento da glicose (*Kitt*) (D) do teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão ($n = 12$ / grupo). Teste *t* de *Student*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ em relação ao grupo CONBL. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Quanto aos parâmetros lipídicos avaliados (**tabela 7**), o grupo HLBL apresentou aumento significativo das concentrações séricas de colesterol total e colesterol não-HDL quando comparado ao grupo CONBL. Contudo, não foram encontradas diferenças estatísticas em relação às concentrações séricas de HDL-colesterol e TAG. A ração HL também não alterou a concentração plasmática de AGT.

Em relação às concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina, IL-6, TNF- α e MCP-1, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos HLBL e CONBL. Contudo, a ração HL promoveu aumento significativo da concentração sérica de proteína C reativa (**tabela 7**).

Tabela 7 - Biomarcadores sanguíneos dos grupos *baseline*

	CONBL	HLBL
Parâmetros glicêmicos		
Glicose (mg/dL)	88,7 $\pm$ 7,7	99,5 $\pm$ 6,0*
Insulina (μ U/mL)	27,4 $\pm$ 15,6	26,4 $\pm$ 6,4
HOMA-IR	6,5 $\pm$ 4,0	6,9 $\pm$ 2,1
QUICKI	0,31 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,01
Parâmetros lipídicos		
Colesterol total (mg/dL)	68,3 $\pm$ 7,1	79,3 $\pm$ 6,6*
HDL-c (mg/dL)	21,8 $\pm$ 2,6	20,3 $\pm$ 1,4
Colesterol não-HDL (mg/dL)	46,5 $\pm$ 5,0	59,0 $\pm$ 6,3*
TAG (mg/dL)	96,2 $\pm$ 20,1	104,5 $\pm$ 20,5
AGT (nmol/ μ L)	0,15 $\pm$ 0,09	0,13 $\pm$ 0,11
Parâmetros inflamatórios e adipocinas		
Proteína C reativa (ng/mL)	611 $\pm$ 260	1002 $\pm$ 168*
TNF- α (pg/mL)	4,1 $\pm$ 0,8	4,5 $\pm$ 1,8
IL-6 (pg/mL)	15,5 $\pm$ 4,5	21,7 $\pm$ 10,7
MCP-1 (pg/mL)	187 $\pm$ 37	185 $\pm$ 77
Leptina (pg/mL)	2509 $\pm$ 511	3389 $\pm$ 817
Adiponectina (ng/mL)	12994 $\pm$ 4983	9900 $\pm$ 2897

Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio-padrão (n= 6 grupo). Teste *t* de Student. *p<0.05 em relação ao grupo CONBL. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

A **tabela 8** apresenta o perfil plasmático de AGNE de ratos na 12^a semana do protocolo. Os animais do grupo HLBL apresentaram maior teor de ácido graxo esteárico (C 18:0) e ácido araquidônico (C 20:4 n-6) e menor teor de ácido graxo linoleico (C 18:2 n-6) e palmítico (C 16:0) em relação ao grupo CONBL. Além disso, a ração HL promoveu aumento significativo do percentual de AGS totais e redução do percentual dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) totais no plasma.

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos no plasma (%) dos grupos *baseline*

	CONBL	HLBL
Ácidos graxos saturados		
Ácido mirístico (C 14:0)	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,7
Ácido palmítico (C 16:0)	22,0 ± 1,0	20,0 ± 1,7*
Ácido esteárico (C 18:0)	7,2 ± 0,8	13,8 ± 1,7***
Soma AGS	28,8 ± 0,8	33,6 ± 1,9***
Ácidos graxos monoinsaturados		
Ácido palmitoleico (C 16:1)	4,1 ± 1,0	0,8 ± 0,2**
Ácido oleico (C 18:1)	20,2 ± 2,3	18,5 ± 3,2
Soma AGMI	24,3 ± 3,0	18,8 ± 3,3*
Ácidos graxos poli-insaturados		
Ácido linoleico (C 18:2 n-6)	26,0 ± 2,7	19,3 ± 1,8**
Ácido α-linolênico (C 18:3 n-3)	nd	2,9 ± 1,7
Ácido araquidônico (C 20:4 n-6)	19,6 ± 3,4	25,1 ± 3,0*
EPA (C 20:5 n-3)	nd	3,0 ± 1,7
DHA (C 22:6 n-3)	2,1 ± 0,1	1,3 ± 0,7
Soma AGPI	46,9 ± 3,3	47,6 ± 3,3

Os resultados são expressos em média ± desvio-padrão (n= 6/grupo). Teste *t* de *Student*: *p<0.05, ** p<0.01 e *** p<0.001 em relação ao grupo CONBL. A sigla nd representa os ácidos graxos não detectados. AGS, ácidos graxos saturados; AGMI, ácidos graxos monoinsaturados; AGPI, ácidos graxos poli-insaturados; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosaenoico; n-3, ômega 3; n-6, ômega 6;. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Quanto à expressão e fosforilação de proteínas envolvidas com a via inflamatória do fator de transcrição NF- κ B no tecido adiposo periepídidimo, houve aumento da expressão da proteína TAK-1 e redução da IKK- β total no grupo HLBL. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a proteína I κ B- α , na sua forma total e fosforilada, nem para as proteínas TAK-1, IKK- α/β e NF- κ B p65, na sua forma fosforilada. Também não foram encontradas diferenças estatísticas quando avaliadas as razões entre a forma fosforilada e total das proteínas TAK-1, IKK- β e I κ B- α (**figuras 8, 9, 10 e 11**).

Além da IKK- β , outras proteínas envolvidas na regulação da via de sinalização da insulina (JNK e AKT) foram avaliadas. Observa-se que houve redução da fosforilação da AKT no tecido adiposo periepídidimo dos animais submetidos à ração HL, após serem estimulados com insulina. Essa redução foi igualmente significativa quando calculada a razão AKT fosforilada:AKT total. Contudo, não foram verificadas diferenças estatísticas para a fosforilação, expressão e razão fosforilada/total da proteína JNK (**figuras 12 e 13**).

Além disso, o consumo da ração HL, por 12 semanas, não alterou a expressão de RNA mensageiro do TNF- α , da MCP-1 e da adiponectina no tecido adiposo periepídidimo, como mostra a **figura 14**.

Figura 8 - Fosforilação da TAK-1 em treonina 184/187 (A), expressão da TAK-1 total (B) e razão entre TAK-1 fosforilada e TAK-1 total (C) no tecido adiposo periepididimal de ratos *Wistar* no *baseline*.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. Teste *t* de *Student*. *p<0,05 em relação ao grupo CONBL. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Figura 9 - Fosforilação da IKK-α/β em serina 176/180 (A), expressão da IKK-β total (B) e razão entre IKK-α/β fosforilada e IKK-β total (C) no tecido adiposo periepídido de ratos *Wistar* no *baseline*.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. Teste *t* de *Student*. *p<0,05 em relação ao grupo CONBL. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Figura 10 - Fosforilação da IκB-α em serina 32 (A), expressão da IκB-α total (B) e razão entre IκB-α fosforilada e IκB-α total (C) no tecido adiposo periepididimal de ratos *Wistar* no *baseline*.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Figura 11 - Fosforilação do NFκB (p65) em serina 536 no tecido adiposo periepídimal de ratos *Wistar* no *baseline*.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Figura 12 - Fosforilação da JNK em treonina 183 e tirosina 185 (A), expressão da JNK total (B) e razão entre JNK fosforilada e JNK total (C) no tecido adiposo periepididimal de ratos *Wistar* no *baseline*.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Figura 13 - Fosforilação da AKT em serina 473 (A), expressão da AKT total (B) e razão entre AKT fosforilada e AKT total (C) no tecido adiposo periepididimal de ratos *Wistar* no *baseline*.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão ($n = 6/\text{grupo}$). UA = Unidades Arbitrárias. Análise de variância ANOVA, seguido de teste de Tukey: barras com letras distintas diferem estatisticamente. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

Figura 14 - Expressão relativa do RNA mensageiro do TNF- α (A), MCP-1 (B) e adiponectina (C) no tecido adiposo periepididimal de ratos *Wistar* no *baseline*.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão ($n = 6$ /grupo). UA = Unidades Arbitrárias. (CONBL, grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL, grupo *baseline* alimentado com ração hiperlipídica)

6.2 EFEITO DA INGESTÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE

A caracterização dos compostos bioativos revelou 103 mg/g de fenólicos totais e 15 mg/g de cafeína no extrato aquoso de erva-mate. Foram identificados onze compostos fenólicos (UPLC-DAD), sendo quatro isômeros do ácido cafeoilquínico, três do ácido dicafeoilquínico, dois do ácido cafeoilshiquimico e ainda o ácido feruloilquínico e a rutina. Não foram encontrados os ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico nas formas livres. A identificação dos compostos fenólicos e da cafeína é apresentada nos cromatogramas (**Figura 15, 16 e 17**) e a ingestão média diária desses compostos pelos grupos CONEM e HLEM está listada na tabela abaixo (**Tabela 9**).

Figura 15 - Cromatograma UPLC-DAD ($\lambda = 324$ nm) com compostos fenólicos presentes no chá mate solúvel

Figura 16 - Cromatograma UPLC-DAD ($\lambda = 272$ nm) com identificação da cafeína presente no chá mate

Figura 17 - Espectrometria DAD (λ 220 a 400 nm) dos compostos fenólicos e cafeína presentes no extrato de erva-mate.

Tabela 9 - Caracterização dos compostos bioativos presentes no extrato de erva-mate e a ingestão média diária por animal

Compostos	Pico ^a	TR (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon(s) produto (m/z)	Quantidade (mg/g de ES) ^t	Ingestão média diária (mg/animal) ^c	
						CONEM	HLEM
Ácido 3-cafeoilquínico	1	1,1	353	191, 179	17,1	8,67 ± 0,05	8,82 ± 0,04
Ácido cafeoilquínico	2	1,7	353	191, 179	0,8	0,41 ± 0,00	0,41 ± 0,00
Ácido 5-cafeoilquínico	3	2,2	353	191	27,3	13,84 ± 0,09	14,09 ± 0,06
Ácido 4-cafeoilquínico	4	2,4	353	179	20,6	10,44 ± 0,07	10,63 ± 0,05
Ácido cafeoilshiquimico	5	4,5	335	160	1,9	0,96 ± 0,01	0,98 ± 0,00
Ácido feruloilquínico	6	6,2	367	173	0,9	0,46 ± 0,00	0,46 ± 0,00
Ácido cafeoilshiquimico	7	6,4	335	161	1,4	0,71 ± 0,00	0,72 ± 0,00
Ácido dicafeoilquínico	8	9,4	515	353	7,2	3,65 ± 0,02	3,71 ± 0,02
Ácido di-cafeoilquínico	9	9,6	515	353	9,3	4,71 ± 0,03	4,80 ± 0,02
Rutina	10	9,8	609	301	0,9	0,46 ± 0,00	0,46 ± 0,00
Ácido dicafeoilquínico	11	10,8	515	353	15,9	8,06 ± 0,05	8,20 ± 0,04
Fenólicos totais					103,3	52,36 ± 0,33	53,30 ± 0,23
Cafeína			195	138	14,91	7,56 ± 0,05	7,69 ± 0,03

^a Pico referente a figura 15 ^b Média das triplicatas. ^c Valores expressos em média e desvio-padrão (n = 8-12 animais/grupo). ES, extrato seco. (CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Tabela 10 - Parâmetros de validação do método analítico (UPLC-DAD) para caracterização do chá mate solúvel: precisão intra e inter-dia para tempo de retenção (TR) e área dos picos

Composto	Precisão intra-dia(n=8)		Precisão inter-dia(n=8)		LD (µg/ml)	LQ (µg/ml)
	TR	Área do pico	TR	Área do pico		
5-CQA	0,25%	0,08%	0,62%	1,98%	0,62	1,89
Cafeína	0,21%	0,68%	0,64%	1,65%	0,36	1,10

Resultados expressos como coeficiente de variação (CV%), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). 5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico.

A **figura 18** mostra que da 13^a a 15^a semana do protocolo, os animais alimentados com ração HL tiveram consumo significativamente menor de ração (em gramas) quando comparados aos grupos submetidos à ração CON. Contudo, o consumo calórico não diferiu entre os grupos estudados ao final da 16^a semana do protocolo experimental. Além disso, a ingestão do extrato aquoso de erva-mate não alterou a quantidade de ração consumida pelos grupos CON e HL.

Figura 18 - Consumo médio diário em gramas (A), consumo total de ração em gramas (B), consumo médio diário em calorias (C) e consumo total de ração em calorias (D) de ratos *Wistar* durante a intervenção nutricional.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 10-14/grupo). Análise de variância ANOVA, barras com letras distintas diferem estatisticamente *p<0,01 quando comparado CON x HL; # p<0,01 quando comparado CONEM x HLEM. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Não houve diferença estatística em relação ao peso corporal (**figura 19A**) entre os quatro grupos experimentais, no período correspondente a 13^a e a 16^a semana de protocolo experimental. No entanto, a **figura 19B** indica que a intervenção com extrato aquoso de erva-mate resultou em perda de peso corporal dos animais submetidos à ração HL, sendo esta redução de aproximadamente 1% do peso corporal, enquanto o grupo HL teve aumento de cerca de 2% do peso em relação aos valores observados na 13^a semana do protocolo experimental.

Ao contrário da 12^a semana, os animais alimentados com a ração HL não apresentaram aumento significativo dos pesos relativos dos coxins periepididimal e retroperitoneal. Além disso, a composição corporal não diferiu entre os grupos, como mostra a **tabela 11**.

Figura 19 - Evolução do peso corporal (A) e percentual de ganho de peso (B) de ratos *Wistar* durante a intervenção nutricional.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 8-14/grupo). Análise de variância ANOVA, barras com letras distintas diferem estatisticamente. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Tabela 11 - Peso dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal relativo ao peso corporal e composição corporal da carcaça dos grupos experimentais após a intervenção nutricional.

	CON	HL	CONEM	HLEM
Adiposidade				
TA periepididimal (g/100 g p.c.)	2,7 ± 0,9	2,6 ± 0,7	2,9 ± 1,3	3,4 ± 0,5
TA retroperitoneal (g/100 g p.c.)	2,5 ± 0,6	2,5 ± 0,7	2,5 ± 1,0	2,6 ± 0,3
Composição corporal				
Água (g)	268,8 ± 53,0	261,8 ± 32,3	279,6 ± 37,9	260,5 ± 29,9
Água (%)	52,0 ± 7,7	52,3 ± 6,3	55,1 ± 7,6	52,5 ± 1,5
Massa magra (g)	416,1 ± 47,7	411,8 ± 39,8	426,5 ± 53,4	411,6 ± 28,1
Massa magra (%)	80,6 ± 3,0	82,0 ± 3,1	83,6 ± 1,3	80,9 ± 1,0
Lipídios (g)	100,1 ± 16,3	92,3 ± 24,9	84,5 ± 16,9	97,0 ± 7,2
Lipídios (%)	19,5 ± 3,0	18,0 ± 3,1	16,5 ± 1,3	19,1 ± 1,0
Proteínas (g)	106,8 ± 31,7	111,9 ± 20,0	108,3 ± 30,9	113,2 ± 11,2
Proteínas (%)	28,7 ± 9,2	24,6 ± 5,9	24,4 ± 9,1	28,8 ± 1,9
Cinzas (g)	22,4 ± 5,1	24,7 ± 4,15	21,4 ± 3,8	26,1 ± 3,1
Cinzas (%)	4,3 ± 1,1	5,0 ± 0,6	4,0 ± 0,0	5,2 ± 1,2

Os resultados são expressos em média ± desvio-padrão (n = 6-12/ grupo). Análise de variância ANOVA. TA, tecido adiposo; p.c., peso corporal. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Ao avaliar os resultados referentes ao oGTT, nota-se que a glicemia dos animais do grupo HL estava significativamente mais elevada em comparação ao grupo CON nos tempos 30 e 60 minutos (**figura 20A**), indicando maior intolerância à glicose, cujo fato também pode ser observado na **figura 20B** por meio do cálculo da área sob a curva. Contudo, a ingestão do extrato aquoso de erva-mate não alterou a resposta glicêmica no oGTT.

No ipITT, a ingestão do extrato aquoso de erva-mate melhorou a resposta glicêmica nos tempos 5 e 10 minutos no grupo submetido à ração HL (**figura 20C**). No entanto, a taxa de decaimento da glicose não diferiu estatisticamente entre os grupos experimentais (**figura 20D**). Novamente, não houve efeito da ingestão do extrato de erva-mate sobre a sensibilidade à ação da insulina, inclusive após o cálculo do índice HOMA-IR e QUICKI, conforme mostra a **tabela 12**.

Figura 20 - Curva glicêmica (A) e área sob a curva (AUC) (B) do teste oral de tolerância à glicose, curva glicêmica (C) e constante de decaimento da glicose (*Kitt*) (D) do teste intraperitoneal de tolerância à insulina de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão ($n = 14/\text{grupo}$). Análise de variância ANOVA. Barras com letras diferentes diferem significativamente. * $p < 0,05$ quando comparado CON x HL; # $p < 0,05$ quando comparado CONEM x HLEM; § $p < 0,05$ quando comparado HL x HLEM. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

A ração HL promoveu aumento significativo da concentração sérica de TAG quando comparado com o grupo CON (**tabela 12**). Após a ingestão do extrato aquoso de erva-mate, os animais alimentados com ração HL tiveram redução da concentração sérica de colesterol total e de colesterol não-HDL (no caso do HDL não colesterol, o pós-teste não identificou quais grupos diferiam). Em contrapartida, não foram verificadas diferenças significativas para a concentração sérica de HDL-colesterol e de AGT entre os grupos.

De forma semelhante ao ocorrido na 12^a semana, os animais alimentados com a ração HL tiveram significativo aumento da concentração sérica de proteína C reativa, contudo, a administração do extrato aquoso de erva-mate não reduziu a concentração desse biomarcador inflamatório. Tanto a ração HL como a ingestão do extrato aquoso de erva-mate não alteraram significativamente os demais biomarcadores inflamatórios/adipocinas (**tabela 12**).

Tabela 12 – Biomarcadores sanguíneos dos grupos experimentais após a intervenção nutricional

	CON	HL	CONEM	HLEM
Parâmetros glicêmicos				
Glicose (mg/dL)	105,8 ± 10,1	96,6 ± 4,5	107,1 ± 11,5	109,0 ± 10,8
Insulina (μIU/mL)	35,4 ± 12,1	27,1 ± 13,4	26,7 ± 15,7	28,4 ± 2,6
HOMA-IR	9,18 ± 3,01	6,47 ± 3,07	7,06 ± 4,40	7,13 ± 1,01
QUICKI	0,28 ± 0,13	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,004
Parâmetros lipídicos				
Colesterol total (mg/dL)	76,5 ± 11,3 ^{a,b}	91,5 ± 10,8 ^a	76,2 ± 7,5 ^b	72,5 ± 10,5 ^b
HDL-c (mg/dL)	23,8 ± 2,1 ^{a,b}	23,8 ± 2,1 ^{a,b}	25,3 ± 2,8 ^a	21,00 ± 1,8 ^b
Colesterol não-HDL(mg/dL)	52,7 ± 9,2	67,8 ± 9,7	52,0 ± 6,4	56,0 ± 8,2
TAG (mg/dL)	94,8 ± 16,8 ^a	126,9 ± 23,7 ^b	100,5 ± 8,2 ^{a,b}	112,0 ± 20,1 ^{a,b}
AGT (nmol/μL)	0,17 ± 0,14	0,23 ± 0,05	0,19 ± 0,09	0,10 ± 0,08
Parâmetros inflamatórios/adipocinas				
Proteína C reativa (ng/mL)	783 ± 195 ^a	1151 ± 177 ^b	895 ± 134 ^{a,b}	1114 ± 260 ^{a,b}
TNF-α (pg/mL)	2,01 ± 0,47	1,84 ± 0,36	2,45 ± 0,97	1,75 ± 1,01
IL-6 (pg/mL)	12,2 ± 6,0	20,0 ± 11,4	21,9 ± 17,6	25,3 ± 14,3
MCP-1 (pg/mL)	129 ± 41	134 ± 22	119 ± 35	117 ± 43
Leptina (pg/mL)	5817 ± 2289	5979 ± 4419	4003 ± 2332	4780 ± 1900
Adiponectina (ng/mL)	14782 ± 8872	14545 ± 6623	9326 ± 2966	8722 ± 1807

Os resultados são expressos em média ± desvio-padrão (n= 6-8/ grupo). Análise de variância ANOVA, letras distintas diferem estatisticamente. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

De acordo com a **tabela 13**, nota-se que houve aumento do percentual de ácido esteárico (C 18:0) no plasma dos animais do grupo HL quando comparado ao grupo CON. No entanto, o extrato aquoso de erva-mate não alterou o perfil de ácidos graxos plasmático.

