UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

**Efeito do consumo isocalórico da ração
hiperlipídica e da administração da erva-mate
(*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de
proteínas envolvidas na via de sinalização da
insulina no músculo sóleo de ratos *Wistar***

Tatiane Mieko de Meneses Fujii

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde
Pública para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo
Rogero

São Paulo

2013

**Efeito do consumo isocalórico da ração
hiperlipídica e da administração da erva-mate
(*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de
proteínas envolvidas na via de sinalização da
insulina no músculo sóleo de ratos *Wistar***

Tatiane Mieko de Meneses Fujii

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde
Pública para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo
Rogerio

São Paulo

2013

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

*Bem-aventurado aquele que teme ao SENHOR e anda nos seus caminhos!
Pois comerás do trabalho de tuas mãos, feliz serás e te irá bem.
(Salmos 128:1-2)*

Dedicatória

*Aos meus pais, sinônimo de amor, de dedicação,
de lealdade, de respeito, de amizade e de virtude.*

Agradecimentos

Ao meu Pai Celestial, Deus todo poderoso, por ser quem És em minha vida.

Ao Senhor Jesus Cristo, pelo amor incondicional.

Ao Espírito Santo, por ser meu consolador, minha companhia diária, meu guia.

Aos meus pais, Dona Aleuda e Seu Mário, pelo amor, pela compreensão, pelo encorajamento e pela confiança.

Às minhas meninas, Kate e Molly, pela alegria que contagia, pelo amor e pela amizade.

À minha avó querida, Dona Geralda, pelo amor, pelo incentivo e pelo carinho.

À minha tia avó, Maria, pela amizade e pelo incentivo .

Aos meus tios e tias queridos, pelo amor, pela compreensão, pela amizade e pelo incentivo.

Aos meus primos e primas de coração, agradeço pelo amor e pela amizade.

Às minhas amadas crianças, Fê, Bia, Gaby e Daniel, agradeço por existirem em minha vida.

Às minhas amigas e irmãs na fé, Marli, Júlia, Dani, Dona Fátima, pela amizade e pelas orações.

Aos amigos, Maria do Carmo, Williana e Rogério, pela confiança e compreensão.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Moniquinha, Carol, Patty, Ivanir, Marina, Lu Carmo, Lu Nishimura, Mari Rezende, Rê, pela amizade, pela compreensão, pelo respeito e pela confiança.

Ao Prof. Marcelo Rogero, pelo exemplo de caráter como pessoa e como profissional. Agradeço pela oportunidade de ser sua aluna, pela orientação de todo o projeto, pela paciência nas correções e pela amizade.

Ao Prof. Júlio Tirapegui por abrir as portas do laboratório para realizarmos nossas análises.

Aos alunos e ex-alunos do laboratório de bioquímica da nutrição, Lucas, Léo, Emídio, João, Michele, Dai, Jaque, pela ajuda, pela compreensão e pela amizade.

À Profa. Inar Castro, à técnica Luciene e à aluna Paty pela ajuda na análise do perfil de AG.

Aos funcionários do bloco 14, Lurdinha, Joana e demais, por serem sempre prestativos.

À Profa. Primavera Borelli e ao Prof. Ricardo Fock por abrirem as portas do laboratório para realizarmos as análises.

Aos alunos e ex-alunos do laboratório de hematologia, Grazy, Amanda, Karina, Jaque, Fabi, pela atenção, pela ajuda e pela compreensão conosco.

À técnica de laboratório, Mariana Cristina Ferreira da Silva, pela ajuda e pela compreensão.

À Profa. Deborah Bastos por ter sido responsável por mim perante a FAPESP.

À Daniela de Oliveira, pela ajuda na análise da EM.

Às professoras Ruth Yamada e Roberta de Medeiros, pela amizade e pelo incentivo desde a graduação.

À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

FUJII, TMM. Efeito do consumo isocalórico da ração hiperlipídica e da administração da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no músculo sóleo de ratos *Wistar*. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2013.

RESUMO

Introdução: A ingestão de lipídios saturados está relacionada ao aumento da adiposidade, seja em humanos ou em modelos animais. O excesso de gordura corporal promove quadro de inflamação crônica e de baixa intensidade, condição esta associada à alteração no metabolismo da glicose, à resistência à ação da insulina e ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). No tecido muscular, o aumento da atividade das proteínas quinases designadas quinase do inibidor do fator nuclear κ B (IKK)- β e a c-Jun N-terminal quinase (JNK) contribui para o quadro de hiperglicemia por meio da redução da ativação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e da proteína quinase B (Akt/PKB). A administração da erva-mate (EM), que possui compostos bioativos (CBA) com atividade anti-inflamatória, pode atuar na redução do processo inflamatório induzido pela elevada ingestão de ácidos graxos saturados. **Objetivo:** Investigar os efeitos do consumo isocalórico da ração hiperlipídica e da administração da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no músculo sóleo de ratos *Wistar*. **Métodos:** O delineamento experimental foi realizado em 2 momentos. Inicialmente, 36 ratos *Wistar*, machos foram distribuídos em dois grupos, os quais ingeriram ração controle (CON) (n= 18) ou hiperlipídica (HL) (n= 18), durante 12 semanas, caracterizando os grupos *baseline* CONBL e HLBL, respectivamente. Após esse período, 6 animais de cada grupo sofreram eutanásia, enquanto o restante dos animais de cada grupo foi distribuído em grupos que receberam, ou não, por gavagem, o extrato aquoso de erva-mate (EAEM) na dose de 1 g/kg de massa corporal, durante 4

semanas. Os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e ao teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) na primeira, décima segunda e décima sexta semana do protocolo experimental. A partir do sangue, foram determinadas as concentrações de glicose, insulina, ácidos graxos não esterificados totais, adiponectina e proteína C reativa. A composição corporal foi avaliada por meio da carcaça dos animais. A partir do músculo sóleo, foi avaliada a expressão das proteínas JNK, IKK- β , AKT e IRS-1, nas suas formas totais e fosforiladas, e do fator de transcrição nuclear NF- κ B, na sua forma fosforilada. Também foi realizada a avaliação histológica nesse tecido. **Resultados:** A ingestão isocalórica da ração HL não promoveu aumento de adiposidade, contudo, o grupo HLBL apresentou maior peso do coxim retroperitoneal em relação ao CONBL ($p<0,05$). O grupo HLBL mostrou hiperglicemia, resistência à ação da insulina, aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol não-HDL e de proteína C reativa em comparação ao grupo CONBL ($p<0,05$). No músculo sóleo, verificou-se aumento da razão fosfo:total IKK- β no grupo HLBL em comparação ao CONBL ($p=0,02$). A administração do EAEM promoveu diminuição de 1% ($p<0,05$) do ganho de peso corporal do grupo HL suplementado (HL+EM) em relação ao HL não suplementado, o qual apresentou 2% de ganho de peso quando comparado ao HL+EM. Nos tempos de 5 e de 10 minutos após a carga insulínica, as glicemias dos animais HL+EM foram menores que as do grupo HL ($p<0,05$). **Conclusão:** A ingestão isocalórica da ração HL promoveu alterações metabólicas importantes, sugerindo possível ativação do processo inflamatório inclusive no tecido muscular. A administração da EM reduziu o ganho de peso, melhorou a sensibilidade à insulina e o perfil lipídico, contribuindo para a redução do risco cardiovascular.