Tabela 13 - Perfil de ácidos graxos (%) dos grupos experimentais após a intervenção nutricional

	CON	HL	CONEM	HLEM
Ácidos graxos saturados				
Ácido cáprico (C 10:0)	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	nd	5,0 ± 6,1
Ácido láurico (C 12:0)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,3	nd	0,6 ± 0,6
Ácido mirístico (C 14:0)	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,9 ± 1,1
Ácido palmítico (C 16:0)	20,8 ± 1,2	17,8 ± 2,0	20,0 ± 0,9	13,2 ± 8,9
Ácido esteárico (C 18:0)	8,1 ± 0,8 ^a	13,8 ± 2,3 ^b	8,7 ± 1,2 ^{a,b}	12,3 ± 3,8 ^{a,b}
Soma AGS	30,2 ± 8,6	33,2 ± 8,1	29,3 ± 8,5	32,0 ± 7,4
Ácidos graxos monoinsaturados				
Ácido oleico (C 18:1)	17,0 ± 1,7	17,6 ± 4,6	16,3 ± 3,3	14,3 ± 2,3
Soma AGMS	17,0 ± 1,7	17,6 ± 4,6	16,3 ± 3,3	14,3 ± 2,3
Ácidos graxos poli-insaturados				
Ácido linoleico (C 18:2 n-6)	22,4 ± 2,6 ^a	17,2 ± 2,2 ^{a,b}	22,7 ± 1,8 ^{a,b}	15,6 ± 2,8 ^b
Ácido α-linolênico (C 18:3 n-3)	1,2 ± 0,4	2,5 ± 0,2	1,1 ± 0,3	2,2 ± 2,3
Ácido araquidônico (C 20:4 n-6)	22,7 ± 2,7	25,5 ± 6,0	25,0 ± 4,6	20,5 ± 6,2
EPA (C 20:5 n-3)	nd	nd	nd	nd
DHA (C 22:6 n-3)	2,6 ± 1,3	1,6 ± 0,5	1,9 ± 0,3	1,3 ± 0,8
Soma AGPI	49,0 ± 10,7	46,8 ± 10,8	51,0 ± 11,9	39,5 ± 9,3

Os resultados são expressos em média ± desvio-padrão (n= 6/group). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de Tukey ou Dunn: letras distintas diferem estatisticamente. A sigla nd representa os ácidos graxos não detectados. AGS, ácidos graxos saturados; AGMI, ácidos graxos monoinsaturados; AGPI, ácidos graxos poli-insaturados; EPA, ácido eicosapentanoico; DHA, ácido docosaexaenoico; n-3, ômega 3; n-6, ômega 6. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Na 16^a semana do protocolo experimental, verificou-se que os grupos experimentais não diferiram entre si em relação à fosforilação e/ou expressão das proteínas TAK-1, IKK-β, IκB-α, NF-κB (p65) e JNK no tecido adiposo branco periepídidimo. Também não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quando calculada a razão entre a proteína fosforilada e sua expressão total (**Figuras 21, 22, 23, 24 e 25**). Ao avaliar a fosforilação da AKT e a razão AKT fosforilada:AKT total, verificou-se diferença estatística apenas entre os grupos tratados com erva-mate com e sem estímulo (**Figura 26**). Contudo, a ingestão do extrato aquoso de erva-

mate não afetou significativamente a expressão, fosforilação e razão fosforilada:total das proteínas supracitadas. Similarmente, o consumo do extrato aquoso de erva-mate não afetou a expressão gênica do TNF- α , da MCP-1 e da adiponectina (figura 27).

Figura 21 - Fosforilação da TAK-1 em treonina 184/187 (A), expressão da TAK-1 total (B) e razão entre TAK-1 fosforilada e TAK-1 total (C) no tecido adiposo branco periepididimal de ratos *Wistar* após a intervenção nutricional.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Figura 22 - Fosforilação da IKK-α/β em serina 176/180 (A), expressão da IKK-β total (B) e razão entre IKK-α/β fosforilada e IKK-β total (C) no tecido adiposo branco periepididimal de ratos *Wistar* após a intervenção nutricional.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Figura 23 - Fosforilação da IkB-α em serina 32 (A), expressão da IkB-α total (B) e razão entre IkB-α fosforilada e IkB-α total (C) no tecido adiposo branco periepídido de ratos *Wistar* após a intervenção nutricional.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Figura 24 - Fosforilação do NF-κB (p65) em serina 536 no tecido adiposo branco periepídimo de ratos *Wistar* após a intervenção nutricional.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 6/grupo). UA = Unidades Arbitrárias. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Figura 25 - Fosforilação da JNK em treonina 183 e tirosina 185 (A), expressão da JNK total (B) e razão entre JNK fosforilada e JNK total (C) no tecido adiposo branco periepídídimo de ratos *Wistar* após a intervenção nutricional.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão ($n = 6/\text{grupo}$). UA = Unidades Arbitrárias. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Figura 26 - Fosforilação da AKT em serina 473 (A), expressão da AKT total (B) e razão entre AKT fosforilada e AKT total (C) no tecido adiposo branco periepididimal de ratos *Wistar* após a intervenção nutricional.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão ($n = 6/\text{grupo}$). UA = Unidades Arbitrárias; INS = insulina. Análise de variância ANOVA, $*p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo (CONEM ou HLEM) não estimulado com insulina. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

Figura 27 - Expressão relativa do RNA mensageiro do TNF- α (A), da MCP-1 (B) e da adiponectina (C) no tecido adiposo branco periepididimal de ratos *Wistar* após a intervenção nutricional.

Os valores são expressos em média e desvio-padrão ($n = 6/\text{grupo}$). UA = Unidades Arbitrárias. (CON, grupo alimentado com ração controle; HL, grupo alimentado com ração hiperlipídica; CONEM, grupo controle suplementado com erva-mate; HLEM, grupo hiperlipídico suplementado com erva-mate)

7 DISCUSSÃO

7.1 EFEITO DA INGESTÃO DA RAÇÃO HIPERLIPÍDICA

Nas últimas décadas, a mortalidade por DCNT aumentou consideravelmente. Dentre os fatores etiológicos envolvidos, o padrão de dieta inadequado, particularmente com alta ingestão de lipídios, tem sido apontado como um dos principais determinantes (ASTRUP et al., 2008). Dietas HL vêm sendo amplamente empregadas em modelos animais de indução de obesidade e de síndrome metabólica (BUETTNER et al., 2007; ROSINI et al., 2012). No presente estudo, ratos *Wistar* foram alimentados com ração HL à base de banha de porco, correspondendo aproximadamente 60% do valor calórico total (VCT). A ingestão dessa ração, por um período de 12 semanas, proporcionou aumento dos depósitos de gordura intra-abdominal e do conteúdo e percentual corporal de lipídios.

A hiperfagia, caracterizada pelo consumo excessivo de calorias, tem sido uma das causas do aumento da adiposidade em roedores (WOODS et al., 2004). Contudo, neste estudo, os animais que ingeriram a ração HL ajustaram espontaneamente o consumo de ração, de modo que a ingestão entre os grupos que consumiram ração CON e HL foi isocalórica ao longo do protocolo experimental. A ausência da hiperfagia em nosso modelo experimental pode estar relacionada com a composição de lipídios da ração. Além da função nutricional, os lipídios podem agir como sensores da ingestão alimentar no sistema nervoso central (FANTINO, 2011). Ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido oleico e seus metabólitos, podem reduzir a ingestão alimentar, atuando como mediadores da saciedade em regiões específicas do hipotálamo. Esse comportamento alimentar é regulado pela inibição da expressão de neuropeptídeos orexigênicos, como o neuropeptídeo Y (OBICI et al., 2002; LAM et al., 2005). Dessa maneira, é possível que o ácido oleico, presente em grande proporção na ração HL,

tenha modulado a expressão de neuropeptídeos orexigêncios, regulando o consumo alimentar.

De acordo com alguns trabalhos, o aumento da massa adiposa não está necessariamente relacionado ao aumento da ingestão alimentar (SO et al., 2011; ESTRANY et al., 2011). Em ratos *Sprague Dawley*, a obesidade foi associada aos padrões alimentares, como o aumento do tamanho da porção e menor frequência alimentar, ao invés da hiperfagia, visto que o valor calórico diário consumido foi similar entre os grupos HL e CON (FURNES et al., 2009; MELHORN et al., 2010). Além disso, é provável que o acúmulo de gordura intra-abdominal esteja relacionado com menor gasto energético. So et al. (2011) observaram que ratos submetidos à ração HL (60% VCT), por oito semanas, reduziram a atividade física durante o ciclo escuro, resultando em menor gasto energético, o que pode ter favorecido o incremento da massa adiposa.

Outro importante aspecto a ser considerado no aumento da adiposidade é o perfil de ácidos graxos provenientes da ração. Dentre os ácidos graxos, os AGS parecem apresentar maior potencial obesogênico. O efeito obesogênico dos AGS pode ser explicado por estes diminuírem a termogênese e a oxidação lipídica (CASAS-AGUSTENCH et al., 2009; HARIRI et al., 2010). Além disso, alguns ácidos graxos favorecem a atividade lipogênica no tecido adiposo (ESTRANY et al., 2011). O ácido palmítico, por exemplo, parece induzir a expressão da enzima lipase de lipoproteína em adipócitos de ratos, o que sugere aumento da captação tecidual de ácidos graxos (SARAVANAN et al., 2005), e consequentemente, aumento da adiposidade intra-abdominal.

O perfil de ácidos graxos plasmáticos comumente reflete a composição de ácidos graxos da dieta (BUETTNER et al., 2006). Conforme esperado, a ingestão da ração HL resultou em aumento do percentual plasmático de ácido graxo esteárico, bem como do teor de AGS totais. Cabe destacar que, apesar do teor plasmático de AGMI totais e do ácido palmítico ser menor no grupo HL, seus respectivos valores absolutos não diferiram estatisticamente. A modulação do perfil lipídico sérico também é decorrente

do tipo de ácidos graxos proveniente da ração HL. Neste estudo, o percentual de ácido palmitoleico plasmático no grupo alimentado com ração HL foi significativamente menor do que no grupo CON. Apesar de controverso, estudos mostram que a ingestão de óleo de macadâmica, rico em ácido palmitoleico, tem efeito protetor contra o processo aterosclerótico, visto que o consumo desse óleo está relacionado com a elevação da concentração plasmática de HDL-colesterol (MATTHAN et al., 2009). Outros estudos mostram que dieta rica em AGS (láurico, mirístico e palmítico) tem a capacidade de elevar a concentração sérica de LDL-colesterol, enquanto que AGMI e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) parecem reduzir a colesterolemia. Sugere-se que o aumento da concentração sérica de colesterol esteja relacionado com a redução da atividade dos receptores de LDL (LDLR) e com o aumento do fator de transcrição SREBP-1c, que é o principal regulador hepático da síntese de ácidos graxos (FERNANDEZ e WEST, 2005; VALLIM e SALTER, 2010). No presente estudo, a ração HL, composta principalmente por AGS e AGMI, aumentou a concentração sérica de colesterol total e de colesterol não-HDL.

Aliado à dislipidemia, a ração HL provocou aumento da glicemia de jejum, apesar de não ter afetado a insulinemia e os valores de HOMA-IR e QUICKI, medidas que estimam a resistência e a sensibilidade à insulina, respectivamente. Todavia, frente a uma carga de glicose (oGTT), os animais submetidos à ração HL tiveram menor resposta glicêmica em comparação aos animais do grupo CON, sugerindo o desenvolvimento da intolerância à glicose. Essa intolerância pode estar relacionada com o comprometimento das células β -pancreáticas em secretar insulina, resultando em menor captação de glicose pelas células (MANCO et al., 2004). Em camundongos induzidos à resistência insulínica, três meses de ingestão da ração HL induziu hipertrofia das células β -pancreáticas (AHRÉN et al., 2010). Tais alterações morfológicas no tecido pancreático podem representar, inicialmente, adaptação à condição instalada, entretanto, a exposição crônica aos ácidos graxos pode desencadear a resistência insulínica e o desenvolvimento do DM tipo 2 (MANCO et al., 2004).

Os animais alimentados com ração HL ainda apresentaram menor resposta glicêmica nos tempos 5 e 40 minutos do ipITT, apesar da taxa de decaimento da glicose (*Kitt*) não diferir entre os grupos. Diferente do oGTT, a menor captação de glicose no ipTT reflete uma resistência periférica à insulina.

A AKT é considerada uma das proteínas quinases chaves, envolvida na sinalização da insulina e na regulação da captação de glicose, e sua ativação depende da fosforilação nos sítios regulatórios de serina 473 e/ou treonina 308 (SCHINNER et al., 2005). Neste estudo, a expressão e a fosforilação da AKT foram avaliadas no tecido adiposo periepídido de ratos. Interessantemente, a fosforilação da AKT em serina 473 foi menor no grupo HL após estimulação com insulina, indicando que a ração HL comprometeu, de modo agudo, a sensibilidade à insulina no tecido adiposo periepídido. Cabe destacar que a ração HL também prejudicou a sensibilidade à insulina no fígado desses animais (JACOB et al., 2013).

A resistência insulínica pode ser mediada por citocinas pró-inflamatórias, pela concentração de ácidos graxos intracelulares, bem como pela ativação de proteínas quinases, como a JNK e a IKK- β (HOTAMISLIGIL, 2003; SOLINAS e KARIN, 2010). Essas proteínas quinases são responsáveis em promover a fosforilação do resíduo de serina e treonina do IRS, inibindo a via de sinalização da insulina e, conseqüentemente, impedindo a translocação dos receptores de glicose (GLUT)-4 do citosol para a membrana plasmática celular (SCHENK et al., 2008; BOURA-HALFON e ZICK, 2009). Neste estudo, a ração HL não afetou a concentração plasmática de AGT e de citocinas pró-inflamatórias, nem a expressão/fosforilação da JNK e da IKK- β no tecido adiposo periepídido em comparação ao grupo CON. É provável que outras proteínas, como a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e a proteína quinase C (PKC), tenham interferido na sinalização e ação da insulina, inibindo a fosforilação do resíduo do IRS-1 em tirosina 1222 (BOURA-HALFON e ZICK, 2009).

Embora a ração HL não tenha afetado significativamente a concentração plasmática de TNF- α , IL-6 e MCP-1, o consumo desta ração provocou aumento significativo da concentração sérica da proteína C reativa — importante marcador inflamatório de fase aguda —, indicando a presença de um quadro inflamatório sistêmico. A proteína C reativa é preferencialmente secretada pelo fígado em resposta às citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6 (KANEKO et al, 2011). Estudos mostram que a proteína C reativa pode regular diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e a resistência insulínica, interferindo na via das MAPK, intensificando ainda mais o quadro inflamatório (XI et al., 2011; LIU et al., 2011). A elevação da concentração sérica da proteína C reativa representa relevante fator de risco para o desenvolvimento de DM tipo 2 e de doenças coronárias (HORIUCHI e MOGI, 2011).

Evidências mostram que o tecido adiposo branco tem papel central na inflamação crônica induzida pela obesidade e está relacionado com diversas complicações metabólicas, como o desenvolvimento da resistência à insulina e de DCV. O desbalanço energético causado pela obesidade provoca estresse metabólico no tecido adiposo visceral, caracterizado pela infiltração de macrófagos e ativação de vias de sinalização inflamatória, o que promove aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias (OUCHI et al., 2011). Neste estudo, foi avaliado o efeito da ingestão da ração HL sobre a via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B e sobre a expressão gênica de TNF- α , MCP-1 e adiponectina. Observou-se, após 12 semanas, que a ingestão da ração HL não induziu inflamação crônica no tecido adiposo periepídídimo, nem alterou a expressão de adipocinas em nível transcricional. Um importante aspecto a ser considerado, é o fato de que os ingredientes das rações (com exceção do amido de milho e da banha suína) foram ajustados segundo o valor energético. Esse ajuste permitiu que os animais de ambos os grupos consumissem quantidades similares de proteínas, de micronutrientes e de fibras alimentares. O desbalanço de macro e micronutrientes poderia acarretar em alterações na resposta inume

e inflamatória. Alguns micronutrientes, como a vitamina D e o zinco, são capazes de modular a resposta inflamatória.

A deficiência de vitamina D está associada a várias condições inflamatórias, como o DM tipo 2 e as doenças autoimunes (COHEN-LAHAV et al., 2006). Em ratos obesos, a deficiência de vitamina D induz inflamação no fígado, via ativação do TLR (ROTH et al., 2012). Além disso, a forma ativa da vitamina D, $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$, reduz a atividade do fator de transcrição NF- κ B, por aumentar a estabilidade do I κ B- α e reduzir a fosforilação do I κ B- α em macrófagos (BORGES et al., 2011). Outro importante micronutriente capaz de modular a resposta inflamatória é o zinco. Além de ser componente estrutural de várias proteínas, o zinco pode proteger contra estímulos pró-inflamatório e pró-oxidativo (REITERER et al., 2004). Quantidades adequadas de zinco são necessárias para exercer o papel anti-inflamatório do PPAR, via interação física com a subunidade p65 do NF- κ B, bloqueando a ligação do NF- κ B ao DNA, bem como pelo aumento da expressão do I κ B- α (SHEN et al., 2008). Dessa forma, é possível que o ajuste das rações tenha protegido o tecido adiposo periepídido contra a manifestação do quadro inflamatório, visto que alguns aminoácidos, fibras alimentares e certos micronutrientes poderiam influenciar, de certo modo, a resposta inflamatória.

7.2 EFEITO DA INGESTÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE

Inúmeras propriedades biológicas têm sido atribuídas à erva-mate, especialmente no controle das DCNT (BASTOS et al., 2007). Este estudo teve como objetivo central avaliar o efeito da ingestão crônica de erva-mate sobre as alterações metabólicas induzidas pelo consumo de uma ração HL, sobretudo, na resposta inflamatória do tecido adiposo branco de ratos. Conforme discutido anteriormente, a ração hiperlipídica ajustada pode ter minimizado a inflamação crônica no tecido adiposo, no entanto, a ração HL

foi capaz de provocar importantes disfunções metabólicas, como alterações do perfil lipídico, comprometimento da resposta glicêmica e aumento da concentração sérica da proteína C reativa, um dos principais biomarcadores inflamatórios sistêmicos.

Ao contrário dos grupos *baseline*, os animais alimentados com ração HL até a 16ª semana não apresentaram aumento dos coxins adiposos intra-abdominal, nem do conteúdo de lipídios corporal quando comparados com o grupo CON. Isso pode ter ocorrido pelo fato dos animais utilizados neste estudo serem de linhagem não isogênica. Alguns autores relatam que uma fração dos animais submetidos à ração HL são resistentes à obesidade (BUETTNER et al., 2007; MADSEN et al., 2010; BAGNOL et al., 2012), o que explica a diferença encontrada nas duas etapas do protocolo. De acordo com nossos resultados, Pimentel et al (2012) utilizando o mesmo modelo animal (ratos *Wistar*) não observaram redução do peso corporal e da massa adiposa após dois meses de ingestão do extrato aquoso de erva-mate (PIMENTEL et al., 2012). Dessa forma, é possível que diferentes modelos animais respondam de maneira distinta à ração e à suplementação de erva-mate.

Embora a intervenção com erva-mate não tenha reduzido a adiposidade, ela foi capaz de atenuar o ganho de peso corporal dos animais submetidos à ração HL, sem alterar o consumo de ração. Diversos compostos bioativos presentes na erva-mate podem estar envolvidos na redução do ganho de peso. A cafeína, principal metilxantina presente no chá mate, é responsável por estimular o sistema nervoso simpático pela liberação de catecolaminas, o que pode ter induzido a atividade lipolítica em adipócitos (KOBAYASHI-HATTORI et al., 2005). A cafeína ainda pode atuar como antagonista dos receptores de adenosina, aumentando a produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), o que também contribui para o aumento da lipólise (PANCHAL et al., 2012). Além da cafeína, outros compostos bioativos como as saponinas e os compostos fenólicos parecem favorecer a perda de peso em modelos animais (CHO et al., 2010; RESENDE et al., 2012). A saponina derivada do ácido ursólico e alguns

compostos fenólicos (rutina e ácido clorogênico) foram os principais compostos responsáveis pela inibição da adipogênese em cultura de pré-adipócitos 3T3-L1, suprimindo a expressão de importantes genes envolvidos na adipogênese, como o PPAR γ 2 e a proteína ligadora de amplificadores de CCAAT (C/EBP α) (GOSMANN et al., 2012).