Descritores: Obesidade; Inflamação; Músculo Esquelético; Resistência à Insulina; Nutrigenômica; Erva-Mate.

FUJII, TMM. Efeito do consumo isocalórico da ração hiperlipídica e da administração da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no músculo sóleo de ratos *Wistar*./ Effect of isocaloric high-fat diet consumption and the yerba mate (*Ilex paraguariensis*) administration on expression of proteins involved in the insulin signaling pathway in soleus muscle of *Wistar* rats. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2013.

ABSTRACT

Introduction: The ingestion of saturated lipids is related to increase adiposity in humans or in animal models. The excess of fat improve the chronic and low grade of inflammation, condition associated with glucose metabolism disorders, insulin resistance and development of non-communicable diseases (NCD). In muscle tissue, the increase of proteins kinases activities, such as kinase inhibitor of κB (IKK)- β and c-Jun N terminal kinase (JNK) contributes for hyperglycemia thought the reduction of insulin receptor substrate (IRS)-1 and protein kinase B (AKT/PKB) activation. The administration of yerba mate (YM), which contain bioactive compounds with anti-inflammatory activity, can act on the reduction of inflammatory process induced by saturated fatty acid consumption. **Objective:** To investigate the effects of isocaloric high-fat diet consumption and Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) administration on the expression of proteins involved in the insulin signaling pathway in *Wistar* rats *soleus* muscle. **Methods:** The experimental design was accomplished in 2 moments. Firstly, 36 *Wistar* rats, male, were distributed into two groups that ingested control (CON) (n=18) or high-fat (HF) (n=18) diets, during 12 weeks, characterizing *baseline* groups CONBL and HFBL, respectively. After this period, 6 animals from each group were euthanized, while the others were distributed in groups which received, or not, by oral gavage, yerba mate aqueous extract (YMAE) dose of 1 g/Kg of body weight), for 4 weeks. The rats were submitted to the oral glucose tolerance test (oGTT) and to the

intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) on the first, twelfth and sixteenth week of experimental protocol. From the blood, were determined the concentrations of glucose, insulin, free fatty acids, adiponectin and C reactive protein. The body composition was available from the animal's carcass. From the soleus muscle, it was available the protein expression of JNK, IKK- β , AKT and IRS-1, in total and phosphorylated forms and NF- κ B at the phosphorylated form. Also, it was realized the histology analysis in this tissue. **Results:** The ingestion of HF diet did not increase adiposity, however, the HFBL group presented retroperitoneal pad weight higher than CONBL ($p<0,05$). The HFBL group showed hyperglycemia, insulin resistance and elevated plasmatic concentrations of total cholesterol, HDL non-cholesterol and C reactive protein compared to CONBL group ($p<0,05$). On the *soleus* muscle, verified increase of phospho:total IKK- β ratio in HFBL group in relation to CONBL ($p=0,02$). The supplementation with AEYM diminished 1% ($p<0,05$) of weight gain in HL supplemented group in relation to HF not supplemented that presented 2% of weight gain when compared to HF+YM. In times of 5 and 10 minutes after the insulin load, the glycemia of HF+YM were lesser than the HF group ($p<0,05$). **Conclusion:** The isocaloric high-fat diet intake promoted important metabolic changes, suggesting a possible activation of inflammatory process including in skeletal muscle. The administration of YM reduced the weight gain, improved the insulin sensibility and the lipid profile, contributing for the reduction of cardiovascular risk..

Descriptors: Saturated fatty acids; Inflammation; Skeletal Muscle; Insulin Resistance; Yerba Mate.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	22
1.1.1 Consumo alimentar, excesso de peso e obesidade	22
1.1.2 Inflamação, tolerância à glicose e resistência à insulina	24
1.1.3 Via de sinalização da insulina e a resposta inflamatória no tecido muscular	27
1.1.4 Erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	30
1.1.5 Erva-mate e a resposta inflamatória	33
2. JUSTIFICATIVA	35
3. HIPÓTESE DO ESTUDO	36
4. OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5. MÉTODOS	38
5.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	38
5.1.1 Animais	38
5.1.2 Ração	38
5.1.3 Composição dos ácidos graxos das rações e da banha de porco	40
5.1.4 Grupos experimentais	40
5.1.5 Preparo e administração da erva-mate	41
5.1.6 Quantificação e identificação de compostos fenólicos	

e de cafeína presentes no extrato aquoso de erva-mate liofilizado	42
5.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	42
5.3 TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E RESISTÊNCIA À INSULINA	46
5.3.1 Teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)	46
5.3.2 Determinação do Índice HOMA	47
5.3.3 Determinação do Índice QUICK	47
5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	48
5.4.1 Determinação da concentração sérica de glicose	48
5.4.2 Determinação das concentrações séricas de insulina e de adiponectina	48
5.4.3 Determinação da concentração sérica de proteína C reativa	48
5.4.4 Determinação das concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total, HDL- c e colesterol não-HDL	48
5.5 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS PLASMÁTICOS	49
5.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARÇAÇA	49
5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MUSCULARES ENVOLVIDAS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA	50
5.7.1 Determinação da concentração de proteína muscular	52
5.7.2 <i>Western Blotting</i>	52
5.7.2.1 Preparo do gel de poliacrilamida	52
5.7.2.2 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE	54
5.7.2.3 Empilhamento, corrida e transferência das proteínas	54
5.7.2.4 Sondagens das proteínas com anticorpos	56

5.7.2.5 Revelação com sistema quimioluminescente	57
5.7.2.6 Normalização da proteína de interesse pela β -actina	57
5.7.2.7 Quantificação das proteínas de interesse	58
5.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO MUSCULAR	58
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
6. RESULTADOS	60
6.1 RESULTADOS REFERENTES À 1ª SEMANA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL	60
6.2 RESULTADOS REFERENTES À 12ª SEMANA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL	64
6.3 RESULTADOS REFERENTES À 16ª SEMANA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL	76
6.3.1 Caracterização dos compostos bioativos do extrato aquoso da erva-mate	76
6.3.2. Avaliação do efeito do extrato aquoso de erva-mate	79
7. DISCUSSÃO	93
7.1 EFEITO DA INGESTÃO ISOCALÓRICA DA RAÇÃO HL	93
7.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (EAEM)	99
8. CONCLUSÃO	106

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
--	------------

ANEXOS

ANEXO 1- CURRÍCULO <i>LATTES</i> TATIANE MIEKO M FUJII	133
--	-----

ANEXO 2 - CURRÍCULO <i>LATTES</i> MARCELO MACEDO ROGERO	134
---	-----

Lista de Figuras

Figura 1-	Delineamento experimental referente ao momento 1	43
Figura 2-	Delineamento experimental referente ao momento 2	45
Figura 3 -	Esquema de montagem do sistema úmido para etapa de transferência	55
Figura 4 -	Distribuição dos animais nos grupos experimentais na primeira semana do protocolo experimental	62
Figura 5 -	AUC do teste de tolerância oral a glicose - oGTT e KiTT do teste de tolerância intraperitoneal a insulina- ipITT de ratos <i>Wistar</i> no início do protocolo experimental	63
Figura 6 -	Curva de peso e ganho de peso corporal de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental	64
Figura 7 -	Consumo médio semanal, total de ração em gramas, consumo médio em calorias e total de ração em calorias de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental	65
Figura 8 -	Curva de glicemia do oGTT e AUC de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) e submetidos ao teste de tolerância oral a glicose	66
Figura 9 -	Curva glicêmica do ipITT e KiTT de ratos <i>Wistar</i> alimentados <i>ad libitum</i> com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) e submetidos ao teste intraperitoneal	

de tolerância à insulina67

Figura 10 - Expressão da IKK- β total e IKK- β fosforilada (Ser 180) e razão da IKK- β fosforilada pela IKK- β total no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental71

Figura 11 - Expressão da JNK total JNK fosforilada (Tyr 185) e razão da JNK fosforilada pela JNK total no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental72

Figura 12 - Expressão da AKT total e AKT fosforilada (Ser 473) e razão da AKT fosforilada pela AKT total no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental73

Figura 13 - Expressão da IRS-1 total e IRS-1 fosforilada (Ser 307) e razão da IRS-1 fosforilada pela IRS-1 total no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental74

Figura 14 - Expressão do NF- κ B fosforilado (Ser 536) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental75

Figura 15 - Fotomicrografia de corte histológico do músculo sóleo75

Figura 16 - Cromatograma UPLC-DAD dos compostos fenólicos (λ =324 nm) e cafeína (λ = 272 nm) presentes na erva-mate.....76

Figura 17 - Spectro DAD (λ 220 a 400nm) dos compostos fenólicos e da cafeína presentes na erva-mate77

Figura 18 - Curva de peso e percentual de ganho de peso de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental79

Figura 19 - Consumo médio semanal, total de ração em gramas, consumo médio em calorias e total de ração em calorias de ratos <i>Wistar</i> entre a 13 ^a . e a 16 ^a semana do protocolo experimental	80
Figura 20 - Curva de glicemia e AUC de ratos <i>Wistar</i> na 16 ^a semana do protocolo experimental e submetidos ao teste de tolerância oral a glicose	82
Figura 21 - Curva de glicemia e KiTT de ratos <i>Wistar</i> na 16 ^a semana do protocolo experimental e submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal a insulina	83
Figura 22 - Expressão da IKK- β total e IKK- β fosforilada (Ser 180) e razão da IKK- β fosforilada pela IKK- β total no músculo sóleo de ratos <i>Wistar</i> na 16 ^a semana do protocolo experimental	88
Figura 23 - Expressão da JNK total e JNK fosforilada (Tyr 185) e razão da JNK fosforilada pela JNK total no músculo sóleo de ratos <i>Wistar</i> na 16 ^a semana do protocolo experimental	89
Figura 24 - Expressão da AKT total e AKT fosforilada (Ser 473) e razão da AKT fosforilada pela AKT total no músculo sóleo de ratos <i>Wistar</i> na 16 ^a semana do protocolo experimental	90
Figura 25 - Expressão da IRS-1 total e IRS-1 fosforilada e razão da IRS-1 fosforilada pela IRS-1 total no músculo sóleo de ratos <i>Wistar</i> na 12 ^a semana do protocolo experimental	91
Figura 26 - Expressão do NF- κ B fosforilado (Ser 536) no músculo sóleo de ratos <i>Wistar</i> na 12 ^a semana do protocolo experimental	92

Lista de Quadros

Quadro 1 - Descrição dos reagentes do tampão de extração de proteínas do músculo	51
Quadro 2 - Descrição dos reagentes utilizados no tampão de extração de proteínas (adaptado para IRS-1)	52
Quadro 3 - Descrição dos reagentes utilizados nas soluções A, B e C que compõe os géis de poliacrilamida	53
Quadro 4 - Descrição dos reagentes utilizados na preparação dos géis	53
Quadro 5 - Descrição dos reagentes utilizados nas soluções do tampão de corrida e de transferência	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição das rações experimentais segundo valor energético	39
Tabela 2 - Diluições dos anticoporcoss.....	57
Tabela 3 - Composição dos ácidos graxos (%) das rações experimentais e da banha de porco	61
Tabela 4 - Peso relativo dos coxins adiposos e composição corporal dos animais	68
Tabela 5 - Relação dos parâmetros sanguíneos analisados	69
Tabela 6 - Composição de ácidos graxos plasmáticos (%) de ratos <i>Wistar</i> na décima segunda semana do protocolo experimental	69
Tabela 7 - Identificação e caracterização dos compostos fenólicos presentes na erva-mate e a ingestão média diária por animal	78
Tabela 8 - Peso relativo dos coxins adiposos e composição corporal dos animais	84
Tabela 9 - Relação dos parâmetros sanguíneos analisados	85
Tabela 10 - Composição plasmática de ácidos graxos (%)	86

LISTA DE SIGLAS

4,5-DQC	4,5-ácido dicafeoilquínico
AG	Ácidos graxos
AGE	<i>Advanced glycation end products</i>
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
AGS	Ácidos graxos saturados
AGL	Ácidos graxos livres
AKT/PKB	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por 5' AMP
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
BCA	Ácido bicinconínico
CBA	Composto(s) bioativo(s) do(s) alimento(s)
CLUE	Cromatografia líquida de ultra-eficiência
CON	Controle
CONBL	Grupo controle <i>baseline</i>
CON+EM	Grupo controle suplementado com EAEM
COX	Ciclooxygenase
CQA	Ácido clorogênico
DAD	Arranjos diodos
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DHA	Ácido docosaexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EM	Erva-mate
EAEM	Extrato aquoso de erva-mate
GLUT-4	Transportador 4 de glicose
GS3K	Quinase 3 da glicogênio sintase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HL	Hiperlipídica