Além dos mecanismos citados, a perda de peso também pode estar relacionada com o aumento da termogênese e da oxidação lipídica. Arçari et al. (2009) demonstraram que a administração do extrato aquoso de erva-mate, por oito semanas, resultou no aumento da expressão gênica de proteínas desacopladoras (UCP)-1 e do coativador do receptor ativado por PPAR (PGC)-1 α no tecido adiposo marrom de camundongos obesos, proteínas estas relacionadas com o gasto energético e com a termogênese mitocondrial. Em outro estudo, a suplementação com erva-mate, por um período de 60 dias, promoveu o aumento da fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e da acetil-CoA carboxilase (ACC) no tecido adiposo visceral de ratos (PANG et al., 2008). A ativação da AMPK favorece a fosforilação e inativação da ACC, reduzindo a concentração intracelular de malonil-CoA, que é substrato para a síntese de ácidos graxos e inibidor da carnitina palmitoil transferase (CPT1), enzima limitante da oxidação de ácidos graxos (UNGER, 2004). Dessa forma, a suplementação de erva-mate ao promover a ativação da AMPK pode ter contribuído para o aumento da oxidação lipídica, e consequentemente, para a redução do ganho de peso (HWANG et al., 2009).

A literatura mostra que o consumo de erva-mate possui efeito hipocolesterolêmico em modelos animais (STEIN et al., 2005; MARTINS et al., 2010; GAO et al., 2012) e em humanos (DE MORAIS et al., 2009; KLEIN et al., 2011). Neste estudo, a ingestão do extrato aquoso de erva-mate foi capaz de reduzir a concentração sérica de colesterol total e do colesterol não-HDL de ratos alimentados com ração HL. O efeito hipolipidêmico da erva-mate pode estar relacionado com a capacidade de seus compostos interferirem na absorção intestinal de colesterol. Em estudo *in vitro*, demonstrou-se que as saponinas presentes na erva-mate formam micelas

complexas com ácido cólico, inibindo sua absorção. Os autores sugerem que as saponinas podem interagir com o colesterol dietético e com os ácidos biliares, formando complexos insolúveis e incapazes de serem absorvidos, os quais são eliminados pelas fezes (FERREIRA et al., 1997). A absorção intestinal de lipídios também pode ser prejudicada pela inibição de enzimas digestivas. A lipase pancreática é responsável pela hidrólise intestinal de 50-70% dos lipídios dietéticos totais, favorecendo a digestão e a absorção de ácidos graxos e glicerol. Nesse sentido, o chá mate teve a capacidade de inibir a atividade da enzima lipase pancreática, *in vitro*, de maneira dose dependente (MARTINS et al., 2010), indicando um possível mecanismo de redução dos parâmetros lipídicos séricos.

A propriedade hipocolesterolêmica da erva-mate, por outro lado, também depende da capacidade de seus compostos inibirem a síntese endógena de colesterol e regularem o metabolismo das lipoproteínas. Tanto o ácido clorogênico como o ácido cafeico mostraram-se eficientes no controle da colesterolemia, por inibirem a biossíntese de ácidos graxos e colesterol, via supressão das atividades das enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG)-CoA redutase, acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT) e ácido graxo sintase (FAS) no fígado de camundongos obesos (CHO et al., 2010). Outro relevante mecanismo refere-se à regulação do metabolismo lipídico pela depuração das partículas de lipoproteínas. O LDLR e o receptor *scavenger* de classe B1 (SR-B1) são responsáveis pela homeostase do colesterol, por removerem o excesso de colesterol proveniente das partículas de LDL e HDL, respectivamente (GOLDSTEIN et al., 1987; OHASHI et al., 2005). Foi demonstrado que o consumo de chá mate na concentração de 2 e 4 g/kg de peso corporal/dia resultou no aumento da expressão desses receptores no fígado de ratos hiperlipidêmicos, mostrando que a erva-mate possui efeito regulatório no metabolismo lipídico (GAO et al., 2013).

Corroborando com as pesquisas experimentais em modelos animais, evidências provenientes de ensaios clínicos controlados e randomizados também têm apontado benefício da erva-mate no controle da dislipidemia

(DE MORAIS et al., 2009; KLEIN et al., 2011). O consumo de 1 litro de chá mate (3 vezes ao dia), por um período de 20 ou 40 dias, mostrou-se eficaz na redução da colesterolemia em indivíduos dislipidêmicos e em pacientes fazendo uso de estatina (DE MORAIS et al., 2009). Da mesma forma, a ingestão fracionada de chá mate (1 litro/dia), por 60 dias, revelou melhora dos parâmetros lipídicos e glicêmicos em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos tipo 2, principalmente, quando combinado com intervenção dietética (KLEIN et al., 2011).

Ao contrário do que se observa na literatura (HUSSEIN et al., 2011b), a ingestão do extrato aquoso de erva-mate não alterou a glicemia e a insulinemia de jejum, tampouco os valores de HOMA-IR e QUICKI. Entretanto, a suplementação com o extrato aquoso de erva-mate resultou em melhora da resposta glicêmica durante o ipITT, sugerindo aumento da captação de glicose frente a uma administração aguda de insulina. Segundo alguns autores, a melhora da sensibilidade à insulina está relacionada com a ativação da via de sinalização da insulina em tecidos metabólicos (ARÇARI et al., 2011). No trabalho de Arçari et al. (2011), a suplementação com erva-mate aumentou a razão p-IRS-1(em tirosina)/IRS-1 e a razão p-AKT/AKT no fígado e no músculo esquelético de camundongos obesos induzidos por ração HL. Os autores sugerem que ativação da via de sinalização da insulina tenha sido modulada pela redução da concentração das citocinas pró-inflamatórias nesses tecidos, como o TNF- α e a IL-6 (ARÇARI et al., 2011).

No presente estudo, a ingestão do extrato aquoso de erva-mate, na dosagem de 1 g/kg de peso corporal/dia, não afetou a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, MCP-1 e proteína C reativa), tampouco modulou a via de sinalização do NF- κ B e a ativação da AKT no tecido adiposo periepídimal. Por outro lado, estudos recentes sugerem efeito anti-inflamatório da erva-mate em modelos animais (ARÇARI et al., 2009 e 2011; PIMENTEL et al., 2012). Em camundongos *Swiss* alimentados com ração HL, o extrato aquoso de erva-mate teve a capacidade de modular negativamente a expressão de genes envolvidos no recrutamento de células do sistema imune (MCP-1 e CCR2) e na sinalização

inflamatória (TNF- α e IL-6) no tecido adiposo periepídimo, além de reduzir a expressão do F4/80, um marcador específico que caracteriza a ativação de macrófagos no tecido adiposo (ARÇARI et al., 2009). A administração do extrato aquoso de erva-mate ainda produziu efeito anti-inflamatório no hipotálamo de ratos *Wistar*, suprimindo a fosforilação da IKK e do fator de transcrição NF- κ B (p65) (PIMENTEL et al., 2012).

Dentre os compostos bioativos presentes na erva-mate, os compostos fenólicos e as saponinas parecem ser os principais envolvidos na resposta inflamatória (PUANGPRAPHANT et al., 2009 e 2011). Nesse sentido, os ácidos dicafeoilquínicos extraídos das folhas de *Ilex paraguariensis* apresentaram capacidade inibitória na translocação do fator de transcrição nuclear NF- κ B em cultura de macrófagos (PUANGPRAPHANT et al., 2011), enquanto que a quercetina atenuou a resposta inflamatória e, conseqüentemente, a resistência insulínica em culturas de células adiposas e hepáticas humanas mediadas por TNF- α (CHUANG et al., 2010; GRANADO-SERRANO et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que a combinação da quercetina com as saponinas exerceu maior potencial anti-inflamatório *in vitro*, por meio da supressão da via de sinalização do NF- κ B e da produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como a IL-1 β , IL-6, PGE₂ e NO, indicando que diferentes compostos bioativos podem produzir efeito sinérgico sobre a modulação da resposta inflamatória (PUANGPRAPHANT et al., 2009).

Apesar dos compostos bioativos indicarem efeito anti-inflamatório em modelos *in vitro*, seu papel em sistemas fisiológicos é bem mais complexo e depende de vários fatores, como a biodisponibilidade e a distribuição nos tecidos-alvo. Os compostos fenólicos, por exemplo, são amplamente metabolizados no intestino delgado e no fígado, formando metabólitos que diferem dos compostos originais (KARAKAYA, 2004). Além disso, os compostos atingem a circulação sanguínea numa concentração micromolar e se distribuem de maneira distinta nos diversos tecidos e órgãos (LANDETE, 2012). Estudo realizado por Serra et al. (2011) demonstrou que,

após 4 horas da administração de extrato de uva (1g /kg de peso corporal), a concentração de antocianinas e seus metabólitos foi detectada no fígado, porém, não atingiu quantidades mensuráveis no cérebro, na aorta e no tecido adiposo de ratos (SERRA et al., 2011). Similarmente, outro estudo mostrou que após 30 dias de ingestão do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado, o ácido cafeico foi detectado apenas no fígado, não sendo identificado no cérebro e no tecido epitelial de ratos (RIVELLI et al., 2011). Isso explica, em parte, os resultados obtidos neste modelo experimental, visto que a suplementação crônica de erva-mate teve efeito regulatório na via de transdução do NF- κ B e na ativação da AKT no fígado (JACOB et al., 2012), porém, não modulou tais vias no tecido adiposo periepididimal.

Cabe ressaltar ainda que o efeito da erva-mate no tecido adiposo branco não pôde ser satisfatoriamente avaliado, uma vez que a ração HL ajustada não provocou aumento da adiposidade e, conseqüentemente, não induziu inflamação e resistência insulínica nesse tecido. Por outro lado, o consumo crônico do extrato aquoso de erva-mate pôde atenuar determinadas disfunções metabólicas provocadas pela ingestão da ração HL.

8 CONCLUSÃO

A ingestão da ração HL promoveu alterações metabólicas, como aumento dos depósitos de gordura intra-abdominal, intolerância à glicose, dislipidemia e aumento da proteína C reativa, todavia, não induziu inflamação crônica no tecido adiposo periepídimal. Por outro lado, a ingestão do extrato aquoso de erva-mate foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal e melhorar o perfil lipídico dos animais que consumiram a ração HL.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahrén J, Ahrén B, Wierup N. Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet: a dynamic study over 12 months. *Islets*. 2010;2(6):353-6.
2. Albanese AA, Orto LA. Protein and amino acids. In: Albanese, A.A., ed. *Newer methods of nutritional biochemistry: with applications and interpretations*. New York: Academic Press; 1963.
3. Arçari DP, Bartchewsky W Jr, dos Santos TW, Oliveira KA, de Oliveira CC, Gotardo ÉM, et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;335(2):110-5.
4. Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, et al. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*. 2009;17(12):2127-33.
5. Astrup A, Dyerberg J, Selleck M, Stender S. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes Rev*. 2008;9 Suppl 1:48-52.
6. Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(6):969-73.
7. Bagnol D, Al-Shamma HA, Behan D, Whelan K, Grottick AJ. Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2012;9:1-13.
8. Bastos DHM, de Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PO, Ribeiro ML. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 2007a;1(1):37-46.
9. Bastos DHM, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*. 2007b;12:423-32.
10. Bastos DH, Rogero MM, Arêas JA. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(5):646-56.

11. Bays HE. Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(25):2461-73.
12. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68(2):374-8.
13. Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition*. 2011;27(4):399-404.
14. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E581-91.
15. Bourlier V, Bouloumie A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab*. 2009;35(4):251-60.
16. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(3):378-84.
17. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):485-501.
18. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(4):798-808.
19. Casas-Agustench P, López-Uriarte P, Bulló M, Ros E, Gómez-Flores A, Salas-Salvadó J. Acute effects of three high-fat meals with different fat saturations on energy expenditure, substrate oxidation and satiety. *Clin Nutr*. 2009;28(1):39-45.
20. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46(11):2347-55.
21. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(3):937-43.
22. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987;162:156-9.

23. Chuang CC, Martinez K, Xie G, Kennedy A, Bumrungpert A, Overman A, et al. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(6):1511-21.
24. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NF κ B activity by increasing IkappaB α levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):889-97.
25. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, et al. The metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2008;29(7):777-822.
26. de Moraes EC, Stefanuto A, Klein GA, Boaventura BC, de Andrade F, Wazlawik E, et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. *J Agric Food Chem*. 2009;57(18):8316-24.
27. de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, Oosterink E, Keshtkar S, Duval C, et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(5):G589-99.
28. Ellacott KL, Murphy JG, Marks DL, Cone RD. Obesity-induced inflammation in white adipose tissue is attenuated by loss of melanocortin-3 receptor signaling. *Endocrinology*. 2007;148(12):6186-94.
29. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária [homepage na internet]. [atualizado em ago 2010; acesso em 30 mar 2013]. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvamate_2ed/Processamento.htm
30. Enos RT, Davis JM, Velázquez KT, McClellan JL, Day SD, Carnevale KA, et al. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. *J Lipid Res*. 2013;54(1):152-63.
31. Estrany ME, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M. Isocaloric intake of a high-fat diet modifies adiposity and lipid handling in a sex dependent manner in rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10:52.
32. Fantino M. Role of lipids in the control of food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(2):138-44.

33. Fernandez ML, West KL. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr.* 2005;135(9):2075-8.
34. Ferreira F, Vázquez A, Güntner C, Moyna P. Inhibition of passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St. Hil. Saponins. *Phytoth Res.* 1997;11:79-81.
35. Ferreira SRG. Alimentação, nutrição e saúde: avanços e conflitos da modernidade. *Cienc. Cult.* 2010 ; 62(4): 31-33.
36. Furnes MW, Zhao CM, Chen D. Development of obesity is associated with increased calories per meal rather than per day. A study of high-fat diet-induced obesity in young rats. *Obes Surg.* 2009;19(10):1430-8.
37. Gao H, Liu Z, Qu X, Zhao Y. Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. *Fitoterapia.* 2013;84:264-72.
38. Gao H, Liu Z, Wan W, Qu X, Chen M. Aqueous Extract of Yerba Mate Tea Lowers Atherosclerotic Risk Factors in a Rat Hyperlipidemia Model. *Phyther Res.* 2012.
39. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol.* 2007;557(2-3):221-9.
40. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation.* 1987;76(3):504-7.
41. Gosmann G, Barlette AG, Dhamer T, Arçari DP, Santos JC, de Camargo ER, et al. Phenolic compounds from maté (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Plant Foods Hum Nutr.* 2012;67(2):156-61.
42. Granado-Serrano AB, Martín MÁ, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin attenuates TNF-induced inflammation in hepatic cells by inhibiting the NF-κB pathway. *Nutr Cancer.* 2012;64(4):588-98.
43. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):461S-465S.
44. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-45.

45. Greiner T, Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(4):117-23.
46. Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(4):332-41.
47. Habib SH, Saha S. Burden of non-communicable disease: global overview. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2010;4(1):41-47.
48. Hardy OT, Czech MP, Corvera S. What causes the insulin resistance underlying obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(2):81-7.
49. Hariri N, Gougeon R, Thibault L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res.* 2010;30(9):632-43.
50. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev.* 2010;23(2):270-99.
51. Harlow MB, Lane D. In: **Antibody**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
52. Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007;72(9):R138-51.
53. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10(4):413-7.
54. Hirai S, Takahashi N, Goto T, Lin S, Uemura T, Yu R, et al. Functional food targeting the regulation of obesity-induced inflammatory responses and pathologies. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:367838.
55. Horiuchi M, Mogi M. C-reactive protein beyond biomarker of inflammation in metabolic syndrome. *Hypertension.* 2011;57(4):672-3.
56. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444(7121):860-7.
57. Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27 Suppl 3:S53-5.
58. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87-91.

59. Hsu CL, Wu CH, Huang SL, Yen GC. Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *J Agric Food Chem.* 2009;57(2):425-31.
60. Hussein GM, Matsuda H, Nakamura S, Akiyama T, Tamura K, Yoshikawa M. Protective and ameliorative effects of maté (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. *Phytomedicine.* 2011a;19(1):88-97.
61. Hussein GM, Matsuda H, Nakamura S, Hamao M, Akiyama T, Tamura K, et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: involvement of glucagon-like peptide-1. *Biol Pharm Bull.* 2011b;34(12):1849-55.
62. Hwang JT, Kwon DY, Yoon SH. AMP-activated protein kinase: a potential target for the diseases prevention by natural occurring polyphenols. *N Biotechnol.* 2009;26(1-2):17-22.
63. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2011.
64. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2010.
65. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2010.
66. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 2010;11(1):11-8.
67. Jacob PS. Efeito da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a resposta inflamatória e via de sinalização da insulina no fígado de ratos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2012.
68. Jacob PS, de Meneses Fujii TM, Yamada M, Borges MC, Pantaleão LC, Borelli P, Fock R, Rogero MM. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. *Cell Biochem Funct.* 2013;31(3):244-53.
69. Jaiswal R, Sovdat T, Vivan F, Kuhnert N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate

- esters in mate (*Ilex paraguariensis*). *J Agric Food Chem*. 2010;58(9):5471-84.
70. Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee MJ, Smith SB, et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr*. 2009;139(2):230-7.
 71. Kaneko H, Anzai T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Mano Y, et al. Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodelling. *Cardiovasc Res*. 2011;91(3):546-55.
 72. Karakaya S. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004;44(6):453-64.
 73. Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J*. 2009;276(20):5747-54.
 74. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2402-10.
 75. Kawamoto EM, Lepsch LB, Boaventura MF, Munhoz CD, Lima LS, Yshii LM, et al. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J Neurosci Res*. 2008;86(4):845-60.
 76. Kennedy ET. Evidence for nutritional benefits in prolonging wellness. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(2):410S-414S.
 77. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
 78. Kishino E, Ito T, Fujita K, Kiuchi Y. A mixture of the *Salacia reticulata* (Kotala himbutu) aqueous extract and cyclodextrin reduces the accumulation of visceral fat mass in mice and rats with high-fat diet-induced obesity. *J Nutr*. 2006;136(2):433-9.
 79. Klein GA, Stefanuto A, Boaventura BC, de Moraes EC, Cavalcante Lda S, de Andrade F, et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. *J Am Coll Nutr*. 2011;30(5):320-32.
 80. Kok F, Bouwman I, Desiere F. Personalized nutrition: principles and applications. New York: CRC Press; 2007.

81. Kobayashi-Hattori K, Mogi A, Matsumoto Y, Takita T. Effect of caffeine on the body fat and lipid metabolism of rats fed on a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005;69(11):2219-23.
82. Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, et al. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab*. 2008;8(1):49-64.
83. Lam TK, Schwartz GJ, Rossetti L. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci*. 2005;8(5):579-84.
84. Landete JM. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52(10):936-48.
85. Liu N, Liu J, Ji Y, Lu P, Wang C, Guo F. C-reactive protein induces TNF- α secretion by p38 MAPK-TLR4 signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Inflammation*. 2011;34(4):283-90.
86. Liu W, Saint DA. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;294:347-53.
87. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2111-7
88. Madsen AN, Hansen G, Paulsen SJ, Lykkegaard K, Tang-Christensen M, Hansen HS, et al. Long-term characterization of the diet-induced obese and diet-resistant rat model: a polygenetic rat model mimicking the human obesity syndrome. *J Endocrinol*. 2010;206(3):287-96.
89. Manco M, Calvani M, Mingrone G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obes Metab*. 2004;6(6):402-13.
90. Martins F, Noso TM, Porto VB, Curiel A, Gambero A, Bastos DH, et al. Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*. 2010;18(1):42-7.
91. Matsumoto RL, Bastos DH, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky W, Ribeiro ML, et al. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *J Agric Food Chem*. 2009;57(5):1775-80.
92. Matthan NR, Dillard A, Lecker JL, Ip B, Lichtenstein AH. Effects of dietary palmitoleic acid on plasma lipoprotein profile and aortic

- cholesterol accumulation are similar to those of other unsaturated fatty acids in the F1B golden Syrian hamster. *J Nutr.* 2009;139(2):215-21.
93. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.
 94. McGinty A, Young IS. Adipose tissue and inflammation. *Int J Clin Pract.* 2011;65(9):913-7.
 95. Melanson EL, Astrup A, Donahoo WT. The relationship between dietary fat and fatty acid intake and body weight, diabetes, and the metabolic syndrome. *Ann Nutr Metab.* 2009;55(1-3):229-43.
 96. Melhorn SJ, Krause EG, Scott KA, Mooney MR, Johnson JD, Woods SC, et al. Acute exposure to a high-fat diet alters meal patterns and body composition. *Physiol Behav.* 2010;99(1):33-9.
 97. Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J Jr, Carvalho Pde O, Cerutti SM, Bastos DH, et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis.* 2008;23(4):261-5
 98. Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010.
 99. Monteiro CA, Levy RB, Claro RM, de Castro IR, Cannon G. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. *Public Health Nutr.* 2011;14(1):5-13.
 100. Moon J, Lee SM, Do HJ, Cho Y, Chung JH, Shin MJ. Quercetin up-regulates LDL receptor expression in HepG2 cells. *Phytother Res.* 2012;26(11):1688-94.
 101. Mosimann AL, Wilhelm-Filho D, da Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors.* 2006;26(1):59-70.
 102. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, Cinti S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res.* 2008;49(7):1562-8.
 103. Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(7):1145-50.