HLBL	Grupo hiperlipídico <i>baseline</i>
HL+EM	Grupo hiperlipídico suplementado com EAEM
HOMA	<i>Homeostasis model assessment</i>
I κ B	Inibidor do NF- κ B
IKK- β	Quinase do inibidor do NF- κ B
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ipITT	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinase
Kcal	Kilocaloria
KiTT	Constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LHS	Lipase hormônio sensível
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína 1 quimiotática para monócitos
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
oGTT	Teste oral de tolerância à glicose
PAI-1	Inibidor 1 do ativador do plasminogênio
PDK-1	Quinase fosfatidilinositol dependente
PGC1- α	Proteína 1 coativadora de PPAR
PH	Domínio homólogo <i>Pleckstrin</i>
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase
PIP2	4,5 fosfatidilinositol bifosfato
PKC	Proteína quinase C

PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas
PTB	Domínio de ligação de fosfotirosina
QUICK	<i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i>
RE	Retículo endoplasmático
SLTG-1	Transportador 1 de glicose dependente de sódio
TAG	Triacilgliceróis
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

1. INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Consumo alimentar, excesso de peso e obesidade

O padrão de dieta ocidental é caracterizado pelo aumento do consumo de alimentos com alto teor de lipídios saturados, colesterol, açúcar e sódio, em detrimento do consumo de grãos integrais, frutas e hortaliças (MONTEIRO et al., 2000; PINHEIRO et al., 2004). Estudos evidenciam mudanças no comportamento alimentar da população e sua relação com a prevalência de DCNT, como a obesidade, o *diabetes mellitus* tipo 2, as doenças cardiovasculares (DCV), além de asma, osteoartrite e até certos tipos de câncer (SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007; CDC, 2010).

Dados publicados na Pesquisa de Orçamento Familiares (POF) 2008-2009, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostraram que a disponibilidade de alimentos nos domicílios brasileiros, em relação ao total de calorias consumidas (cerca de 1.611 Kcal/pessoa/dia), corresponde a 45% provenientes de cereais e tubérculos, 28% oriundos de alimentos essencialmente calóricos (como óleos e gorduras vegetais, gordura animal e açúcar), 19% de alimentos de origem animal (carnes, leite e ovos) e 2,8% correspondem ao consumo de frutas e hortaliças (IBGE, 2010).

Em estudo prospectivo europeu designado *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* (EPIC), com 8 anos de seguimento, e 23.571 participantes saudáveis, residentes de Potsdam/Alemanha, com idade entre 35 e 65 anos, os pesquisadores realizaram, uma vez ao ano, questionário de frequência alimentar e acompanharam a incidência de doenças crônicas, a cada 2-3 anos. Durante esse período, foram identificados 363 casos de DCV, 837 casos de *diabetes mellitus* tipo 2 e 844 casos de câncer na população estudada. O consumo de cereais integrais foi inversamente associado ao risco de *diabetes mellitus* tipo 2, ao passo que a ingestão de manteiga foi diretamente associada ao risco de DCV. Por outro lado, a ingestão frutas e

hortaliças mostrou associação inversa ao risco do desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2 e de DCV (von RUESTEN; BERGMANN; BOEING, 2013).

Dietas ricas em lipídios, principalmente do tipo saturado, favorecem o aumento da adiposidade, tanto em humanos como em modelos animais (HARIRI; THIBAUT, 2010). Estudos apontam que a dieta hiperlipídica ($\geq 30\%$ do valor energético total da dieta) é capaz de induzir o excesso de peso, seguida de outros distúrbios metabólicos, levando ao quadro de intolerância à glicose, resistência periférica à ação da insulina e dislipidemias (JÉQUIER, 2002; YOUNGREN; PAIK; BERNARD, 2001; MACHADO et al., 2010).

No Brasil, a prevalência de adultos com 20 anos ou mais com excesso de peso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$), segundo a POF 2002-2003, atingiu 41,4% dos homens e 40,9% das mulheres (IBGE, 1975; IBGE, 2004). Dados da POF 2008-2009 revelaram que 50,1% dos homens estão acima do peso, enquanto para as mulheres esse índice representa 48%, o que corresponde a um aumento entre 7 e 8%, em ambos os gêneros, em comparação aos resultados obtidos na POF 2002-2003 (IBGE, 2010).

A pesquisa elaborada e divulgada pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizada em 2011, mostrou que a prevalência do excesso de peso em São Paulo, em adultos com 18 anos ou mais, corresponde a 50,9% dos homens e a 45,2% das mulheres (BRASIL, 2012).

Nos Estados Unidos, mais de um terço da população adulta (cerca de 72 milhões de pessoas) e 17% das crianças são obesas (CDC, 2011). De 1987 a 2001, os custos médicos relacionados à prevenção e ao tratamento da obesidade e de doenças relacionadas aumentaram em 27%. Em se tratando de números, em 2006, os gastos no setor da saúde foram de, aproximadamente, 147 bilhões de dólares (THORPE et al., 2004; FINKELSTEIN et al., 2003).

Estima-se para o ano de 2030 que em todo o mundo haverá 55 milhões de mortes relacionadas às DCNT (WHO, 2012).

Desordens metabólicas como a obesidade apresentam quadro inflamatório crônico e de baixa intensidade, conhecido como meta-inflamação

(HOTAMISLIGIL, 2006), o qual é caracterizado pela interação de aspectos genéticos, ambientais, comportamentais, fisiológicos, sociais e culturais (RACETTE; DEUSINGER; DEUSINGER, 2003).

Somado a esse fato, cabe ressaltar que as DCNT não se restringem somente à determinada parcela da população, e atinge todos os estratos socioeconômicos (MOODIE et al., 2013). Nessa perspectiva, vislumbra-se a elaboração de estratégias no campo da saúde pública capazes de contemplar e integrar ações de prevenção e controle do excesso de peso e da obesidade (PINHEIRO et al., 2004).

1.1.2 Inflamação crônica resistência à ação da insulina

Inflamação é o termo utilizado para descrever a cascata de respostas que ocorre nos tecidos vascularizados que sofrem algum tipo de lesão. Os sinais clínicos incluem aumento do fluxo sanguíneo (provocando calor e rubor), aumento da permeabilidade e infiltração celular (tumor), a liberação de mediadores no local inflamado (induzindo dor) e, em última instância, pode ocorrer perda de função (LARSEN; HENSON, 1983). Em condições fisiológicas, a resposta inflamatória representa componente relevante de proteção e de defesa do organismo, iniciada por mecanismos que visam a morte do agente agressor (CALDER et al., 2013).

Diferentes fatores podem desencadear a inflamação, dentre eles se destacam a presença de componentes microbianos, a lesão tecidual e o estresse metabólico. No entanto, independente da origem dos fatores, eles podem ativar as mesmas vias de sinalização celular, como, por exemplo, a via inflamatória do fator de transcrição NF- κ B (SUN et al., 2012).

De acordo com o tempo de duração, distinguem-se dois tipos de processos inflamatórios, o agudo e o crônico. Lesões locais induzem respostas imediatas que são desencadeadas por mediadores químicos, os quais chegam aos tecidos em segundos, atuando primeiramente na microcirculação. Assim, a resposta inflamatória aguda é caracterizada pela exsudação de fluidos e pela

migração de leucócitos (RYAN; MAJNO, 1977). Após a eliminação do agente agressor (por exemplo, bactérias), o mecanismo de reparação tecidual é iniciado, sendo este processo chamado de resolução da inflamação. Quando existem falhas nessa fase de resolução, ocorre a transição da inflamação aguda para a crônica (CALDER et al., 2013).

A inflamação crônica representa uma reação tardia, que é mais específica, sendo caracterizada pela infiltração de células como linfócitos e macrófagos em determinados tecidos, como o tecido adiposo (RYAN; MAJNO, 1977).

A inflamação crônica envolve mudança progressiva dos tipos celulares presentes no local inflamado, apresentando simultaneamente destruição e cicatrização tecidual devido à contínua resposta inflamatória, a qual se torna patológica quando há perda de tolerância e/ou regulação de processos biológicos (CALDER et al., 2013).

Embora o controle da inflamação seja primordial na promoção da saúde, bem como na homeostase, quando o quadro se torna crônico, esse tipo de resposta inflamatória se torna sistêmica e provoca prejuízo nos processos regulatórios, associados com diversas DCNT (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006).

Nesse sentido, a inflamação crônica pode prejudicar a via de sinalização da insulina em tecidos sensíveis a esse hormônio, como o músculo esquelético, levando à resistência à ação da insulina (PANG et al., 2010), a qual é definida como a redução da atividade da insulina em tecidos alvo como músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, favorecendo a ocorrência da hiperglicemia (GINSBERG, 2000).

Outra condição que pode contribuir para o quadro de resistência à ação da insulina induzido pela obesidade é o aumento da síntese e liberação de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α (YE, 2013).

A inflamação crônica de baixa intensidade é caracterizada pela elevação da concentração de biomarcadores inflamatórios na circulação

sistêmica (CALDER et al., 2011). O mecanismo que relaciona inflamação crônica de baixa intensidade e obesidade foi proposto pela primeira vez em 1993 por Hotamisligil e colaboradores. No estudo, os investigadores mostraram que o tecido adiposo periepídídimal de camundongos diabéticos (*db/db*), com 7-8 semanas de vida, apresenta a capacidade de sintetizar e secretar o TNF- α , sugerindo o papel dessa citocina no quadro de resistência à insulina observado nesses animais.

O excesso de peso resulta no aumento circulante dos AGNE, que, por sua vez, são capazes de ativar vias de sinalização de proteínas quinases, como a proteína quinase C (PKC), a qual pode fosforilar resíduos de serina presentes no IRS-1 e, dessa maneira, promover resistência à insulina (CAPURSO; CAPURSO, 2012).

Além disso, os ácidos graxos saturados podem favorecer a elevação da concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios (CALDER et al., 2013). De forma direta, na presença de ácido palmítico, miotubos aumentam a expressão gênica de TNF- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6. Em co-cultura de miotubos com macrófagos, a expressão dessas citocinas aumenta significativamente em relação à co-cultura de miotubos com fibroblastos, mostrando assim que a presença do ácido graxo saturado induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias a partir de macrófagos (VARMA et al., 2009).

Camundongos C57BL/6J, que ingeriram três tipos de rações: (i) hipolipídica e hipoglicídica (3% de lipídios e 5% de sacarose), (ii) hiperlipídica (45% de lipídios) e (iii) hiperglicídica (50% de sacarose), durante 55 semanas, apresentaram aumento de peso corporal, maior peso dos coxins adiposos periepídídimal, mesenquimal e subcutâneo, além de maior concentração de triacilgliceróis no fígado dos animais do grupo alimentado com ração HL em relação aos dois demais grupos (SUMIYOSHI; SAKANAKA; KIMURA, 2006). O mesmo estudo identificou maior insulinemia e leptinemia, além de concentrações estatisticamente superiores de triacilgliceróis (TAG), colesterol total e ácidos graxos livres (AGL) nos animais alimentados com ração HL quando comparados aos demais grupos, mostrando que o consumo elevado de

lipídios e de sacarose pode induzir intolerância à glicose mesmo em animais sem pré-disposição ao desenvolvimento da obesidade (SUMIYOSHI; SAKANAKA; KIMURA, 2006).

1.1.3 Via de sinalização da insulina e a resposta inflamatória no tecido muscular

A insulina realiza suas funções biológicas a partir de uma complexa rede de sinalização, que é inicialmente desencadeada por sua ligação ao receptor de insulina (IR) (TANIGUCHI et al., 2006). O IR é um heterotetrâmero composto por duas subunidades α e duas subunidades β que estão ligadas por pontes dissulfeto. Quando a insulina se liga ao IR, na porção extracelular que se refere à subunidade α , ela ativa resíduos de tirosina quinase na subunidade β , que sofre autofosforilação em três resíduos diferentes (Tyr 1158, Tyr 1162 e Tyr 1163), contribuindo assim para a amplificação do sinal da atividade quinase (WHITE, 1988). Em termos estruturais, o IRS-1 contém 21 sítios de fosforilação em tirosina e mais de 30 sítios potenciais de fosforilação em serina/treonina. Na região N-terminal da proteína estão localizados dois domínios de ligação, um domínio de ligação de fosfotirosina (PTB) e outro domínio homólogo *Pleckstrin* (PH), este último é capaz de conduzir o IRS para a membrana da célula, facilitando a comunicação e ligação com o IR (KABURAGI et al., 1999).