104. Neville MM, Geppert J, Min Y, Grimble G, Crawford MA, Ghebremeskel K. Dietary fat intake, body composition and blood lipids of university men and women. *Nutr Health*. 2012;21(3):173-85.
105. Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*. 2002;51(2):271-5.
106. Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005;98(12):845-56.
107. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
108. Overman A, Chuang CC, McIntosh M. Quercetin attenuates inflammation in human macrophages and adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Int J Obes*. 2011;35(9):1165-72.
109. Panchal SK, Poudyal H, Arumugam TV, Brown L. Rutin attenuates metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. *J Nutr*. 2011;141(6):1062-9.
110. Panchal SK, Wong WY, Kauter K, Ward LC, Brown L. Caffeine attenuates metabolic syndrome in diet-induced obese rats. *Nutrition*. 2012;28(10):1055-62.
111. Pang J, Choi Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch Biochem Biophys*. 2008;476(2):178-85.
112. Pimentel GD, Lira FS, Rosa JC, Caris AV, Pinheiro F, Ribeiro EB, et al. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. *J Nutr Biochem*. 2012
113. BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília, 2012.
114. Puangraphant S, Berhow MA, Vermillion K, Potts G, de Mejia EG. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(10):1509-22.
115. Puangraphant S, de Mejia EG. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and

- COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFkappaB pathways. *J Agric Food Chem.* 2009;57(19):8873-83.
116. Raz O, Steinvil A, Berliner S, Rosenzweig T, Justo D, Shapira I. The effect of two iso-caloric meals containing equal amounts of fats with a different fat composition on the inflammatory and metabolic markers in apparently healthy volunteers. *J Inflamm (Lond).* 2013;10(1):3.
 117. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.
 118. Reiterer G, Toborek M, Hennig B. Peroxisome proliferator activated receptors
 119. alpha and gamma require zinc for their anti-inflammatory properties in porcine vascular endothelial cells. *J Nutr.* 2004;134(7):1711-5.
 120. Resende PE, Verza SG, Kaiser S, Gomes LF, Kucharski LC, Ortega GG. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2012;144(3):735-40.
 121. Ribani M, Bottoli C, Collins C, Jardim I, Melo L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova.* 2004;27(5):771-80.
 122. Rivelli DP, Almeida RL, Ropke CD, Barros SB. Hydrolysis influence on phytochemical composition, antioxidant activity, plasma concentration, and tissue distribution of hydroethanolic *Ilex paraguariensis* extract components. *J Agric Food Chem.* 2011;59(16):8901-7.
 123. Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(9):2081-7.
 124. Rosini TC, Silva AS, Moraes Cd. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras.* 2012;58(3):383-7.
 125. Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, et al. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology.* 2012;55(4):1103-11.
 126. Safwat GM, Pisanò S, D'Amore E, Borioni G, Napolitano M, Kamal AA, et al. Induction of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance by feeding a high-fat diet in rats: does coenzyme Q monomethyl ether have a modulatory effect? *Nutrition.* 2009;25(11-12):1157-68.

127. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Molecular cloning. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor; 1989.
128. Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(1):159-65.
129. Schenk S, SAberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118:2992-3002.
130. Schinella GR, Troiani G, Dávila V, de Buschiazzi PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269(2):357-60.
131. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*. 2005;22(6):674-82.
132. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011 Jun 4;377(9781):1949-61.
133. Shirai N, Suzuki H, Wada S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Anal Biochem*. 2005;343(1):48-53.
134. Serra A, Macià A, Romero MP, Piñol C, Motilva MJ. Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(19):1519-28.
135. Silva RD, Bueno AL, Gallon CW, Gomes LF, Kaiser S, Pavei C, et al. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. *Fitoterapia*. 2011;82(6):818-26.
136. Shen H, Oesterling E, Stromberg A, Toborek M, MacDonald R, Hennig B. Zinc deficiency induces vascular pro-inflammatory parameters associated with NF-kappaB and PPAR signaling. *J Am Coll Nutr*. 2008;27(5):577-87.
137. Shi H, Dong L, Jiang J, Zhao J, Zhao G, Dang X, Lu X, Jia M. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Toxicology*. 2013;303:107-14.
138. So M, Gaidhu MP, Maghdoori B, Ceddia RB. Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10:99.

139. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2010;24(8):2596-611.
140. Stein FLP, Schmidt B, Furlong EB, Soares LAS, Soares MCF, Vaz MRC, et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol Res Nurs.* 2005; 7:146-156.
141. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol.* 2010;88(1):33-9.
142. Swinburn BA, Caterson I, Seidell JC, James WP. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutr.* 2004;7(1A):123-46.
143. Tallman DL, Taylor CG. Effects of dietary fat and zinc on adiposity, serum leptin and adipose fatty acid composition in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem.* 2003;14(1):17-23.
144. Terzic J, Marinovic-Terzic I, Ikeda F, Dikic I. Ubiquitin signals in the NF-kappaB pathway. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):942-5.
145. Tordjman J, Guerre-Millo M, Clément K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab.* 2008;34(6 Pt 2):658-63.
146. Unger RH. The hyperleptinemia of obesity-regulator of caloric surpluses. *Cell.* 2004;117(2):145-6.
147. U.S. Department of Health and Human Services. Q2B validation of analytical procedures: Methodology in: FDA editor. International Conference on Harmonisation (ICH); Rockville: U.S. Department of Health and Human Services; 1996:1-10.
148. Vallim T, Salter AM. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010;82(4-6):211-8.
149. Vichaiwong K, Henriksen EJ, Toskulkao C, Prasannarong M, Bupha-Intr T, Saengsirisuwan V. Attenuation of oxidant-induced muscle insulin resistance and p38 MAPK by exercise training. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(5):593-9.
150. Xi L, Xiao C, Bandsma RH, Naples M, Adeli K, Lewis GF. C-reactive protein impairs hepatic insulin sensitivity and insulin signaling in rats: role of mitogen-activated protein kinases. *Hepatology.* 2011;53(1):127-35.

151. Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva ME. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):145-50.
152. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
153. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1785-8.
154. WHO – World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization, 2010.
155. WHO – World Health Organization. Noncommunicable diseases Country Profiles 2011. Geneva: World Health Organization, 2011.
156. Wood IS, de Heredia FP, Wang B, Trayhurn P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2009;68(4):370-7.
157. Woods SC, D'Alessio DA, Tso P, Rushing PA, Clegg DJ, Benoit SC, et al. Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. *Physiol Behav*. 2004;83(4):573-8.
158. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance - a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(4):379-86.

ANEXO 1 – Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 12 de agosto de 2009.

Ilmo (a)
Maria Carolina Borges

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número CEP-IMT 048/2009 “Efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de proteínas envolvidas na resposta inflamatória em macrófagos peritoneais, no fígado, no músculo, no tecido adiposo e na medula óssea de ratos submetidos a dieta hiperlipídica”, sob a responsabilidade do Dr. Marcelo Macedo Rogero.

Atenciosamente,

Dr. Paulo Cotrim
Coordenador da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT

ANEXO 2

Manuscrito submetido no periódico *Nutrition Research* em dezembro de 2012 intitulado “High-fat diet, inflammation and insulin signaling pathway in the periepididynal adipose tissue of rats: is there an independent role for dietary lipids?”

HIGH-FAT DIET, INFLAMMATION AND INSULIN SIGNALING PATHWAY IN THE PERIEPIDIDYMAL ADIPOSE TISSUE OF RATS: IS THERE AN INDEPENDENT ROLE FOR DIETARY LIPIDS?

Monica Yamada^a, Marina M. Norde^a, Maria C. Borges^a, Tatiane M. M. Fujii^a, Patrícia S. Jacob^a, Miriam H. Fonseca-Alaniz^b, Maria I. C. Alonso-Vale^c, Francisco L. Torres-Leal^c, Julio Tirapegui^d, Ricardo A. Fock^e, Primavera Borelli^c, Rui Curi^c, Marcelo M. Rogero^{a,*}.

^aDepartment of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^bHeart Institute of the São Paulo University Medical School, São Paulo, Brazil

^cDepartment of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^dDepartment of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, São Paulo, Brazil

^eDepartment of Clinical and Toxicological Analyzes, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

*Corresponding author.

Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo. Avenida Doutor Arnaldo, 715, São Paulo, SP 01246-904, Brazil. Tel.: +55 11 3061-7850. Fax: +55 11 3061-7705.

E-mail address: mmrogero@usp.br (M. M. Rogero).

Abbreviations

AKT	Protein kinase B
AUC	Area under the curve
CON	Control
CRP	C-reactive protein
FAME	Fatty acid methyl ester
FID	Flame ionization detector
HDL-c	High-density lipoprotein cholesterol
HFD	High-fat diet
HOMA-IR	Homeostasis model assessment of insulin resistance
I κ B	NF- κ B inhibitor
IKK	I κ B kinase
IL-6	Interleukin 6
ipITT	Intraperitoneal insulin tolerance test
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
<i>Kitt</i>	Constant for glucose disappearance
LCFA-CoA	Long-chain fatty acyl coenzyme A
LDL-c	Low-density lipoprotein cholesterol
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MUFA	Monounsaturated fatty acid
NEFA	Non-esterified fatty acids
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
oGTT	Oral glucose tolerance test
PCR	Polymerase chain reaction
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
SFA	Saturated fatty acid
TAG	Triglycerides
TAK-1	Transforming growth factor β -activated kinase 1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VLDL-c	Very low-density lipoprotein cholesterol
WAT	White adipose tissue

Abstract

Chronic intake of a high-fat diet (HFD) induces obesity, associated with white adipose tissue (WAT) low-grade inflammation, which is related to insulin resistance development. However, we hypothesized that not only dietary lipids but also energy and some micronutrients can influence the proinflammatory response. Thus, the aim of this study is to investigate whether the isocaloric intake of a HFD with nutrient adjustment could modulate the inflammatory response and insulin sensitivity of rat WAT. Male Wistar rats (n=12/group) were given free access to a control diet or a HFD for 12 weeks. Oral glucose and insulin tolerance tests were performed during the last week of the protocol. Plasma-fatty acid profile, body adiposity and carcass chemical composition were analyzed. Blood markers of insulin resistance, adiposity and inflammation were also measured. Periepididymal adipose tissue was employed to evaluate proteins involved in inflammatory and insulin signaling pathways and adipokine gene expression. HFD did not induce hyperphagia, but promoted an increase in body adiposity and total lipid percentage. The rats developed glucose intolerance, dyslipidemia and presented higher C-reactive protein levels in response to HFD. Adjusted HFD did not affect adipokine gene expression or proteins involved in inflammatory signaling in periepididymal adipose tissue, but decreased AKT phosphorylation after insulin stimulation. In conclusion, the fat content of this HFD impaired the metabolic profile, but did not induce inflammation in the rat periepididymal adipose tissue, which could be, in part, prevented by the nutrient adjustment of the HFD.

Keywords: Obesity; Insulin resistance; Adipokines; Fatty acids; White adipose tissue; Rats

1. Introduction

Obesity and its comorbidities, such as insulin resistance, hepatic steatosis and dyslipidemia, have been implicated in the development of a range of chronic diseases, which represent a major challenge for public health policies [1]. The role of the white adipose tissue (WAT) in the pathogenesis of obesity is well-recognized. The accumulation of visceral fat depots has a great impact on glucose and lipid metabolism, resulting in an elevated risk for type 2 diabetes and cardiovascular disease [2]. Obesity is also associated with a chronic state of low-grade inflammation in metabolic tissues, such as WAT and liver, which is characterized by an increased circulation of inflammatory mediators, including acute phase proteins, adhesion molecules and proinflammatory cytokines [3].

On the molecular level, the transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) plays a critical role in the mediation of the proinflammatory response in the WAT [4]. Saturated fatty acids (SFA), commonly found in Western diets, promote the activation of the NF- κ B signaling pathway. This pathway comprises the enzymatic complex I κ B kinase (IKK, composed of two catalytic subunits: IKK α and IKK β) and a regulatory subunit (IKK γ) and it induces the phosphorylation of NF- κ B inhibitor (I κ B). The phosphorylation of I κ B — the protein that inactivates the p50/p65 (NF- κ B) heterodimer — results in its polyubiquitination, which, in turn, leads to its degradation, mediated by the 26S proteasome. I κ B degradation results in NF- κ B translocation to the nucleus, promoting the transcription of genes encoding proinflammatory proteins, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [5]. Furthermore, some protein kinases such as c-Jun N-terminal kinase (JNK) and IKK- β are key signaling molecules linking obesity to insulin resistance. These kinases are responsible for the serine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS)-1, which compromise downstream insulin signaling and decrease cellular glucose uptake [6].

In an attempt to explain the mechanism underlying obesity, fat-enriched diets have been largely used to induce obesity in rodents [7,8]. However, as most of these studies were set in the context of excessive energy consumption [9,10], it is difficult to analyze the sole contribution of elevated lipid content in obesity-related dysfunctions. Additionally, micronutrient intake usually differs among groups [11] and the effects of dietary fat could be confounded with other components of the diet.

Previous data from our laboratory demonstrated that rats fed on a high-fat diet (HFD) had a 30% reduction in food intake (g), compared to the control (CON) group (unpublished data). However, given the higher energy density of the HFD, when compared to the CON diet, the daily energy intake did not differ between groups. We hypothesize that the insufficient intake of macro- and micronutrients by the HFD group, caused by lower diet consumption, could seriously affect the outcome of the study. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of a nutrient-adjusted diet on critical proteins involved in the inflammatory and insulin signaling pathways and on adipokine gene expression in the rat periepididymal adipose tissue.

For this purpose, the ingredients of the diets used in this study — except for cornstarch and lard — were balanced according to each diet's energy density, ensuring comparable intake of proteins, dietary fiber, vitamins and minerals between groups. Moreover, in the present study, rats from the CON and HFD groups spontaneously elicited isocaloric intake.

2. Materials and methods

2.1. Animals and Treatment

Male Wistar rats, aged two-months old, were obtained from the Animal Laboratory of the Faculty of Medicine at the University of São Paulo. Rats were housed in plastic cages (2-3 rats per cage) in an atmosphere of $55 \pm 10\%$, relative humidity at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with a 12-h-light/-dark cycle (lights on at 07:00 h). Rats were given free access to food and water. Body weight and food intake were recorded three times a week. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, according to the guidelines of the Brazilian College on Animal Experimentation (protocol number 048/2009).

After acclimation for 10 days to a semipurified diet, based on the American Institute of Nutrition's recommendations for the adult rodent (AIN-93M) [12], rats were randomly assigned into 2 groups: HFD group and CON group. For twelve weeks, the CON group ($n = 12$) received the AIN-93M diet (75.8% carbohydrates, 9.3% fat, and 14.9% protein), while the HFD group ($n = 12$) received the AIN-93M-based diet enriched with lard (24.2% carbohydrates, 60.9% fat, and 14.9% protein). Diet ingredients in HFD (except for cornstarch and lard) were adjusted to be present in the same amount (kJ) as in the CON diet. The adjustment of HFD ingredients, considering their energy content, rather than weight, has already been performed by other groups [13,14]. Furthermore, due to the great susceptibility of lard to oxidation, a higher amount of tertbutylhydroquinone was added to the HFD, in comparison to the CON diet [15] (**Table 1**).

2.2. Biological Sample Collection

The animals were anesthetized with xylazine (50 mg/kg) (Anasedan, Jacareí, Brazil) and ketamine (100 mg/kg) (Dopalen, Paulínia, Brazil), administered subcutaneously after 10-12h fasting, in the morning. The animals were euthanized by decapitation and this procedure was performed quickly in order to minimize any suffering or distress of the animals. Blood was collected and centrifuged with or without EDTA for plasma and serum samples collection, respectively. Periepididymal and retroperitoneal fat depots were completely dissected and weighed. The weight of the fat depots was expressed as the ratio of fat tissue (mg) per 100 g of body weight. For mRNA and protein expression, samples from the periepididymal WAT were collected prior to insulin stimulus and after 90 seconds of insulin injection into portal vein. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C until analysis.

2.3. Blood Biochemical Analyses

Fasting blood glucose from the tail vein was determined using an Accu-Chek Performa[®] glucometer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Total serum cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides (TAG) and C-reactive protein (CRP) levels were quantified with commercial kits using an automatic multichannel analyzer (Abbott Diagnostics Architect C8000, Illinois, USA). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-c) levels were estimated using the equations proposed by Friedewald et al. (1972) [16]. Non-HDL cholesterol was calculated as total cholesterol minus HDL-c. Plasma insulin, adiponectin, leptin, TNF- α , IL-6 and MCP-1 levels were quantified using the Lincoplex kit (Linco Research Inc., St.

Charles, MO). Plasma nonesterified fatty acid (NEFA) concentrations were determined using a commercial kit (Biovision, Catalog #100-K612, California, USA).

2.4. Glucose tolerance and insulin resistance

The oral glucose tolerance test (oGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) were performed after 7-8 hours of fasting. Blood was collected from the tail vein using an Accu-Chek Performa[®] glucometer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). For the oGTT, blood samples were collected after fasting and at 30, 60, 90 and 120 min after glucose administration (2 g/kg of body weight) by gavage. For ipITT, blood samples were collected after fasting and at 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 40 min after intraperitoneal insulin injection (0.75 U/kg of body weight). The area under the curve (AUC) and the rate constant for the disappearance of glucose (*K_{itt}*) were calculated for oGTT and ipITT, respectively.

Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) was also employed as an indicator of peripheral insulin resistance, using blood glucose (mmol/L) multiplied by fasting insulin (μ U/mL) as parameters, and divided by 22.5 [17].

2.5. Carcass chemical composition analyses

Water, lipid, protein and ash contents present in the carcass of rats were determined as described elsewhere [18].

2.6. Plasma and diet fatty acid compositions

The total lipids from plasma and diet samples were extracted according to Shirai et al. (2005) [19]. Fatty acid compositions were determined by gas chromatography. Fatty acid methyl ester (FAME) analysis was carried out using an Agilent 7890A series gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a split injection port, flame ionization detector (FID) and fused silica capillary column DB-23 (J&W 122-2361) of 60 m x 0.25 mm id; film thickness of 0.15 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The samples (1.0 μ l) were injected in the split mode (split ratio 1:50). Helium was used as a carrier gas and the fatty acids were separated using a 1°C/min gradient from 140 to 225 °C. The injector temperature was set at 250 °C and the detector temperature was set at 260 °C. Peak identification was performed by comparing the relative retention times with those of a commercial standard mixture of FAME Supelco 37 Component mix; 47885-U and C4-C24 Even Carbon 49453-U (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). The results were expressed as percentage of the total fatty acids present. The fatty acid composition of the experimental diets is given in **Table 2**.