A proteína fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) é alvo para IRS1 e para IRS2, que são capazes de converter o 4,5 fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) em 3,4,5 fosfatidilinositol trifosfato, que, por sua vez, ativa quinases em resíduos serina/treonina, como, por exemplo, a quinase fosfatidilinositol dependente (PDK)-1, capaz de ativar a fosforilação da proteína quinase B (PKB/AKT) (TANIGUCHI et al., 2006). A ativação da AKT favorece a síntese de glicogênio e a síntese proteica via mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos). A presença de insulina estimula a captação de glicose, tanto nos miócitos quanto nos adipócitos, por meio da translocação de vesículas do transportador 4 de glicose

(GLUT-4) para a membrana plasmática (MARTIN et al., 2000), sendo este fato relacionado ao aumento da captação celular de glicose (SALTIEL; PESSIN, 2002).

Todavia, o consumo de dietas HL é a maior causa de resistência à ação da insulina, caracterizada pela redução da capacidade do músculo esquelético em estocar glicogênio, com posteriores prejuízos no estoque de glicogênio hepático e elevação do conteúdo de TAG no tecido adiposo branco (KEWALRAMANI; BILAN; KLIP, 2010).

A lipotoxicidade decorrente do excesso da ingestão de lipídios saturados pode promover um quadro pró-inflamatório e, dessa forma, aumentar o risco para o desenvolvimento das DCNT relacionadas à dieta (OLLER DO NASCIMENTO; RIBEIRO; OYAMA, 2009).

Os ácidos graxos presentes no tecido muscular podem estimular a produção e liberação de citocinas pelos próprios miócitos, sendo estas citocinas designadas miocinas (PEDERSEN et al., 2007). Os AGNE são capazes de ativar a sinalização intracelular de receptores do tipo *toll like* (TLR-4), que tem papel importante no sistema imune inato devido à capacidade de reconhecimento de bactérias Gram negativas, as quais possuem lipopolissacarídeos (LPS) em sua estrutura, contendo lipídios saturados (BEUTLER, 2009). Ácidos graxos saturados (AGS) promovem a ativação da via de sinalização do receptor TLR-4, o que culmina na ativação da quinase do inibidor do NF- κ B (IKK)- β , que, por sua vez, promoverá a ativação do fator nuclear NF- κ B, o qual é responsável pela ativação de diversos genes com atividade pró-inflamatória. Em paralelo, a presença de AGS favorece a ativação de outras proteínas quinases, como a JNK e a PKC. Juntas, IKK- β , JNK e PKC podem reduzir a atividade da via de sinalização da insulina por meio da fosforilação de resíduos de serina presentes no IRS-1 (HOLLAND et al., 2007; HIROSUMI et al., 2002), cujo fato acarreta na redução da sua capacidade de ligação ao IR e, conseqüentemente, diminuição da captação de glicose (ZICK, 2005).

O quadro de resistência à insulina também pode ser resultante da disfunção mitocondrial (MARTINS et al., 2012; YE, 2013). A infusão de lipídios saturados ou a ingestão da dieta HL pode prejudicar a função das mitocôndrias, causando redução na síntese de ATP (adenosina trifosfato), no consumo de oxigênio e na fosforilação oxidativa (BREHM et al., 2006; CHANSEAUME et al., 2006).

Hirabara e colaboradores (2010) investigaram os efeitos dos ácidos graxos (AG) saturados e insaturados em culturas de miotubos C2C12 de camundongos e em células provenientes do tecido muscular (sóleo, gastrocnêmio e quadríceps) de ratos *Wistar* machos. As células foram tratadas com 100 μ M de ácido graxos saturados (palmítico e esteárico) e 100 μ M de ácido graxos insaturados (oleico, linoleico, eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA) pelo período de 24 horas. Posteriormente, os miotubos e os miócitos foram incubados, ou não, com 7 nM de insulina. Os AG insaturados não interferiram no metabolismo da glicose ou na função mitocondrial, enquanto os AG saturados reduziram a oxidação de glicose e a síntese de ATP.

Ácidos graxos saturados podem induzir estresse do RE (WEY et al., 2006). Nessa condição, o RE ativa o complexo chamado UPR (do inglês *unfolded protein response*) na tentativa de reestabelecer a integridade da organela (RON; WALTER, 2007). De modo crônico, esse sistema sobrecarregado se torna fonte de produção e liberação de espécies reativas de oxigênio, aumentando o estresse oxidativo e, conseqüentemente, o processo inflamatório (XUE et al., 2005; WYMAN; SCHNEITER, 2008). Em animais geneticamente obesos (*ob/ob*) ou induzidos pela administração da ração HL, foi verificado aumento do estresse do RE e posterior prejuízo da via de sinalização da insulina (ÖZCAN et al., 2004).

Outro mecanismo relacionado ao prejuízo da via de sinalização da insulina induzido por ácidos graxos refere-se ao ciclo glicose-ácido graxo, proposto por Philip Randle, em 1963 (RANDLE, 1963; DELARUE; MAGNAN, 2007; SUGDEN, 2007). Este mecanismo propõe que o aumento da β -oxidação

e do *turnover* do ciclo de Krebs promove aumento do conteúdo de citrato no compartimento citoplasmático, o que resulta em inibição da enzima fosfofrutoquinase. Consequentemente, este fato acarreta em acúmulo de hexoses monofosfatos, principalmente de glicose-6-fosfato, que é um potente inibidor da enzima hexoquinase e similarmente afeta a fosforilase b. O efeito geral seria o menor fluxo pela via glicolítica e a diminuição da captação e da utilização de glicose sangüínea.

Entretanto, estudos realizados posteriormente, considerando a concentração intracelular dos metabólitos de glicose, colocaram em dúvida o mecanismo de resistência à insulina proposto por Randle, uma vez que pelas observações encontradas, a teoria da inibição da glicólise por meio da elevação da concentração de citrato, não se reproduz em diversos estudos, sugerindo que a regulação seja diferente e que o período (agudo ou crônico) da administração ou da infusão de lipídios, também pode interferir na utilização do substrato energético (HIRABARA et al., 2007; SAVAGE; PETERSEN; SHULMAN, 2007; SILVEIRA et al., 2008).

Cabe ressaltar ainda, que o nível de sensibilidade difere de uma fibra muscular para outra, uma vez que a quantidade de lipídios presentes nestas células também é distinta (NAWROCKI, SCHERER, 2004). Em função da atividade mitocondrial, as fibras oxidativas do tipo I possuem maior capacidade de transporte e oxidação de lipídios, transporte de elétrons, maior capacidade antioxidante e são mais sensíveis à ação da insulina em relação às fibras glicolíticas do tipo II (SCHRAUWEN et al., 2003; TALBOT, LAMBERT, BRAND, 2004; SILVEIRA et al., 2008).