2.7. Analysis of protein phosphorylation and expression by Western blot

To obtain the protein lysates, 400 mg of periepididymal fat were homogenized with 1mL of ice-cold extraction buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% Triton-X 100, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 20 mM NaF, 30 mM sodium pyrophosphate, 0.2% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, PMSF, protease and phosphatase inhibitors and ultrapure water). Total protein

concentration of the supernatant was determined using the bicinchoninic acid assay and BSA as a standard (Thermo Scientific, Rockford, IL). Laemmli buffer (5 X concentrate, 300 mM Tris-HCl, 10% β -mercaptoethanol, 10% SDS, 50 % glycerol, 0.01% bromophenol blue) was added to 65 μ g of protein lysate in a 1:4 ratio. Samples were heated in a dry system at 100 °C for 5 min before separating the protein extracts by 10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated overnight at 4 °C with the following antibodies (Cell Signaling, MA, USA): anti-IKK- β (1:1,000), anti-p-IKK- α/β (Ser 176/180; 1:250), anti-I κ B- α (1:1,000), anti-p-I κ B- α (Ser 32; 1:250), anti-p-NF- κ B p65 (Ser 536; 1:1,000), anti-transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK-1) (1:500), anti-p-TAK-1 (Thr 184/187; 1:250), anti-JNK (1:1,000), anti-p-JNK (Thr183/Tyr185; 1:500), anti-protein kinase B (AKT) (1:1,000) and anti-p-AKT (Ser 473; 1:500). Proteins were incubated with anti-rabbit IgG (Cell Signaling, MA, USA) in conjunction with horseradish peroxidase diluted 1:1,000 in PBST buffer (8% NaCl, 0.2% KCl, 0.2% KH_2HPO_4 , 1.15%, Na_2HPO_4 , 0.5 % Tween) with 2% skimmed milk powder for 1 h with stirring. Results were analyzed according to their molecular weight using a digital image system (Image Quant TM 400 version 1.0.0, Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) with Image Quant TM software Capture software. Beta-actin was used as a standard protein (1:50,000) (Sigma-Aldrich[®] Co., Saint Louis, MO, USA).

2.8. RNA isolation and real-time polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA was obtained from 100-150 mg of periepididymal fat using QIAzol[®] lysis reagent and the RNeasy mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), as described by the manufacturer. Total RNA was quantified in a spectrophotometer set at 260 nm and RNA purity was assessed by 260/280 nm ratio.

One microgram of total RNA was reverse transcribed into first-strand cDNA using a High Capacity cDNA transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed using SYBR FAST (Kapa Biosystem, Massachusetts, USA) and the following primers: 5'-TGCCCACTCACCTGCTGCT-3' (sense) and 5'-TGGGGTCAGCACAGATCTCTCTCT-3' (anti-sense) for MCP-1; 5'-GCGTGTTTCATCCGTTCTCTA-3' (sense) and 5'-GAGCCACAATTCCTTTCTAA-3' (anti-sense) for TNF- α ; 5'-CTCCATGCTCCTCCATCTG-3' (sense) and 5'-CCTGTCGCCTGTTCTTTGA-3' (anti-sense) for adiponectin; 5'-AATGCTGGACCAACACAAA-3' (sense) and 5'-CCTTCTTTACCTTCCCAAA-3' (anti-sense) for cyclophilin. The reaction conditions consisted of a pre-incubation step for denaturation of template cDNA at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 3 sec at 95 °C for denaturation, 30 sec at 60 °C for annealing and 1 sec at 72 °C for the extension step. Relative expression levels were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [20] using the cyclophilin gene as an internal control.

2.9. Statistical analysis

Results were presented as mean $\pm$ SD. All variables were tested for normality of distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. To evaluate the variance of the results with regard to the effect of isocaloric intake of HFD, the F test was used followed by the unpaired Student's t-test. In cases where results did not demonstrate a normal distribution or when variances were significantly different, the Mann-Whitney test was applied. Statistical

analysis was performed using the GraphPad Prism[®] software, version 5.01 (GraphPadSoftware Inc., CA, USA) and the level of significance adopted was 0.05.

3. Results

3.1. Effect of HFD intake on food consumption

The HFD group demonstrated a 29% reduction ($p < 0.05$) in the amount (g) of food consumed over the 12 weeks in comparison to the CON group (**Fig. 1A and Table 3**). However, due to the high caloric density of HFD, the daily energy intake of this group was similar to the CON animals, except in the twelfth week of the protocol (**Fig. 1B**). In addition, the cumulative energy intake at the end of protocol did not differ between groups (**Table 3**).

3.2. Effect of HFD intake on body weight, adiposity and body composition

After 12 weeks, the HFD group demonstrated a significant increase in periepididymal and retroperitoneal fat depot weight, relative to total body mass ($p < 0.05$), despite the similar body weight gain, in comparison to the CON group (**Table 3**). This increment in adiposity was reflected in the carcass composition (**Table 3**), since HFD animals had significantly more fat mass than those of the CON group ($p < 0.05$). Water, protein, lean mass and ash contents did not differ between the two groups.

3.3. Effect of HFD intake on glucose tolerance and insulin sensitivity

During the oGTT, the HFD animals presented a higher blood glucose level (**Fig. 2A**) and glycemic AUC (**Fig. 2B**), indicating that the HFD induced glucose intolerance in this group ($p < 0.05$). In addition, blood glucose level was higher at fasting and at 5 and 40 min during ipITT (**Fig. 2C**; $p < 0.05$). However, the *Kitt* value did not differ between HFD and CON groups (**Fig. 2D**). Accordingly, there was no effect of HFD intake on the fasting plasma insulin concentration and HOMA-IR (**Table 4**).

3.4. Effect of HFD intake on blood lipids and the fatty acid profile

As shown in **Table 4**, HFD intake resulted in a pronounced increase in total serum cholesterol and LDL-c concentrations, when compared to the CON group ($p < 0.05$). Likewise, non-HDL cholesterol was significantly higher in the HFD group in comparison to the CON group ($p < 0.05$). Serum HDL-c, VLDL-c and TAG and plasma NEFA levels were not different between groups. Animals fed on a HFD presented a lower percentage of plasma palmitic, palmitoleic, linoleic acids and total MUFA, and a higher percentage of plasma stearic, arachidonic acids and total SFA ($p < 0.05$), in comparison with the CON group (**Table 5**).

3.5. Effect of HFD intake on CRP and cytokine levels

There were no effects of HFD intake on plasma leptin, adiponectin, IL-6, TNF- α and MCP-1 levels. Nevertheless, serum CRP concentration was markedly higher ($p < 0.05$) in the HFD group (**Table 4**).

3.6. Effect of HFD intake on periepididymal adipose tissue protein and gene expressions

The consumption of a HFD decreased the phosphorylation of AKT at serine 473, after insulin stimulation. The ratio between the phosphorylated and the total AKT was significantly lower (**Fig. 3F**) in the HFD group, in comparison to the CON group ($p < 0.05$), after insulin stimulus. No variations were found in the phosphorylation or ratio between the phosphorylated and total forms of the inflammatory signaling proteins, IKK- α/β , I κ B- α , TAK-1 and JNK, nor in the phosphorylation of the p65 subunit, in the periepididymal adipose tissue (**Fig. 3A-E**), compared to the CON group. However, the expression of total form of IKK- β and TAK-1 was significantly decreased and increased in HFD group ($p < 0.05$), respectively. With respect to adipokine gene expression, there was no significant difference in TNF- α , MCP-1 and adiponectin mRNA levels between the groups (**Fig. 4**).

4. Discussion

High-fat feeding has been widely used in animal models to mimic the metabolic onset of human obesity [21,22]. Here, we hypothesized that not only dietary lipids, but other components of the diet could influence the metabolic and inflammatory response in diet-induced obesity models. Thus, in this study we adjusted all ingredients (except for lard and cornstarch) in order to offer the same amounts of protein, micronutrients and dietary fiber in both groups. In addition, rats fed on a HFD spontaneously adjusted their food intake so that the energy intake did not differ between groups throughout the experiment. This isocaloric intake of an adjusted HFD did not influence body weight, but had a great impact on intra-abdominal fat mass, glucose tolerance and serum lipid profile.

Although many fat-rich diets lead to hyperphagia and body weight gain [9,10], in the present study, the lack of these parameters is probably due to the macronutrient composition of the diet. It has been proposed that long chain fatty acids (LCFA), such as oleic acid and related metabolites (LCFA-CoA), contribute to reduced food intake, acting as potent satiety signals in the hypothalamus via orexigenic neuropeptide expression inhibition [23]. On the other hand, a similar amount of protein offered in our diets could explain the absence of hyperphagia, since insufficient protein intake could lead to increased food intake to ensure an appropriate amino acid supply [24].

In agreement with our findings, other studies reported that HFD-fed animals had increased adiposity even in the absence of diet overconsumption [25,26]. The higher adiposity achieved by the HFD group could be attributed to their low energy expenditure and whole body oxygen consumption [26,27]. Furthermore, the effect of the ingested lipid content on the metabolic changes associated with HFD feeding may be related to the fact that overfeeding fat provokes a reduction in carbohydrate oxidation without altering fat oxidation [28]. For some researchers, adiposity and total carcass fat enable more accurate measurement of obesity than body weight, which may underestimate the actual degree of obesity [29].

The plasma free fatty acid profile usually reflects the fatty acid composition of the diets consumed [30]. In this study, the HFD contained mainly SFA (36.6% of total lipids) and monounsaturated fatty acids (MUFA) (40.1%), whereas the CON diet was composed of

53.6% of polyunsaturated fatty acids (PUFA), 19.3% of SFA and 27.1% of MUFA. Nevertheless, plasma palmitic acid and total MUFA percentages were lower in rats fed on a HFD, compared to the CON group. Estrany et al. (2011) reported that SFA and MUFA are preferentially stored in the fat depots when HFD is offered [25], which may justify the lower percentage of these fatty acids in the plasma. The accumulation of SFA and MUFA in adipose depots depends on the balance between lipogenesis and lipolysis rates and might be related to the greater dietary fat availability in the HFD [25]. Palmitic acid was found to induce an increase in the expression of lipoprotein lipase mRNA in rat adipocytes, suggesting an increased fatty acid uptake [31]. Dietary fatty acid composition also affects the onset of insulin resistance and its associated diseases. Yang et al. (2012) demonstrated that HFD containing SAT/MUFA/PUFA in a proportion at 2:1.5:1, respectively, markedly raised serum LDL-c and glucose levels [32], which is consistent with our findings. Although the HFD evoked the increase in total serum cholesterol and LDL-c levels, no changes were observed in plasma VLDL-c, HDL-c and NEFA concentrations.

Animals fed on a HFD showed higher fasting blood glucose levels, compared to the CON group, despite the fact that fasting insulin levels and the HOMA-IR index were not altered. To better understand the effects of dietary fat on glucose tolerance and insulin sensitivity, oGTT and ipITT were performed after 12 weeks of HFD feeding. Animals receiving the HFD alone developed glucose intolerance and this fact could be related to inadequate insulin secretion by pancreatic β -cells, resulting in lower glucose uptake [33]. An insulin resistance mice model designed by Ahrén et al. (2010) revealed that the increase in β -cell volume was already evident after three months of HFD feeding. These morphological changes in pancreatic mass depict an important adaptation to insulin resistance and may be crucial for the maintenance of normal or near normal glycemia [34]. However, the chronic exposure to free fatty acids could result in β -cell failure, leading to the development of type 2 diabetes [33].

Some adipokines, such as leptin, adiponectin and resistin, are considered systemic inflammatory biomarkers that affect insulin sensitivity [22]. In the present study, the isocaloric intake of a HFD did not alter plasma leptin and adiponectin levels. In order to discriminate the role of energy intake, dietary fat and adiposity on adiponectin gene expression and plasma levels, Qiao et al. (2011) conducted a tightly controlled study in mouse models [35]. In agreement with our results, they observed that pair-fed mice consuming the same amounts of calories as low-fat diet fed mice presented increased adiposity, but no changes in adiponectin gene expression and plasma adiponectin levels. Nevertheless, caloric restriction dramatically increased plasma adiponectin levels and gene expression, suggesting that energy intake, but not dietary fat, plays an important role in controlling WAT adiponectin gene expression [35].

Of note, animals fed on a HFD showed a pronounced increase in serum CRP levels, when compared to the CON group, indicating the presence of a systemic inflammatory state. The CRP is considered the major acute phase protein and is mainly produced by the liver in response to some proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 [36]. Nevertheless, no differences were found between groups concerning plasma proinflammatory cytokine concentrations or in TNF- α and MCP-1 mRNA expression in the periepididymal adipose tissue.

In obesity, WAT represents an important site of chronic, low-grade inflammation, which is characterized by macrophage infiltration, abnormal adipokine production and activation of inflammatory signaling pathways [3]. In this study, we evaluated the effect of an adjusted HFD on the inflammatory and insulin signaling pathways and observed that this adjustment prevented the manifestation of chronic inflammation in periepididymal fat. Interestingly, AKT phosphorylation was reduced in the periepididymal fat of the HFD group, when animals were stimulated with insulin. This result suggests that HFD intake acutely

impaired insulin signaling in this tissue. Although there was no difference in the phosphorylation of JNK and IKK- β , the reduction in AKT phosphorylation could be associated with the activation of other proteins such as protein kinase C, the mammalian target of rapamycin, the extracellular signal-regulated kinases and ribosomal protein S6K, which also have the capacity to inhibit the phosphorylation of the IRS-1 at tyrosine 1222 [37].

Other components of the diet, such as some amino acids, dietary fibers and certain micronutrients – such as zinc and vitamin D – may modulate, to some extent, proinflammatory gene expression. In this context, it should be noted that adequate amounts of zinc are required for the anti-inflammatory properties of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs), which can repress NF- κ B DNA binding via physical interaction with the NF- κ B p65 subunit [38]. Moreover, zinc deficiency compromised PPAR-mediated I κ B- α expression in the liver [38], suggesting that adequate zinc intake is necessary for controlling the inflammatory response. Similarly, low vitamin D levels have been implicated in numerous chronic inflammatory conditions, such as diabetes, autoimmune and cardiovascular diseases [39]. The active form of vitamin D, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ reduced NF- κ B activity by increasing I κ B- α mRNA stability and decreasing I κ B- α phosphorylation in macrophage cells [40]. In obese rats, vitamin D deficiency induced hepatic inflammation via toll-like receptor activation, stimulating downstream inflammatory signaling [41].

Several relevant findings show the relationship between a particular nutrient consumption and the improvement in metabolic parameters induced by a HFD [13,42]. Dietary intervention with calcium, vitamin D and whey protein prevented fat mass accumulation in rats fed on a HFD and increased insulin receptor expression in the muscle, suggesting protective effects of such nutrients against obesity-related dysfunction [42]. Similarly, supplementation with L-arginine for 12 weeks also reduced WAT mass and serum leptin levels, resulting in an improvement in glucose tolerance in male Sprague-Dawley rats fed on a HFD [13]. These observations support the idea that other dietary components may affect obesity conditions associated with chronic inflammation.

In summary, we conclude that the isocaloric intake of a HFD evoked an increment in intra-abdominal fat mass and this was accompanied by some metabolic abnormalities, including hyperglycemia, glucose intolerance, dyslipidemia, as well as increased levels of an acute inflammatory biomarker (C-reactive protein). We propose that nutrient adjustment has probably prevented rats from developing periepididymal adipose tissue chronic inflammation in this high-fat feeding rat model.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2009/54395-0 and 2010/14164-7). The authors thank Ivanir S.O. Pires and Mariana C. Ferreira for technical assistance and declare no conflicts of interest.

References

- [1] WHO – World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization, 2010.
- [2] Atzmon G, Yang XM, Muzumdar R, Ma XH, Gabriely I, Barzilai N. Differential gene expression between visceral and subcutaneous fat depots. *Horm Metab Res.* 2002;34(11-12):622-8.

- [3] Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr. Suppl* 3:S5-78, 2011.
- [4] Kim SJ, Choi Y, Choi YH, Park T. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *J Nutr Biochem.* 2012;23(2):113-22.
- [5] Schaeffler A, Gross P, Buettnner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, Kopp A, Schoelmerich J, Falk W. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology.* 2009;126(2):233-45.
- [6] Solinas G, Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2010;24(8):2596-611.
- [7] Carvalho BM, Guadagnini D, Tsukumo DM, Schenka AA, Latuf-Filho P, Vassallo J, Dias JC, et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia.* 2012;55(10):2823-34.
- [8] Kalupahana NS, Voy BH, Saxton AM, Moustaid-Moussa N. Energy-restricted high-fat diets only partially improve markers of systemic and adipose tissue inflammation. *Obesity.* 2011;19(2):245-54.
- [9] Judge MK, Zhang J, Tümer N, Carter C, Daniels MJ, Scarpance PJ. Prolonged hyperphagia with high-fat feeding contributes to exacerbated weight gain in rats with adult-onset obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(3):R773-80.
- [10] Woods SC, D'Alessio DA, Tso P, Rushing PA, Clegg DJ, Benoit SC, et al. Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. *Physiol Behav.* 2004;83(4):573-8.
- [11] Brown JL, Spicer MT, Spicer LJ. Effect of high-fat diet on body composition and hormone responses to glucose tolerance tests. *Endocrine.* 2002;19(3):327-32.
- [12] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.
- [13] Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee MJ, Smith SB, et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr.* 2009;139(2):230-7.
- [14] Safwat GM, Pisanò S, D'Amore E, Borioni G, Napolitano M, Kamal AA, et al. Induction of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance by feeding a high-fat diet in rats: does coenzyme Q monomethyl ether have a modulatory effect? *Nutrition.* 2009;25(11-12):1157-68.
- [15] Pang J, Choi Y, Park T. Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch Biochem Biophys.* 2008;476(2):178-85.
- [16] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
- [17] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412-9.
- [18] Rogero MM, Borelli P, Vinolo MA, Fock RA, de Oliveira Pires IS, Tirapegui J. Dietary glutamine supplementation affects macrophage function, hematopoiesis and nutritional status in early weaned mice. *Clin Nutr.* 2008;27: 386-97.
- [19] Shirai N, Suzuki H, Wada S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Anal Biochem.* 2005;343(1):48-53.

- [20] Liu W, Saint DA. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;294:347-53.
- [21] Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(4):798-808.
- [22] McDonald SD, Pesarchuk E, Don-Wauchope A, El Zimaity H, Holloway AC. Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight. *Nutr Res*. 2011;31(9):707-14.
- [23] Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*. 2002;51(2):271-5.
- [24] Klaus S. Increasing the protein:carbohydrate ratio in a high-fat diet delays the development of adiposity and improves glucose homeostasis in mice. *J Nutr*. 2005;135(8):1854-8.
- [25] Estrany ME, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M. Isocaloric intake of a high-fat diet modifies adiposity and lipid handling in a sex dependent manner in rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10:52.
- [26] Català-Niell A, Estrany ME, Proenza AM, Gianotti M, Lladó I. Skeletal muscle and liver oxidative metabolism in response to a voluntary isocaloric intake of a high fat diet in male and female rats. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(1-4):327-36.
- [27] So M, Gaidhu MP, Maghdoori B, Ceddia RB. Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10:99.
- [28] Schutz Y, Flatt JP, Jéquier E. Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity. *Am J Clin Nutr*. 1989; 50(2):307-314.
- [29] Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003;133(4):1081-7.
- [30] Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006;36(3):485-501.
- [31] Saravanan N, Haseeb A, Ehtesham NZ, Ghafoorunnissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(1):159-65.
- [32] Yang X, Zhang Y, Lin J, Pen A, Ying C, Cao W, Mao L. A lower proportion of dietary saturated/monounsaturated/polyunsaturated fatty acids reduces the expression of adiponectin in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res*. 2012;32(4):285-91.
- [33] Manco M, Calvani M, Mingrone G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obes Metab*. 2004;6(6):402-13.
- [34] Ahrén J, Ahrén B, Wierup N. Increased β -cell volume in mice fed a high-fat diet: a dynamic study over 12 months. *Islets*. 2010;2(6):353-6.
- [35] Qiao L, Lee B, Kinney B, Yoo HS, Shao J. Energy intake and adiponectin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(5):E809-16.
- [36] Kaneko H, Anzai T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Mano Y, et al. Human C-reactive protein exacerbates metabolic disorders in association with adipose tissue remodelling. *Cardiovasc Res*. 2011;91(3):546-55.
- [37] Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E581-91.
- [38] Shen H, Oesterling E, Stromberg A, Toborek M, MacDonald R, Hennig B. Zinc deficiency induces vascular pro-inflammatory parameters associated with NF-kappaB and PPAR signaling. *J Am Coll Nutr*. 2008;27(5):577-87.
- [39] Borges MC, Martini LA, Rogero MM. Current perspectives on vitamin D, immune system, and chronic diseases. *Nutrition*. 2011;27(4):399-404.

- [40] Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):889-97.
- [41] Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, et al. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology*. 2012;55(4):1103-11.
- [42] Siddiqui SM, Chang E, Li J, Burlage C, Zou M, Buhman KK, et al. Dietary intervention with vitamin D, calcium, and whey protein reduced fat mass and increased lean mass in rats. *Nutr Res*. 2008;28(11):783-90.

Table 1. Ingredients and composition of the experimental diets^a

	CON	HFD
Ingredient (g/1,000 kJ)		
Cornstarch	37.14	7.09
Sucrose	5.98	5.98
Casein	8.38	8.38
Soybean oil	2.39	2.39
Lard	0.00	13.25
Cellulose	2.99	2.99
Mineral mix	2.09	2.09
Vitamin mix	0.60	0.60
L-cysteine	0.11	0.11
Choline bitartrate	0.15	0.15
Tertbutylhydroquinone	0.0005	0.0017
Macronutrient composition (kJ, %)		
Carbohydrate	75.8	24.2
Protein	14.9	14.9
Lipid	9.3	60.9

CON, control diet; HFD, high-fat diet. ^aAccording to AIN-93M [12].

Table 2. Fatty acids composition (%) of the experimental diets

	CON	HFD
Saturated fatty acids		
Myristic acid (C 14:0)	0.8 ± 0.01	1.3 ± 0.03
Palmitic acid (C 16:0)	14.1 ± 0.03	23.3 ± 0.13
Stearic acid (C 18:0)	4.4 ± 0.01	12.0 ± 0.22
Sum SFA	19.3 ± 0.03	36.6 ± 0.20
Monounsaturated fatty acids		
Oleic acid (C 18:1)	27.1 ± 0.03	40.1 ± 0.06
Sum MUFA	27.1 ± 0.03	40.1 ± 0.06
Polyunsaturated fatty acids		
Linoleic acid (C 18:2 n-6)	48.4 ± 0.07	21.9 ± 0.22
γ-linolenic acid (C 18:3 n-6)	0.2 ± 0.00	nd
α-linolenic acid (C 18:3 n-3)	5.0 ± 0.01	1.5 ± 0.03
EPA (C 20:5 n-3)	0.06 ± 0.00	nd
Sum PUFA	53.6 ± 0.06	23.4 ± 0.25
Sum PUFA n-6	48.6 ± 0.07	21.9 ± 0.22
Sum PUFA n-3	5.0 ± 0.01	1.5 ± 0.03
n-6:n-3 ratio	9.7 ± 0.03	14.8 ± 0.18

Results are expressed as mean ± SD (n=2-3). SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; EPA, eicosapentaenoic acid.

Table 3. Body weight, food intake, adiposity and body composition of rats fed a control diet (CON) or a high-fat diet (HFD) for 12 weeks

	CON	HFD
Body weight		
Initial weight (g)	362 ± 56	374 ± 32
Final weight (g)	476 ± 39	502 ± 34
Body weight gain (%)	25.7 ± 6.9	28.8 ± 7.1
Food intake		
Cumulative food intake (g)	1,888 ± 226	1,343 ± 92*
Cumulative energy intake (MJ)	31.5 ± 3.8	31.7 ± 2.0
Adiposity		
Periepididymal fat (g/100g body weight)	1.99 ± 0.26	2.94 ± 0.77*
Retroperitoneal fat (g/100g body weight)	2.08 ± 0.39	3.11 ± 0.81*
Body composition		
Water (g carcass)	255.6 ± 22.7	255.2 ± 33.6
Lean mass (g carcass)	382.6 ± 33.5	401 ± 32.4
Fat mass (g carcass)	80.53 ± 7.6	105.3 ± 20.8*
Protein (g carcass)	96.2 ± 27.2	106.7 ± 15.7
Ash (g carcass)	22.7 ± 6.1	23.8 ± 7.1

Results are expressed as mean ± SD (n= 6-12/group). Student's t-test: *p<0.05 vs CON group.

Table 4. Blood biomarkers from rats fed on a control diet (CON) or a high-fat diet (HFD) for 12 weeks

	CON	HFD
Lipid parameters		
Total cholesterol (mmol/L)	1.78 ± 0.18	2.06 ± 0.17*
HDL-c (mmol/L)	0.57 ± 0.07	0.53 ± 0.04
LDL-c (mmol/L)	0.71 ± 0.20	0.99 ± 0.14*
VLDL-c (mmol/L)	0.50 ± 0.10	0.54 ± 0.11
Non-HDL cholesterol (mmol/L)	1.21 ± 0.13	1.53 ± 0.16*
TAG (mmol/L)	1.06 ± 0.22	1.15 ± 0.22
NEFA (nmol/μL)	0.15 ± 0.09	0.13 ± 0.11
Insulin sensitivity		
Fasting glucose (mmol/L)	4.9 ± 0.4	5.5 ± 0.4*
Fasting insulin (μIU/mL)	27.4 ± 15.6	26.4 ± 6.4
HOMA-IR	6.5 ± 4.0	6.9 ± 2.1
Inflammatory markers and adipokines		
CRP (ng/mL)	611 ± 260	1,002 ± 168*
TNF-α (pg/mL)	4.1 ± 0.8	4.5 ± 1.8
IL-6 (pg/mL)	15.5 ± 4.5	21.7 ± 10.7
MCP-1 (pg/mL)	187.2 ± 37.0	185.1 ± 77.0
Leptin (pg/mL)	2,509 ± 511	3,389 ± 817
Adiponectin (ng/mL)	12,994 ± 4,983	9,900 ± 2,897

Results are expressed as mean ± SD (n= 6 group). Student's t-test: *p<0.05 vs CON group.

Table 5. Plasma fatty acid profile (%) from rats fed on a control diet (CON) or a high-fat diet (HFD) for 12 weeks

	CON	HFD
Saturated fatty acids		
Myristic acid (C 14:0)	0.63 ± 0.05	1.08 ± 0.72
Palmitic acid (C 16:0)	21.19 ± 1.02	19.19 ± 1.26*
Stearic acid (C 18:0)	7.24 ± 0.77	13.75 ± 1.67***
Sum SFA	28.84 ± 0.82	33.59 ± 1.94***
Monounsaturated fatty acids		
Palmitoleic acid (C 16:1)	4.08 ± 1.01	0.76 ± 0.22**
Oleic acid (C 18:1)	20.21 ± 2.27	18.54 ± 3.18
Sum MUFA	24.29 ± 3.03	18.84 ± 3.29*
Polyunsaturated fatty acids		
Linoleic acid (C 18:2 n-6)	26.03 ± 2.71	19.34 ± 1.84**
Linolenic acid (C 18:3 n-3)	nd	2.92 ± 1.69
Arachidonic acid (C 20:4 n-6)	19.59 ± 3.39	25.05 ± 3.03*
EPA (C 20:5 n-3)	nd	2.96 ± 1.68
DHA (C 22:6 n-3)	2.11 ± 0.14	1.31 ± 0.70
Sum PUFA	46.88 ± 3.26	47.57 ± 3.28

Results are expressed as mean ± SD (n= 6/group). Student's t-test: * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001 vs. CON group. SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid.

Figura 1

Fig. 1 – Food intake in grams (A), energy intake (B) and body weight (B) of Wistar rats fed *ad libitum* with a control (CON) diet or a high-fat diet (HFD) for 12 weeks. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n= 12/group). Student's t-test: *p<0.05 and **p<0.01 vs. CON group.

Figura 2

Fig. 2 – Glycemic curve during oGTT (A), AUC of oGTT (B), glycemic curve during ipITT (C) and Kitt of ITT (D) of Wistar rats fed ad libitum with a control (CON) diet or a high-fat diet (HFD) for 12 weeks. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=12/group) Student's t-test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs. CON group. AUC, area under the curve; Kitt, constant for glucose disappearance.

Figura 3

Fig. 4 – Relative gene expression of TNF- α , MCP-1 and adiponectin in periepididymal adipose tissue of Wistar rats fed ad libitum with a control (CON) diet or a high-fat diet (HFD) for 12 weeks. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=6/ group). AU, arbitrary units.

Figure 4

Fig. 4 – Ratio of phosphorylated by total IKK- β (A), ratio of phosphorylated by total IkB- α (B), phosphorylation of NF- κ B p65 (C), ratio of phosphorylated by total TAK-1 (D), ratio of phosphorylated by total JNK (E) and ratio of phosphorylated by total AKT (F) with representative blots in periepididymal adipose tissue of Wistar rats fed ad libitum with a control (CON) diet or high-fat diet (HFD) for 12 weeks. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=5-6/ group). Student's t-test: * p<0.05 vs. CON group. AU, arbitrary units.

ANEXO 3

Manuscrito submetido no periódico *Food & Function* em março de 2013 intitulado “*Yerba mate (Ilex paraguariensis) modulates NF-kappa B pathway and AKT expression in the liver of rats fed on a high-fat diet*”.

YERBA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) MODULATES NF-KappaB PATHWAY AND AKT EXPRESSION IN THE LIVER OF RATS FED ON A HIGH-FAT DIET

Tatiane Mieko de Meneses Fujii, ^{*a} Patrícia Silva Jacob, ^{*a} Monica Yamada, ^{*a} Maria Carolina Borges, ^{*a} Marina Maintinguer Norde, ^{*a} Lucas Carminatti Pantaleão, ^{*b} Daniela Moura de Oliveira, [§] ^a Julio Tirapegui, ^{§c} Inar Alves de Castro, ^{§c} Primavera Borelli, ^{§d} Ricardo Ambrósio Fock ^{§d} and Marcelo Macedo Rogero ^{*a}

^aDepartment of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, Av. Doutor Arnaldo, 715, São Paulo, SP 01246-904, Brazil. Fax: +55 11 3061-7705; Tel.: +55 11 3061-7850; E-mail: mmrogero@usp.br

^bDepartment of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo, SP 05508-900, Brazil.

^cDepartment of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP 05508-900, Brazil.

^dDepartment of Clinical and Toxicological Analyzes, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP 05508-900, Brazil.

* These authors contributed to the study design, data collection, analysis and interpretation, and wrote the manuscript. §The author contributed to study design and data analysis and interpretation.

Abstract

This study was undertaken to determine the effects of Yerba Mate (YM) (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract intake on insulin resistance and the NF-kappaB pathway in the liver, muscle and adipose tissue of rats submitted to a high-fat diet (HFD). Male Wistar rats were fed a control (CON) (n=24) or a HFD (n=24) for twelve weeks. At the end of this period, rats received YM daily (1g/kg body weight) for 4 weeks. Phenolic acids (104 mg/g of dry extract) and caffeine (15 mg/g of dry extract) were identified in YM. The consumption of the diet was isocaloric among groups. Intake of YM aqueous extract reduced body weight gain ($p<0.05$) in the HFD group, compared to the other groups. The YM-treated HFD group presented lower ($p<0.05$) total blood cholesterol and triacylglycerol (TAG) levels, when compared to the non-treated HFD group. Following the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT), the HFD-treated group demonstrated an increased glycemic response at 5 and 10 minutes after insulin injection. YM decreased the ratio between phosphorylated and total kinase inhibitor of κ B (IKK), increased the ratio of phosphorylated to total form of protein kinase B (AKT) and reduced nuclear factor kappa B (NF- κ B) phosphorylation in the liver of the HFD group. In conclusion, YM promoted weight loss and improved the lipid profile in the HFD group. NF- κ B pathway and AKT expression were modulated in the liver, but not in the skeletal muscle and adipose tissue. Results suggest a beneficial role of YM in improving metabolic dysfunctions induced by HFD.

Keywords: High-fat diet; Yerba Mate; Inflammation; Insulin resistance; Liver; Rats.

Introduction

The chronic intake of a high-fat diet (HFD), rich in saturated fatty acids, promotes weight gain, and excess of fat storage in tissues other than in adipose tissue, including liver and skeletal muscle and contributes to an increase in plasma free fatty acid (FFA) levels.¹ In addition, HFD intake increases insulin resistance and the inflammatory response, which are heavily involved in the pathogenesis of metabolic syndrome and chronic diseases, such as obesity.²

Inflammatory mechanisms involve the elevation of plasma cytokine levels and activation of several serine kinase proteins. Tumor necrosis factor (TNF)- α , a proinflammatory cytokine, activates c-Jun N terminal kinase (JNK), while the presence of FFA activates a transmembrane protein, named toll like receptor (TLR)-4, which induces IKK phosphorylation, and activation of NF- κ B.³ JNK and IKK can impair the insulin pathway by increasing the serine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS)-1, which in turn decreases the phosphorylation of AKT, and the uptake of glucose.⁴

Natural compounds that may be beneficial to reducing the pathogenesis of obesity and metabolic syndrome have been investigated. Yerba Mate (YM) (*Ilex paraguariensis*) contains several phenolic compounds, such as chlorogenic acid, which modulate the inflammatory response.^{5,6} YM polyphenol levels are higher than those of green tea and equivalent to those of red wines.⁷ Recent studies have shown effects of YM in reducing fat pads, without changing body weight,⁸ in inhibiting adipogenesis in preadipocytes,⁹ and in modulating inflammatory response and insulin sensitivity.¹⁰ Furthermore, there is evidence that YM extract intake has hypolipidemic¹¹ (*in vitro*) and cardioprotective¹² effects and contributes to body weight reduction.^{13,14}

This study was undertaken to determine the effect of an aqueous extract of YM on insulin resistance and NF- κ B pathway activation in the liver, muscle and adipose tissue of rats fed on an isocaloric HFD. For this purpose, the ingredients (except for starch and lard) of the diet were normalized, according to their energy densities.

Material and Methods

Animals and Treatment

Male *Wistar* rats (initial weight: 298 ± 27 g), aged 2-months old, were obtained from the Animal Laboratory of the Faculty of Medicine at the University of São Paulo. Rats were housed in plastic cages (3-4 rats per cage) in an atmosphere of $55 \pm 10\%$ relative humidity at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with a 12-h-light/-dark cycle (lights on at 07:00h). Rats were given free access to food and water. Body mass and diet intake were recorded three times a week. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, according to the guidelines of the Brazilian College on Animal Experimentation (protocol number 048/2009).

After acclimatization for 10 days on a semipurified diet, based on the American Institute of Nutrition recommendations for adult rodents (AIN-93M),¹⁵ rats were randomly assigned to 2 groups; the HFD group and the control diet-fed (CON) group. For twelve weeks, the CON group ($n = 24$) received the AIN-93M diet (total energy: 75.8% carbohydrates, 9.3% fat, and 14.9% protein), while the HFD group ($n = 24$) received the AIN-93M-based diet enriched with lard (total energy: 24.2% carbohydrates, 60.9% fat, and 14.9% protein).

In a pilot study, rats from the HFD group consumed approximately 30% less diet than the rats of the CON group. However, given the higher energy density of the HFD (5.55 kcal/g), compared to the CON diet (3.99 kcal/g), the daily energy intake did not differ between the groups. As the decrease in the amount of diet consumed by the HFD group could result in a decreased intake of several micro- and macronutrients, which could seriously affect the outcome of the study, all diet ingredients in HFD diet (except for starch and lard) were adjusted in order to be present in the same amount as in the CON diet, per kJ of diet, as shown in Table 1. The adjustment of HFD ingredients based, on their energy content, rather than on their weight, has been previously utilized by other studies.^{16,17,18,19} Furthermore, due to the greater susceptibility of lard to oxidation, we added a higher amount of tertbutylhydroquinone to the HFD.²⁰

At the end of the 12th week, the rats were divided into 2 groups that either received (+YM) or did not receive Yerba Mate aqueous extract (1 g/kg/day) for 4 weeks. The study was performed with 4 experimental groups: CON, HFD, CON+YM and HFD+YM. The roasted Yerba Mate extract was prepared fresh each day from the same batch by dissolving lyophilized instant mate tea in sterile water. The Yerba Mate aqueous extract (+YM groups) and vehicle (pure water) were administered by intragastric gavage at the same time each day.

Characterization of Plant Material and Extraction

Phenolic acid and caffeine analyses were performed using a high-performance liquid chromatographer (1200SL, Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) coupled to a diode array detector (DAD) and a single quadrupole-mass spectrometer (6150B) (HPLC/DAD-MS). Sample solutions were injected (5 μL) into an Agilent Zorbax SB-C18 column (50 x 2.1 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of solvent A (100% water +

0.1% formic acid) and solvent B (methanol). Injections were made during 15% B, which was held for 1.8 min, followed by 15-30% B up to 5 min, 35% B from 6 to 12 minutes and back to 15% B at 13 minutes. The initial condition was kept for 7 min to allow column reequilibration. The flow rate was maintained at 320 $\mu\text{L}/\text{min}$. MS parameters for the analysis were as follows; capillary voltage, 3000 V; nitrogen as nebulizer (30 psi) and drying (12 L/min) and desolvation temperature, 350°C. Negative and positive modes were used for phenolic and caffeine analysis, respectively. At first, a scan analysis was performed in both modes and the most abundant ions from each peak were selected and analysed using single ion monitoring (SIM). The identification of 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) and caffeine was based on retention time, UV absorption spectra and mass spectra, compared to standards. To identify other phenolic compounds, for which no standards were available, the UV absorption and MS spectra were used, as described by Bastos et al. (2007) and Jaiswal et al. (2010).^{21,22} HPLC-DAD was used for quantitative analysis. 5-CQA and other phenolic acids were determined at 324 nm (5 point analytical curve from 5 to 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with 5-CQA, $r^2=0.99995$), while caffeine was determined at 272 nm (5 point analytical curve from 5 to 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $r^2=0.99998$).

Fatty Acid Compositions of the Diets and Lard

Fatty acid compositions were determined by gas chromatography. Analyses of fatty acid methyl ester (FAMES) were carried out using an Agilent 7890A series gas chromatographer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a split injection port, flame ionization detector (FID) and fused silica capillary column DB-23 (J&W 122-2361) of 60m x 0.25mm id; film thickness of 0.15 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The samples (1.0 μL) were injected in the split mode (split ratio 1:50). Helium was used as a carrier gas and the fatty acids were separated using a 1°C/min gradient from 140 to 225°C. The injector temperature was set at 250°C and the detector temperature was set at 260°C. Peak identification was performed by comparing the relative retention times with those of a commercial standard mixture of FAME Supelco 37 Component mix; 47885-U and C4-C24 Even Carbon 49453-U (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). The results were expressed as percentage of the total fatty acids present, as shown in Table 2.

Collection of Biological Material

At the end of the 16th week, the following were performed (i) Collection of blood, measurement of periepididymal and retroperitoneal fat pads weights and subsequent evaluation of the chemical composition of the carcass or (ii) infusion of insulin via the portal vein and subsequent collection of the liver, soleus muscle and periepididymal adipose tissue for protein expression analysis by Western blotting. For this study, only hepatic tissue was used for histology. All animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (100 mg/kg of body mass; Anasedan®, Jacaré, Brazil) and xylazine hydrochloride (50 mg/kg of body mass; Dopalen®, Paulínia, Brazil) was administered subcutaneously by means of an insulin syringe with a 20G needle.²³ In the first experiment, after anesthetization, six animals from each group were sacrificed by decapitation using an appropriate guillotine. This procedure was performed quickly in order to minimize any form of suffering or distress of animals. Euthanasia was carried out in the morning, between 8 and 12 h.

In the second experiment using the remaining six animals from each group, a sample of the soleus muscle of the right paw was collected (50 mg), the abdominal cavity was

opened and then a sample of periepididymal adipose tissue (400 mg) and liver tissue from the right superior lobe (100 mg) were collected. Subsequently, to stimulate the insulin-signaling pathway, 10 units (U) of regular human insulin (NovolinR ® Novo Nordisk, Montes, MG, Brazil, 100 U/ml) were injected via the portal vein using an insulin syringe with a needle length of 8 mm and diameter of 0.3 mm. After 30 seconds, another sample from the same lobe was extracted (100 mg) and at 90 seconds after the injection of insulin, a sample of periepididymal adipose tissue (400 mg) and the soleus muscle of the left paw (50 mg) of the animal were obtained.²⁴ After the samples were taken, they were immediately stored in liquid nitrogen. The tissue extraction of total proteins was performed on the same day of euthanasia and used for evaluating the expressions of IKK- β , JNK, AKT and IRS-1, in its total and phosphorylated forms, and NF- κ B, in its phosphorylated form, by Western Blotting.