1.1.4 Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

A erva-mate (EM) (*Ilex paraguariensis*) pertence à família das aquifoliáceas, sendo nativa da América do Sul, estando presente no norte da Argentina, no Paraguai, no Uruguai e no sul do Brasil, com destaque para os

estados de Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (TORMEN, 1995; BASTOS; TORRES, 2003).

Anualmente, a produção brasileira de EM corresponde a, cerca de, 139 mil toneladas. A bebida é consumida por milhões de pessoas, com média de ingestão diária de 1 litro, e por isso, pode ser considerada uma alternativa para o consumo de café e de chá. A partir da EM costuma-se fazer três diferentes tipos de bebidas: o chimarrão, o tererê e o chá mate (TORMEN, 1995; BASTOS et al., 2007a; BASTOS et al., 2007b; HECK; DE MEJIA, 2007).

O processamento da EM consiste em 3 diferentes estágios, compreendendo (i) secagem rápida, chamada de "sapeco" que visa reduzir a atividade enzimática e os níveis de umidade da planta; (ii) estágio intermediário de secagem, em que tambores contendo as plantas são aquecidos pela queima de madeira ou à gás, método chamado de "barbaqua"; (iii) consiste numa secagem adicional seguida de moagem, método denominado de "cancheada". O que difere entre esses processamentos são o tempo, a temperatura e os estágios de secagem. O método "cancheada" é utilizado na produção do tererê e do chimarrão (ESMELINDRO et al., 2002; BASTOS et al., 2006; BASTOS et al., 2005; BASTOS et al., 2007b).

No presente trabalho, foi utilizado o chá mate tostado. Esse sistema envolve forno com fogo indireto, semelhante à torrefação do café. Depois de tostado, o mate passa por um processo de extração, por água quente e vapor sob pressão, posteriormente são retirados os sólidos solúveis. O líquido extraído (extrato) é desidratado em contato com ar quente, sendo transformado em mate solúvel (EMBRAPA, 2010).

A ingestão do chá mate evidencia efeitos benéficos sobre a saúde, com destaque para os efeitos na redução dos níveis de colesterol total (FILIP; FERRARO, 2003), estimulante do sistema nervoso central, diurético (GONZALEZ et al., 1993), efeitos antimutagênicos (BASTOS et al., 2007b), antioxidante (FILIP et al., 2000; VANDERJAGT et al., 2002), antifúngico (FILIP et al., 2010), além favorecer o aumento da densidade mineral óssea (CONFORTI et al., 2012). Pelo potencial antioxidante, têm sido atribuídos ao

chá mate efeitos sobre o sistema cardiovascular e na proteção contra oxidação do DNA e de lipoperoxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (HECK; DE MEJIA, 2007).

Diversos compostos bioativos têm sido identificados na EM, que podem ser responsáveis pelos seus efeitos benéficos à saúde. Sabe-se que a bebida é rica em compostos fenólicos como os cafeoil-derivados (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico), flavonóides (quercetina, rutina e *kaempferol*), metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina), taninos e numerosas saponinas triterpênicas, que são derivadas do ácido ursólico e conhecidas como metasaponinas (POMILIO et al., 2002; ZAPOROZHETS et al., 2004; KRAEMER et al., 1996). Cabe ressaltar que os cafeoil-derivados são os constituintes primários responsáveis pela capacidade antioxidante do chá mate (HECK; DE MEJIA, 2007).

Em trabalho de revisão, publicado recentemente, sobre a composição do extrato de EM, mostrou que, em média, 5 g/L correspondem ao total de compostos fenólicos e 0,35 g/L do total de saponinas, distribuídos em 2% de teobromina, 5% de epicatequina, 8% de cafeína, 11% de ácido gálico, 11% de 4,5 dicafeoilquínico, 21% de galocatequina e 42% de ácido clorogênico (BRACESCO et al., 2011). De modo geral, a concentração de polifenóis na EM é superior à do chá verde e similar àquela encontrada em vinhos tintos (BIXBY et al., 2005).

Todavia, as características físico-químicas da EM podem ser modificadas em função do processo de industrialização e das etapas de processamento, influenciando diretamente os teores de compostos presentes na EM (ESMELINDRO et al., 2002).

Isolabella e colaboradores (2010) estudaram os efeitos da variação dos compostos bioativos de folhas frescas de EM e verificaram que o ácido clorogênico e o 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DCQ) foi abundante nas amostras analisadas, ao passo que o ácido cafeico foi inferior em todas as amostras. Os autores destacam que as folhas verdes têm concentrações significativamente

menores de compostos bioativos, enquanto as condições de temperatura e umidade podem interferir na liberação de compostos, como a cafeína. Bastos e colaboradores (2007a) mostraram que a extração de cafeína e de ácido 5-cafeoilquínico é mais efetiva quando as folhas secas são processadas.

Nesse sentido, estudos tem investigado a biodisponibilidade dos compostos presentes na EM (CROZIER et al., 2010). Sucintamente, os compostos iniciam a absorção no estômago, passando pelo intestino delgado e, posteriormente, seguem para o cólon, onde são metabolizados pela microbiota (ZAMORA-ROS et al., 2012). Tanto em humanos (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001), como em modelos animais (LAFAY et al., 2006), os compostos da Erva-Mate mostraram ser absorvidos.

1.1.5 Erva-mate e a resposta inflamatória

No que concerne à relação entre EM e inflamação, verifica-se que determinados compostos fenólicos presentes na EM apresentam capacidade modulatória sobre a resposta inflamatória. Dentre estes compostos, cita-se o ácido cafeico, que apresenta a capacidade de inibir a atividade das enzimas 5-lipoxigenase, 12-lipoxigenase e ciclooxigenase (COX), as quais estão envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios denominados eicosanóides — prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (KOSHIHARA et al., 1984; MIRZOEVA et al., 1996; MICHALUART et al., 1999).

Dentre as propriedades farmacológicas das metilxantinas, nota-se que esses compostos apresentam efeitos termogênicos (POMILIO; TRAJTEMBERG, 2002). Com relação ao ácido cafeico, verifica-se que este inibe eficientemente a ativação da PKC e do fator de transcrição nuclear NF- κ B induzida por ceramida em células U937 (NARDINI et al., 2001), ao mesmo tempo em que atua como potente e seletivo inibidor da transcrição e atividade da metaloproteinase da matriz (MMP)-9, que tem sido associada com a progressão e invasão do câncer (CHUNG et al., 2004). O ácido 3,5-dicafeoilquínico, também presente no chá mate, apresenta a capacidade de

inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase-2 (NOS-2), bem como reduzir a atividade transcricional do NF- κ B (OLMOS et al., 2008).