Blood Analyses

Fasting blood glucose from the tail vein was determined using an Accu-Chek Performa glucometer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The serum total cholesterol, HDL-c and TAG levels were quantified using commercial kits for the automatic multichannel analyzer (Abbott Diagnostics Architect C8000, Illinois, USA). The non-HDL-c was calculated by the difference in total cholesterol and HDL-c. Serum insulin, C-reactive protein (CRP), TNF- α and plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 levels were quantified using the Lincoplex kit (Linco Research Inc., St. Charles, MO). The serum activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were quantified using commercial kits for the automatic multichannel analyzer (Abbott Diagnostics Architect C8000 Illinois, USA). Plasma total fatty acid concentration was determined using a commercial kit (Biovision, Catalog #100-K612, California, USA). The fatty acid profile was analyzed according to Shirai (2005).²⁵ Analyses of FAMES was carried out using an Agilent 7890A series gas chromatographer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a split injection port, FID and fused silica capillary column DB-23 (J&W 122-2361) of 60m x 0.25mm id; film thickness of 0.15 μ m (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The samples (1.0 μ L) were injected in the split mode (split ratio 1:50). Helium was used as a carrier gas and the fatty acids were separated using a 1°C/min gradient from 140 to 225°C. The injector temperature was set at 250°C and the detector temperature was set at 260°C. Peak identification was performed by comparing the relative retention times with those of a commercial standard mixture of FAME Supelco 37 Component mix; 47885-U and C4-C24 Even Carbon 49453-U (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). The results were expressed as the percentage of the total fatty acids present.

Glucose Tolerance and Insulin Resistance

After fasting for 7-8h, blood was collected from the tail vein to determine the glucose concentration using an Accu-Chek Performa glucometer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). For the oral glucose tolerance test (oGTT), blood samples were collected at fasting (time 0) and 30, 60, 90, 120 minutes after the administration of solution of 20% glucose (2g/kg of body weight) by oral gavage.²¹ For the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT), blood samples were collected at fasting (time 0) and 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 minutes after intraperitoneal insulin injection (0.75U/kg of body weight).²⁶

The area under the curve (AUC) was calculated for the oGTT. The rate for glucose disappearance during the ipITT (K_{ITT}) was calculated using the formula, $0.693/t_{1/2}$, and the

glucose $t_{1/2}$ and was calculated from the slope of the fasting glucose during the linear decay of the test.²⁷ The homeostasis Model Assessment (HOMA) was used as an indicator of peripheral insulin resistance, using blood glucose (mmol/L) multiplied by insulin (μ IU/mL) fasting as parameters, and divided by 22.5²⁸. The Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) was used as an indicator of insulin sensitivity, which is calculated as $QUICKI = 1/[\log(\text{fasting insulin } \mu\text{U/mL}) + \log(\text{fasting glucose mg/dL})]$.²⁹

Carcass Chemical Composition Analyses

Water, lipid, protein and ash contents present in the carcass of rats were determined as described elsewhere.³⁰

Analysis of Protein Phosphorylation and Expression by Western Blotting

To obtain protein lysates, 20 mg of liver and 25 mg of muscle were homogenized with an extraction buffer (potassium phosphate buffer, saccharose, dithiothreitol (DTT), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), sodium fluoride (NaF), phosphatase inhibitor I, phosphatase inhibitor II, protease inhibitor and ultrapure water). Laemmli buffer (1 X concentrate, 240 mM Tris-HCl, 200 mM mercaptoethanol, 0.8% SDS, 40 % glycerol, 0.02% bromophenol blue) was added to the lysates in a 1:1 ratio. For periepididymal fat, 400 mg samples were homogenized with 1 mL of ice-cold extraction buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% Triton-X 100, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 20 mM NaF, 30 mM sodium pyrophosphate, 0.2% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, PMSF, protease and phosphatase inhibitors and ultrapure water) and laemmli buffer (5X concentrate) was added to 65 μ g of protein lysates in a 1:4 ratio. The protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with primary antibodies (Cell Signaling, MA, USA): anti-IKK- β (1:1.000), anti-pIKK- β (Ser 180; 1:250), anti-JNK (1:1.000), anti-pJNK (Tyr 185; 1:500), anti-pNF- κ B (Ser 536; 1:1.000) anti-AKT (1:1.000), anti-pAKT (Ser 473; 1:500), anti-IRS-1(1:500) and anti-pIRS-1 (Ser 307; 1:250). The proteins were then stained with anti-rabbit IgG (Cell Signaling, MA, USA) in conjunction with horseradish peroxidase diluted 1:2 000 in PBST buffer (8% NaCl, 0.2% KCl, 0.2% KH_2HPO_4 , 1.15% Na_2HPO_4 , 0.5 % Tween) with 3% skimmed milk powder for 1 h with stirring. Results were analyzed using a digital imaging system (Image Quant TM 400 version 1.0.0, Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) with ImageQuantTMsoftware Capture software. We used β -actin as a normalizing protein (Sigma-Aldrich[®] Co., Saint Louis, MO, USA).

Liver Histology

Fragments of dissected liver were immediately fixed in 10% formalin. After a period of at least 48 hours, representative fragments from each sample were subjected to paraffin embedding. All the cuts were stained with hematoxylin-eosin.³¹ Another sample of liver was used to perform the Sudan Black method, to evaluate lipid infiltration in the hepatocytes.³²

Statistical Analyses

Results are presented as means and standard deviation (SD). Differences among groups were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey test or Kruskal-Wallis ANOVA when the homogeneity of variances (Harlley test) could not be observed, using the GraphPad Prism® software version 5.01 (GraphPadSoftware Inc., CA, USA).

Results

Identification and characterization of phenolic compounds and caffeine from mate tea

Identification and characterization of phenolic compounds and caffeine of mate tea are displayed in Table 3 and in Figures 1 and 2. Instant Yerba Mate tea contained 104 mg of total phenolics/g, which provided an average daily intake of 53 mg and 61 mg of total phenolics in the CON+YM and HF+YM groups, respectively. As expected, most phenolic compounds were chlorogenic acids, especially caffeoyl derivatives (Table 3). The caffeine content of the extract was 15 mg/g, resulting in a daily dose of 8 mg (CON+YM) and 9 mg (HF+YM) (data not shown).

Effect of YM aqueous extract on energy intake and body composition

Although diet consumption was isocaloric among groups, in four weeks, YM promoted a 1% reduction in weight gain in the HFD+YM group, while the weight gain in the HFD group was 2% (Fig 3). YM treatment did not change fat and liver weights, nor body lipid content (Table 4).

Effect of YM aqueous extract on blood lipid and fatty acid profile

Table 5 presents the blood lipid profile of rats after four weeks of YM intervention. Animals fed on the HFD presented significantly reduced serum total cholesterol and TAG concentrations after YM supplementation ($p < 0.05$). The serum HDL-c was significantly lower in the HFD+YM, compared to the CON+YM group. Non-HDL levels differed ($p = 0.02$) among the groups. However, plasma total FFA levels were similar in the groups. With regard to plasma fatty acid composition (Table 6), HFD intake increased the percentage of stearic acid ($p < 0.05$), although there was no effect of YM on the plasma fatty acid profile.

Effect of YM aqueous extract on insulin sensitivity

As shown in Table 5, YM supplementation did not change fasting glucose and insulin concentrations, nor HOMA-IR and QUICKI values. The oGTT (Fig 4A) demonstrated that HFD impaired glucose tolerance ($p < 0.05$) at 30 (CON+YM x HFD+YM) and 60 minutes (CON x HFD) and that supplementation with YM did not improve this glycemic response. The ipITT demonstrated that animals submitted to the HFD and treated with YM presented lower blood glucose levels at 5 and 10 minutes ($p < 0.05$), as shown in Fig.4B.

Effect of YM aqueous extract on blood inflammatory markers

YM intervention did not reverse the serum CRP levels enhanced by HFD. Likewise, TNF- α and PAI-1 plasma levels did not differ among the groups (Table 5).

Effect of YM aqueous extract on serum AST and ALT activities and tissue morphology

There were no significant differences in the serum AST and ALT activities, neither in the AST:ALT ratio among the four groups (Table 5). The histological evaluation showed that only the liver tissue presented slight morphological changes, characterized by the presence of minimum microgoticular vacuolar degeneration in 33.3% of the livers analyzed and that this damage was not reversed by YM intervention (data not shown).

Effect of YM aqueous extract on the tissue inflammatory and insulin signaling pathway

Proteins involved in the inflammatory and insulin signaling pathway were evaluated in the liver, soleus muscle and periepididymal adipose tissue after YM treatment. In the liver of non-stimulated animals, YM significantly decreased the p-IKK- β :IKK- β ratio, increased the p-AKT:AKT ratio and reduced the phosphorylation of NF- κ B transcription factor in the HFD group ($p < 0.05$), as shown in Fig 5A, C and D. No changes were found in the expression or phosphorylation of inflammatory pathway and insulin signaling proteins in the muscle or in adipose tissue (data not shown).

Discussion

Ilex paraguariensis contains a high quantity of bioactive compounds with potential beneficial effects on health and may protect against chronic diseases, such as obesity and type 2 diabetes mellitus.⁵ In this study, chronic consumption of YM aqueous extract was found to reduce body weight gain in rats fed on a HFD without affecting food and energy intake. This weight reduction could be attributed to different compounds present in YM. It has been proposed that caffeine, the main methylxanthine present in mate, stimulates the sympathetic nervous system and promotes the release of catecholamines, which in turn increases thermogenesis and lipolysis.³³ Likewise, saponin and phenolic compounds have been suggested to exhibit body weight and fat reduction properties in rodents.^{34,35} A possible mechanism for this is the inhibition of adipogenesis by these compounds. In 3T3-L1 preadipocyte cultures, rutin, chlorogenic acid, matesaponin 4 and ursolic acid were found to be the main compounds of this inhibitory effect, suppressing the expression of important regulatory genes related to adipogenesis, such as the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- γ 2 and CACAAT/enhancer binding proteins (C/EBP)- α .⁹

In this experiment, high-fat feeding did not influence body adiposity, partly because the food intake was isocaloric among groups. In some studies in which animals have been induced to obesity, the body weight and fat mass were reduced after YM supplementation.^{20,36} An *Ilex paraguariensis* supplemented diet, offered for 60 days, decreased body weight gain and visceral adiposity in *Sprague-Dawley* rats. Fat mass reduction could be related to the enhanced fatty acid β -oxidation induced by the AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation in visceral fat.²⁰ Furthermore, it was suggested that the YM aqueous extract could also reduce body weight gain and epididymal fat mass in diet-induced obese mice. The possible mechanism for this effect was proposed to be the influence of YM treatment on the induction of whole body energy expenditure, since the expressions of genes implicated in thermogenesis, such as PPAR- γ coactivator (PGC)-1 α

and uncoupling protein (UCP)-1, were upregulated in the brown adipose tissue of obese mice.³⁶

Our data also showed that YM supplementation improves the serum lipid profile in rats fed on a HFD. Similar results were demonstrated in obese mice treated with YM for 8 weeks. Mice supplemented with 1 and 2 g/kg/day of YM extract presented decreased serum triglyceride, total cholesterol and LDL-c levels.¹¹ The reduction in serum total cholesterol levels depends on the ability of YM to block cholesterol absorption in the small intestine and/or inhibit hepatic cholesterol synthesis. It was suggested that mate tea reduces dietary fat absorption in the small intestine by inhibiting pancreatic lipase activity.¹¹ The hypolipidemic effect of mate tea has also been attributed to saponins, which form complexes with cholic acid *in vitro* by inhibiting the intestinal absorption of cholesterol.^{37,38,39} In addition, the catechins and caffeine seem to suppress intestinal absorption of cholesterol by reducing the solubility of the micelles,^{40,41} while quercetin may increase cholesterol excretion in the faeces.⁴² On the other hand, hepatic cholesterol synthesis can be inhibited by caffeic acid, since the activity of the enzyme acyl-CoA cholesterol acyltransferase in the liver of mice fed with hypercholesterolemic diet is decreased.^{40,41} Thus, the metabolic effects of YM could be attributed to various bioactive compounds that may act synergistically to suppress body weight gain and improve the serum lipid profile.

The intake of YM has been reported to improve glucose metabolism in animal models.^{10,43} One of the hypotheses proposed to explain this improvement is the inhibition of enzyme glucose-6-phosphate translocase by the chlorogenic acid present in YM, decreasing hepatic glucose production and, thereby, blood glucose levels.⁴⁴ Furthermore, prolonged YM ingestion could regulate glucose absorption by decreasing the transporter protein sodium/glucose co-transporter (SGLT)-1, the main glucose cotransporter in the small intestine.⁴⁵ In our study, the YM aqueous extract did not change fasting glucose and insulin levels, HOMA-IR and QUICKI values nor improve glucose tolerance in oGTT. However, animals submitted to the HFD and treated with YM presented lower blood glucose levels at 5 and 10 minutes during ipITT. These results suggest that, after acute insulin injection, YM-treated rats showed an increased glucose uptake capacity. To better understand this physiological process, we investigated the molecular mechanism underlying insulin signaling in the liver, soleus muscle and periepididymal adipose tissue.

The state of insulin resistance can be triggered by two main stimuli; proinflammatory cytokines and intracellular fatty acids. Both stimuli may act through common pathways to block the action of insulin. Such pathways involve the phosphorylation of members of the IRS family on specific serine residues, which are mediated by the activation of a number of protein kinases.⁴⁶ JNK and IKK- β are critical regulators of insulin action and interference in their activity can improve/impair insulin signaling in animal models of obesity.⁴⁷ In the present study, YM intervention increased the p-AKT:AKT ratio, where AKT is a downstream protein in the insulin pathway, and decreased the p-IKK- β :IKK- β ratio in the liver of pre-stimulated rats fed on a HFD, indicating an improvement in insulin signaling, possibly regulated by IKK- β , although IRS-1 serine phosphorylation and TNF- α and FFA plasma concentrations were not changed by YM intake. It appears that other proteins, such as the rictor-mammalian target of rapamycin (mTOR) complex could act directly by phosphorylating AKT at ser473 residue, stimulating glucose uptake.⁴⁸

The improvement in insulin signaling could be explained by the presence of phenolic compounds in *I. paraguariensis*. The hydroxycinnamic acid family, which also involves chlorogenic and caffeic acids are predominant in YM, fruits, vegetables, grains and coffee.^{5,49} Cho et al. (2010)³⁴ investigated the effect of caffeic and chlorogenic acid supplementation (0.02g/kg diet) in mice fed on a HFD (37% calories from fat) for 8 weeks, but in contrast to our results, authors found that the plasma FFA concentration and insulin levels were significantly lower in the supplemented group.

Little is known about the absorption of bioactive compounds and their anti-inflammatory roles. Animal studies have shown that, after the gastric infusion of isolated 5-CQA (chlorogenic acid), only a minor fraction is absorbed intact in the stomach⁵⁰; hydroxycinnamic acids can undergo enzymatic action in the intestinal mucosa and other tissues, such as the liver⁵¹, while phenolic compounds can form sulfated conjugates, glucuronidates and/or undergo methylation, by a mechanism similar to the recognition and detoxification of xenobiotics, with elimination by bile and urine.^{52,53} In rats, at one hour after oral administration of chlorogenic acid (700µmol/kg), residues were detected in the small intestine.⁴⁹

Konishi et al. (2006)⁵¹ determined the concentrations of phenolic acid in the portal vein and the abdominal artery of Wistar rats at 5 minutes after oral administration; the authors showed that the concentrations of intact chlorogenic acid in the portal vein and the abdominal artery were, 0.12 and 0.04µmol/L, respectively, also corresponding to the efficiency of gastric absorption as determined by plasma concentrations. In humans with ileostomy, absorption varied from 33% from chlorogenic acid (1,000 mg consumed) to 95% for caffeic acid (500 mg consumed).⁵⁴

At the molecular level, the activation of IKK-β also induces proinflammatory gene expression via activation of the NF-κB transcription factor.⁵⁵ As expected, hepatic NF-κB (p65) phosphorylation was reduced in rats fed on a HFD+YM, suggesting that YM has a modulatory role in the inflammatory response, via the NF-κB pathway. In accordance with our results, Arçari et al. (2011) demonstrated that YM intake for 8 weeks, at the same dose (1g/kg/day), restored insulin signaling in the liver and muscle and improved the hepatic inflammatory response of high-fat obese mice.¹⁰ The anti-inflammatory effect of YM was also demonstrated in other tissues. In the hypothalamus, YM supplementation blunted the proinflammatory effects of HFD in rats, reducing hypothalamic IKK phosphorylation and NF-κB p65 expression,⁵⁶ while in the adipose tissue, YM diminished proinflammatory adipokines gene expression in obese mice at the transcriptional level.³⁶ Among the bioactive compounds involved in this mechanism, quercetin and saponin were found to have potent anti-inflammatory effects *in vitro* via the suppression of the NF-κB pathway, the reduction of the inflammatory mediators, nitric oxide and prostaglandin E₂, and inhibition of the proinflammatory cytokine, IL-1β.⁵⁷ In addition, dicaffeoylquinic acids extracted from mate leaves have been reported to inhibit nuclear translocation of NF-κB in macrophages,⁵⁸ suggesting a modulation of inflammation by these compounds.

In our experimental model, YM aqueous extract did not modulate the inflammatory and insulin pathway in the muscle and adipose tissue, possibly due to the bioavailability of compounds and their tissue distribution. After the chronic intake of hydrolyzed hydroethanolic extract of YM, caffeic acids were reported to be detected in the liver, but not in the skin and brain.⁵⁹ Likewise, after 4 hours of a single oral dose of grape pomace extract (1g/kg body weight), anthocyanins and their metabolites were detected in the liver, but not in the brain, aorta vein and adipose tissue, suggesting that compounds are differently distributed and produce distinct effects in different tissues.⁶⁰ Despite these considerations, it is important to note that HFD did not induce inflammation and insulin resistance in the skeletal muscle and in the adipose tissue, which may also explain our results.

Conclusions

The administration of YM in rats that were fed on a HFD reduced body weight gain and improved the lipid profile. Additionally, we demonstrated that YM has a modulatory effect on the NF-κB pathway and AKT expression in rats fed on an isocaloric HFD. These

results suggest a beneficial role of YM in improving metabolic dysfunctions induced by HFD intake.

Acknowledgements

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2009/54395-0). T.M.M.F., P.S.J. and M.Y. were supported by a fellowship from FAPESP (2010/14609-9, 2009/12790-0 and 2010/14164-7). The authors thank Ivanir S.O Pires and Mariana C. Ferreira for general technical assistance. There are no conflicts of interest to declare.

References

- 1 C. Capurso, A. Capurso. *Vascular Pharmacology*, 2012, 57, 91-97.
- 2 R. Buettner, J. Schölmerich, L. C. Bollheimer, *Obesity (Silver Spring)*, 2007, Apr;15(4), 798-808.
- 3 M. F. Gregor, G. S. Hotamisligil, *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, 29:415-45, Review.
- 4 S.N. Vallerie, G.S. Hotamisligil *Sci. Transl. Med.*, 2010, Dec 1;2(60), 60rv5, Review.
- 5 D. H. M. Bastos, D. M. Oliveira, R. L. T. Matsumoto, P. O. Carvalho, M. L. Ribeiro, *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2007, V. 1, p. 37-46.
- 6 C. Anesini, S. Turner, L. Cogoi, R. Filip, *Food Science and Technology*, 2012, 45, 299-304.
- 7 A. Gugliucci, D. H. Bastos, J. Schulze, M. F. Souza, *Fitoterapia*, 2009, Sep, 80(6), 339-44.
- 8 R. D. Silva, A. L. Bueno, C. W. Gallon, L. F. Gomes, S. Kaiser, C. Pavei, G. G. Ortega, L. C. Kucharski, M. P. Jahn, *Fitoterapia*, 2010, Sep, 82(6), 818-26.
- 9 G. Gosmann, A. G. Barlette, T. Dhameer, D. P. Arçari, J. C. Santos, E. R. de Camargo, S. Acedo, A. Gambero, S. C. Gnoatto, M. L. Ribeiro, *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2012, Jun, 67(2), 156-61.
- 10 D. P. Arçari, W. Jr. Bartchewsky, T. W. dos Santos, K. A. Oliveira, C. C. DeOliveira, E. M. Gotardo, J. Jr. Pedrazzoli, A. Gambero, L. F. Ferraz, P de O. Carvalho, M. L. Ribeiro, *Mol. Cell Endocrinol.*, 2011, Mar 30, 335(2), 110-5.
- 11 F. Martins, T. M. Noso, V. B. Porto, A. Curiel, A. Gambero, D. H. M. Bastos, M. L. Ribeiro, P. O. Carvalho, *Obesity*, 2009, 18, 42-7.
- 12 G. Schinella, J.C. Fantinelli, S.M. Mosca. *Clinical Nutrition*, 2005, 24, 360-366.
- 13 G. M. E. Hussein, H. Matsuda, S. Nakamura, M. Hamao, T. Akiyama, K. Tamura, M. Yoshikawa. *Biol. Pharm. Bull.* 2011, 34(12), 1849-1855.
- 14 Y. R. Kang, H. Y. Lee, J. H. Kim, D. I. Moon, M. Y. Seo, S. H. Park, K. H. Choi, C. R. Kim, S. H. Kim, J. H. Oh, S. W. Cho, S. Y. Kim, M. G. Kim, S. W. Chae, O. Kim, H.G. Oh, *Lab. Anim. Res.*, 2012, Mar, 28(1), 23-9.
- 15 P. G. Reeves, F. H. Nielsen, G. C. Jr. Fahey, *J. Nutr.*, 1993, Nov, 123(11), 1939-51.
- 16 D. L. Tallman, C. G. Taylor, *J. Nutr. Biochem.*, 2003, 14(1), 17-23.
- 17 E. Kishino, T. Ito, K. Fujita, Y. Kiuchi Y, *J. Nutr.*, 2006, 136(2), 433-9.
- 18 W. Jobgen, C. J. Meininger, S. C. Jobgen, P. Li, M. J. Lee, S. B. Smith, T. E. Spencer, S. K. Fried, G. Wu, *J. Nutr.*, 2009, 139(2), 230-7.
- 19 G. M. Safwat, S. Pisanò, E. D'Amore, G. Borioni, M. Napolitano, A. A. Kamal, P. Ballanti, K. M. Botham, E. Bravo, *Nutrition*, 2009, Nov-Dec, 25(11-12), 1157-68.
- 20 J. Pang, Y. Choi, T. Park, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, Aug 15, 476(2), 178-85.

- 21 D. H. M. Bastos, L. A. Saldanha, R. R. Catharino, A. C. Sawaya, I. B. Cunha, P. O. Carvalho, *Molecules*, 2007, 12, 423-32.
- 22 R. Jaiswal, T. Sovdat, F. Vivan, N. Kuhnert, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, May 12, 58(9), 5471-84.
- 23 B. T. Bikman, T. L. Woodlief, R. C. Noland, S. L. Britton, L. G. Koch, R. M. Lust, G. L. Dohm, R. N. Cortright, *Int. J. Sports. Med.*, 2009, 30(9), 631-5.
- 24 N. Kubota, T. Kubota, S. Itoh, H. Kumagai, H. Kozono, I. Takamoto, T. Mineyama, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Ohsugi, T. Sasako, M. Moroi, K. Sugi, S. Kakuta, Y. Iwakura, T. Noda, S. Ohnishi, R. Nagai, K. Tobe, Y. Terauchi, K. Ueki, T. Kadowaki, *Cell Metab.*, 2008, 8(1), 49-64.
- 25 N. Shirai, H. Suzuki, S. Wada, *Anal Biochem*, 2005, Aug 1, 343(1), 48-53.
- 26 E. Bonora, P. Moghetti, C. Zancanaro, M. Gigolini, M. Querena, V. Cacciatori, A. Corgnati, M. Muggeo, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1989, 68, 374-8.
- 27 E. Bonora, V. Manicardi, I. Zavaroni, C. Coscelli, U. Butturini, *Diabetes Metab.*, 1987, 13, 116-121.
- 28 D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, R. C. Turner, *Diabetologia*, 1985, 28(7), 412-9.
- 29 A. Katz, S. S. Nambi, K. Mather, A. D. Baron, D. A. Follmann, G. Sullivan, M. J. Quon, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, 85, 2402-10.
- 30 M. M. Rogero, P. Borelli, M. A. Vinolo, R. A. Fock, I. S. Pires, J. Tirapegui, *Clin. Nutr.*, 2008, 27, 386-97.
- 31 J. Michalany, *AMB Rev. Assoc. Med. Bras.*, 1979, 25(1), 44-6.
- 32 A. G. E. Pearse, Little, Brown, Boston 1968.
- 33 K. Kobayashi-Hattori, A. Mogi, Y. Matsumoto, T. Takita, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, 69, 2219-23.
- 34 A. S. Cho, S. M. Jeon, M. J. Kim, J. Yeo, K. I. Seo, M. S. Choi, M. K. Lee, *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48, 937-43.
- 35 P. E. Resende, S. G. Verza, S. Kaiser, L. F. Gomes, L. C. Kucharski, G. G. Ortega, *J. Ethnopharmacol.*, 2012, 144, 735-40.
- 36 D. P. Arçari, W. Bartchewsky, T. W. dos Santos, K. A. Oliveira, A. Funck, J. Pedrazzoli, M. F. de Souza, M. J. Saad, D. H. Bastos, A. Gambero, P. O. Carvalho, M. L. Ribeiro, *Obesity (Silver Spring)*, 2009, Dec, 17(12), 2127-33.
- 37 F. Ferreira, A. Vázquez, C. Güntner, P. Moyna, *Phytotherapy Research*, 1997, v. 11, p. 79-81.
- 38 X. Hu, Z. Li, Y. Xue, J. Xu, C. Xue, J. Wang, Y. Wang, *J. Med. Food*, 2012, Oct, 15(10), 909-16.
- 39 H. Matsuda, M. Hamano, S. Nakamura, H. Kon'i, M. Murata, M. Yoshikawa, *Medicinal flowers. XXXIII. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2012, 60(5), 674-80.
- 40 I. Ikeda, Y. Imasato, E. Sasaki, M. Nakayama, H. Nagao, T. Takeo, F. Yayabe, M. Sugano, *Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats*, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1992, Jul 29, 1127(2), 141-6.
- 41 S. Wang, S. K. Noh, S. I. Koo, *J. Nutr.*, 2006, Nov, 136(11), 2791-6.
- 42 S. H. Bok, S. Y. Park, Y. B. Park, M. K. Lee, S. M. Jeon, T. S. Jeong, M. S. Choi, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2002 May, 72(3), 161-9.
- 43 D. F. Pereira, V. D. Kappel, L. H. Cazarolli, A. A. Boligon, M. L. Athayde, S. M. Guesser, E. L. da Silva, F. R. M. B. Silva, *Phytomedicine*, 2012, 19, 868-77.
- 44 H. Hemmerle, H. J. Burger, P. Below, G. Schubert, R. Rippel, P. W. Schindler, E. Paulus, A. W. Herling, *J. Med. Chem.*, 1997, Jan 17, 40(2), 137-45.
- 45 D. M. Oliveira, H. S. Freitas, M. F. F. Souza, D. P. Arçari, M. L. Ribeiro, P. O. Carvalho, D. H. M. Bastos, *J. Agric. Food. Chem.*, 2008, 56, 10527-32.
- 46 G. S. Hotamisligil, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2003, 27, S53-5.

- 47 G. Solinas, M. Karin, *FASEB J.*, 2010, 24, 2596-611.
- 48 D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini, *Science*, 2005, 307, 1098-101.
- 49 K. Azuma, K. Ippoushi, M. Nakayama, H. Ito, H. Higashio, J. Terao. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 5496-5500.
- 50 S. Lafay, A. Gil-Izquierdo, C. Manach, C. Morand, C. Besson, A. Scalbert. *J. Nutr.*, 2006, 136, 1192-1197.
- 51 Y. Konishi, Z. Zhao, M. Shimizu. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 7539-7543.
- 52 T.W.M. Crozier, A. Stalmach, M.E.J. Lean, A. Crozier. *Food Funct.*, 2012, 3, 30.
- 53 M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, R. Masella. *Ann Ist Super Sanità*, 2007, 43(4), 348-361.
- 54 M. R. Olthof, P.C.H. Hollman, M.B. Katan. *J. Nutr.*, 2001, 131, 66-71.
- 55 S. Vallabhapurapu, M. Karin, *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, 27, 693-733.
- 56 G. D. Pimentel, F. S. Lira, J. C. Rosa, A. V. Caris, F. Pinheiro, E. B. Ribeiro, C. M. O. do Nascimento, L. M. Oyama, *J. Nutr. Biochem.*, 2012.
- 57 S. Puangpraphant, E. G. Mejia, *J. Agric. Food. Chem.*, 2009, 57, 8873-83.
- 58 S. Puangpraphant, M. A. Berhow, K. Vermillion, G. Potts, E. G. Mejia, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, 55, 1509-22.
- 59 D. P. Rivelli, R. L. Almeida, C. D. Ropke, S. B. M. Barros, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 8901-8907.
- 60 A. Serra, A. Macià, M. P. Romero, C. Piñol, M. J. Motilva, *J. Chromatogr.*, 2011, 879, 1519-1528.

Table 1. Composition of experimental diets.

Ingredients	CON diet*	HFD
	g/1,000kJ	
Cornstarch	37.14	7.09
Sucrose	5.98	5.98
Casein	8.38	8.38
Soybean oil	2.39	2.39
Lard	0.00	13.25
Cellulose	2.99	2.99
Mineral mix	2.09	2.09
Vitamin mix	0.60	0.60
L-cystine	0.11	0.11
Choline bitartrate	0.15	0.15
Tertbutylhydroquinone	0.0005	0.0017

CON diet, control diet; HFD, high-fat diet.

*According to AIN-93M.¹⁵

Table 2. Fatty acid compositions (%) of the experimental diets and lard

Fatty acids		CON	HFD	Lard
C 14:0	Mirystic	0.81 ± 0.01	1.29 ± 0.03	1.49 ± 0.02
C 16:0	Palmitic	14.06 ± 0.03	23.25 ± 0.13	25.66 ± 0.75
C 18:0	Stearic	4.42 ± 0.01	12.01 ± 0.22	12.77 ± 0.82
C 18:1 c	Oleic	27.09 ± 0.03	40.07 ± 0.06	41.90 ± 1.86
C 18:1 t	Elaidic	ND	ND	ND
C 18:2 c n6	Linoleic	48.37 ± 0.07	21.88 ± 0.22	17.32 ± 0.24
C 18:3 n3	Linolenic	4.96 ± 0.01	1.48 ± 0.03	0.75 ± 0.03
C 18:3 n6	γ-linolenic	0.23 ± 0.00	ND	ND
C 20:5 n3	Eicosapentaenoic	0.06 ± 0.00	ND	ND
Total Saturated		19.29 ± 0.03	35.56 ± 0.20	39.92 ± 1.60
Total Monounsaturated		27.09 ± 0.03	40.07 ± 0.06	41.90 ± 1.86
Total Polyunsaturated		53.62 ± 0.06	23.37 ± 0.25	18.07 ± 0.27

Results are expressed as mean ± SD. ND, not detected.

Table 3– Identification and characterization of phenolic compounds present in mate tea and mean daily ingestion per animal

YM compounds	Peak ^a	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Product ion(s) (m/z)	Quantity (mg/g of dry extract) ^b	Mean daily intake (mg/animal) ^c	
						CON+YM	HFD+YM
3-caffeoylquinic acid	1	1.1	353	191, 179	17.1	8.67 ± 0.05	8.82 ± 0.04
Caffeoylquinic acid	2	1.7	353	191, 179	0.8	0.41 ± 0.00	0.41 ± 0.00
5-caffeoylquinic acid	3	2.2	353	191	27.3	13.84 ± 0.09	14.09 ± 0.06
4-caffeoylquinic acid	4	2.4	353	179	20.6	10.44 ± 0.07	10.63 ± 0.05
Caffeoylshikimic acid	5	4.5	335	160	1.9	0.96 ± 0.01	0.98 ± 0.00
Feruloylquinic acid	6	6.2	367	173	0.9	0.46 ± 0.00	0.46 ± 0.00
Caffeoylshikimic acid	7	6.4	335	161	1.4	0.71 ± 0.00	0.72 ± 0.00
Di-caffeoylquinic acid	8	9.4	515	353	7.2	3.65 ± 0.02	3.71 ± 0.02
Di-caffeoylquinic acid	9	9.6	515	353	9.3	4.71 ± 0.03	4.80 ± 0.02
Rutin	10	9.8	609	301	0.9	0.46 ± 0.00	0.46 ± 0.00
Di-caffeoylquinic acid	11	10.8	515	353	15.9	8.06 ± 0.05	8.20 ± 0.04
TOTAL					103.3	52.36 ± 0.71	53.30 ± 0.50

^a Refer to Figure 1A. ^b Mean of three replicates. ^c Values are expressed as the mean ± SD (standard deviation), n = 8-12 animals/group. CON+YM=control group supplemented with YM; HFD +YM=high-fat group supplemented with YM.

Fig 1. HPLC-DAD chromatogram of Yerba Mate phenolic compounds (A) ($\lambda = 324$ nm) and caffeine ($\lambda = 272$ nm) (B).

Fig 2. DAD spectra (λ 220 to 400 nm) of Yerba Mate phenolic compounds and caffeine

Fig 3. Total food intake (A), total energy intake (B) and body weight gain (C). Values are expressed as means $\pm$ SD (n=8-12/group). Bars without a common letter differ significantly ($p < 0.05$). CON=control group not supplemented; HFD= high-fat group not supplemented; CON+YM=control group supplemented with YM; HFD+YM=high-fat group supplemented with YM.

Table 4. Fat pads, tissue weight and body composition.

	CON	HFD	CON+YM	HFD+YM
Periepididymal pad (g/100g of animal)	2.7 $\pm$ 0.9	2.6 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 1.3	3.4 $\pm$ 0.5
Retroperitoneal pad (g/100g of animal)	2.5 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 0.3
Liver (g)	17.6 $\pm$ 1.5 ^a	20.3 $\pm$ 1.7 ^b	18.2 $\pm$ 1.2 ^{a,b}	18.1 $\pm$ 0.7 ^{a,b}
Water (g)	268.8 $\pm$ 53.0	261.8 $\pm$ 32.3	279.6 $\pm$ 37.9	260.5 $\pm$ 29.9
Lean mass (g)	416.1 $\pm$ 47.7	411.8 $\pm$ 39.8	426.5 $\pm$ 53.4	411.6 $\pm$ 28.1
Lipids (g)	100.1 $\pm$ 16.3	92.3 $\pm$ 24.9	84.5 $\pm$ 16.9	97.0 $\pm$ 7.2
Protein (g)	106.8 $\pm$ 31.7	111.9 $\pm$ 20.0	108.3 $\pm$ 30.9	113.2 $\pm$ 11.2
Ash (g)	22.4 $\pm$ 5.1	24.7 $\pm$ 4.15	21.4 $\pm$ 3.8	26.1 $\pm$ 3.1

Results are expressed as mean $\pm$ SD (n= 6/group). Groups without a common letter differ significantly ($p < 0.05$). CON=control group not supplemented; HFD= high-fat group not supplemented; CON+YM=control group supplemented with YM; HFD +YM=high-fat group supplemented with YM.

Table 5. Blood biomarkers.

Parameters	CON	HFD	CON+YM	HFD+YM
Glucose (mmol/L)	5.93 ± 0.64	5.37 ± 0.25	5.79 ± 0.80	5.65 ± 0.46
Insulin (μU/mL)	35.4 ± 12.1	27.1 ± 13.4	26.7 ± 15.7	28.4 ± 2.6
HOMA-IR	9.18 ± 3.01	6.47 ± 3.07	7.06 ± 4.40	7.13 ± 1.01
QUICKI	0.28 ± 0.13	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.004
Total cholesterol (mg/dL)	76.5 ± 11.3 ^{a,b}	91.5 ± 10.8 ^a	76.2 ± 7.5 ^b	72.5 ± 10.5 ^b
HDL-c (mg/dL)	23.8 ± 2.1 ^{a,b}	23.8 ± 2.1 ^{a,b}	25.3 ± 2.8 ^a	21.00 ± 1.8 ^b
Non HDL-c (mg/dL)	52.7 ± 9.2	67.8 ± 9.7	52.0 ± 6.4	56.0 ± 8.2
TAG (mg/dL)	94.8 ± 16.8 ^{a,b}	126.9 ± 23.7 ^a	100.5 ± 8.2 ^{a,b}	112.0 ± 20.1 ^b
Free fatty acids (nM/μL)	0.17 ± 0.14	0.23 ± 0.05	0.19 ± 0.09	0.10 ± 0.08
AST(U/L)	130.0 ± 10.6	138.0 ± 23.5	121.0 ± 30.4	143.0 ± 44.7
ALT (U/L)	37.0 ± 58.2	39.8 ± 4.4	43.0 ± 19.2	56.0 ± 28.5
AST:ALT (U/L)	3.51 ± 0.72	3.47 ± 0.56	2.81 ± 1.72	2.55 ± 1.46
TNF-α (pg/mL)	2.01 ± 0.47	1.84 ± 0.36	2.45 ± 0.97	1.75 ± 1.01
CRP (ng/mL)	783.0 ± 194.9 ^a	1151 ± 177.1 ^b	894.8 ± 134.4 ^{a,b}	1114 ± 259.8 ^{a,b}
PAI-1 (pg/mL)	166.8 ± 100.0	158.9 ± 82.1	124.6 ± 61.2	326.8 ± 348.9

Results are expressed as mean ± SD (n= 6/group). Groups without a common letter differ significantly (p<0.05). CON=control group not supplemented; HFD= high-fat group not supplemented; CON+YM=control group supplemented with YM; HFD+YM=high-fat group supplemented with YM.

Table 6. Plasma fatty acid composition (%).

Fatty Acids		COM	HFD	CON+YM	HFD+YM
C 10:0	Capric	0.15 ± 0.12	0.41 ± 0.08	ND	ND
C 12:0	Lauric	0.50 ± 0.08	0.59 ± 0.32	ND	0.55 ± 0.55
C 14:0	Mirystic	0.63 ± 0.10	0.60 ± 0.25	0.65 ± 0.20	0.94 ± 1.05
C 16:0	Palmitic	20.81 ± 1.18	17.83 ± 1.99	20.02 ± 0.93	13.23 ± 8.88
C 18:0	Stearic	8.13 ± 0.84 ^a	13.76 ± 2.33 ^b	8.65 ± 1.18 ^{a,b}	12.26 ± 3.76 ^{a,b}
C 18:1	Oleic	16.95 ± 1.65	17.55 ± 4.60	16.26 ± 3.33	14.29 ± 2.33
C 18:2	Linoleic	22.43 ± 2.61 ^a	17.23 ± 2.20 ^{a,b}	22.66 ± 1.82 ^{a,b}	15.55 ± 2.81 ^b
C 18:3 n3	Linolenic	1.21 ± 0.35	2.49 ± 0.17	1.10 ± 0.33	2.15 ± 2.29
C 20:4 n6	Aracdonic	22.72 ± 2.66	25.49 ± 6.04	25.03 ± 4.62	20.49 ± 6.18
C 20:5 n3	Eicosapentaenoic	ND	ND	ND	ND
C 22:6 n3	Docosahexaenoic	2.64 ± 1.33	1.63 ± 0.51	1.91 ± 0.26	1.26 ± 0.80
Total Saturated		30.22 ± 8.90	33.19 ± 8.48	29.32 ± 9.73	26.98 ± 6.94
Total Monounsaturated		16.95 ± 1.65	17.55 ± 4.60	16.26 ± 3.33	14.29 ± 2.33
Total Polyunsaturated		49.00 ± 10.93	46.84 ± 11.64	50.69 ± 12.93	39.45 ± 9.63

Results are expressed as means ± SD (n= 3-6/group). ND, not detected. Groups without a common letter differ significantly (p<0.05). CON=control group not supplemented; HFD=high-fat group not supplemented; CON+YM=control group supplemented with YM; HFD+YM=high-fat group supplemented with YM.

Fig 4. (A) Glycemic curve at times 0, 30, 60, 90 and 120 minutes for the oral glucose tolerance test (oGTT) and (B) glycemic curve at times 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 minutes for the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) in Wistar rats. Values are expressed as means ± SD (n=8-12/group). Bars without a common letter differ significantly (p<0.05). CON=control group not supplemented; HFD= high-fat group not supplemented; CON+YM=control group supplemented with YM; HFD +YM=high-fat group supplemented with YM. *CON+YM x HFD+YM, # CON x HFD and \$ HFD x HFD+YM.

Fig 5. Ratio of phospho IKK- β (Ser 180) to total IKK- β (A), ratio of phospho JNK (Tyr 185) to total JNK (B), phospho NF- κ B (Ser 536) (C), ratio of phospho AKT (Ser 473) to total AKT (D) and ratio of phospho IRS-1(Ser 307) to total IRS-1 (E) in the liver of *Wistar* rats at the 16th week of the experimental protocol. Values are expressed as mean $\pm$ SD (n=4-6/ group). AU=Arbitrary units. INS = insulin. Bars without a common letter differ significantly ($p < 0.05$). CON=control group not supplemented; HFD= high-fat group not supplemented; CON+YM=control group supplemented with YM; HFD+YM=high-fat group supplemented with YM.