Aliado a esses fatos, verifica-se que as saponinas presentes na EM interferem no metabolismo do colesterol, bem como no retardo da absorção intestinal da gordura dietética devido à inibição da atividade da enzima lipase pancreática (HAN et al., 2002), ao mesmo tempo em que o ácido ursólico, é capaz de reduzir a ativação do fator de transcrição NF- κ B e a atividade enzimática da COX-2 (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006).

Kaempferol e quercetina, os quais estão presentes no chá mate, apresentam a capacidade de inibir a expressão do mRNA e da proteína óxido nítrico sintase induzível (iNOS), bem como a produção de óxido nítrico e a expressão de citocinas, como a IL-8 e o TNF- α . Tanto o *kaempferol* quanto a quercetina, também apresentam a capacidade de inibir a ativação do NF- κ B (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; HÄMÄLÄINEN et al., 2007).

A EM inibiu a atividade da lipase pancreática de camundongos *Swiss* submetidos à ração HL por 8 semanas, o que pode interferir na hidrólise dos lipídios no intestino delgado e reduzir a absorção intestinal (MARTINS et al., 2009).

Arçari e colaboradores (2011), estudando os efeitos anti-inflamatórios do extrato de EM, mostraram que camundongos *Swiss*, alimentados com dieta HL, por 16 semanas, os quais receberam extrato aquoso de EM por 8 semanas, tiveram aumento significativo dos níveis de AKT fosforilada no músculo sóleo, indicando melhora da sensibilidade à insulina, com aumento da captação de glicose pela célula.

Em suma, a administração do EAEM tanto em animais alimentados com ração HL ou em animais obesos parece apresentar efeitos na redução processo inflamatório (ARÇARI et al., 2011; HUSSEIN et al., 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos apontam a estreita relação entre resistência à insulina e aumento da resposta inflamatória crônica, particularmente induzida pelo aumento da adiposidade (QATANANI e LAZAR, 2007; BERG e SCHERER, 2005). Além disso, verifica-se associação entre a elevação da concentração sanguínea de biomarcadores inflamatórios, como a proteína C reativa, e o maior risco para o desenvolvimento de DCV (YOUNG et al., 2012). Cabe destacar que o consumo de lipídios saturados pode contribuir para o aumento da adiposidade, atribuída ao aumento da resposta inflamatória, sendo que, parte desse aumento é devido à ativação da via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B (BORGES et al., 2013), o que promove aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, além de reduzir citocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina, sendo esses fatos relacionados ao aumento do risco cardiovascular.

Neste sentido, optamos por um protocolo experimental no qual os animais foram alimentados com ração com alto teor de lipídios e de ácidos graxos saturados, ao mesmo tempo em que realizamos uma intervenção nutricional com o EAEM, uma vez que a literatura científica evidencia o potencial dos compostos bioativos da EM em modular a resposta inflamatória (CAVE et al., 2008; NARDINI et al., 2001; OLMOS et al., 2008).

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

A ração HL aumenta a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios, bem como ativa a via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B no músculo esquelético, o que acarreta em resistência insulínica. Por outro lado, o extrato aquoso de EM, por meio da ação dos seus compostos bioativos, atenua as disfunções metabólicas e reduz a resposta inflamatória no tecido muscular.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do consumo isocalórico da ração hiperlipídica e da administração da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no músculo sóleo de ratos *Wistar*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição dos ácidos graxos das rações controle e HL e da banha de porco.
- Determinar e caracterizar os compostos presentes EM.
- Avaliar o efeito da ingestão da ração hiperlipídica sobre a histologia do tecido muscular.
- Avaliar os efeitos da administração de extrato aquoso de EM (*Ilex paraguariensis*) em ratos que ingeriram a ração HL sobre:
 - a resposta glicêmica após o teste oral de tolerância à glicose e o teste intraperitoneal de tolerância à insulina.
 - o perfil lipídico e as concentrações plasmáticas de glicose, insulina, adiponectina, proteína C reativa e ácidos graxos não esterificados totais.
 - a composição corporal.
 - a expressão das proteínas IKK- β , JNK, AKT e IRS-1, nas suas formas total e fosforilada, e do NF- κ B, na sua forma fosforilada, no músculo sóleo.

5. MÉTODOS

5.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

5.1.1 Animais

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

Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (protocolo de aprovação nº 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 (**Tabela 1**) foi baseada no AIN-93M, sendo acrescida de banha de porco em substituição ao amido de milho, o que visa aumentar o teor de lipídios da dieta e, conseqüentemente, favorecer a indução de ganho de peso em ratos.

Em 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. 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 pela quantidade de ração consumida com o objetivo de promover ingestão diária semelhante de proteínas, sacarose, micronutrientes, ácidos graxos essenciais e fibras alimentares entre os dois grupos (TALLMAN;

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 foi aumentada nessa ração (PANG et al, 2008).

Tabela 1. Composição das rações experimentais segundo valor energético.

Ingredientes	Ração Controle	Ração Hiperlipídica
gramas por 1.000 Kcal		
Amido	155,40	29,65
Sacarose	25,04	25,04
Caseína	35,05	35,05
Óleo de soja	10,01	10,01
Banha de porco	-----	55,44
Celulose	12,52	12,52
Mistura salina	8,76	8,76
Mistura vitamínica	2,50	2,50
L-cistina	0,45	0,45
Bitartarato de colina	0,63	0,63
Tertbutil hidroquinona	0, 002	0, 007

5.1.3 Composição dos ácidos graxos das rações e da banha de porco

A composição dos ácidos graxos foi determinada por cromatografia à gás. As análises dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAMES) foram realizadas utilizando cromatógrafo a gás Agilent da série 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), equipado com injetor de divisão, detector de chama de ionização e coluna capilar de sílica fundida (DB-23; J%W 122-2361) com dimensão de 60m x 0,25mm e espessura da película de 0,15 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). 1,0 µl de cada amostras, foram injetadas na razão de 1:50.

Para tanto, foi utilizado hélio como gás de arraste e a separação dos ácidos graxos foi realizada utilizando o equipamento com a variação no gradiente de temperatura de 1 °C/minuto, iniciando em 140 °C até 225 °C. A temperatura do injetor foi fixada em 250 °C enquanto a temperatura do detector foi de 260 °C. A identificação dos picos foi realizada por comparação em relação aos tempos de retenção relativos à mistura comercial, considerada padrão (FAME Supelco 37; 47885-U e C4-C24 ou 49453-U do mesmo carbono) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA).

5.1.4 Grupos experimentais

O protocolo experimental foi dividido em dois momentos, com n amostral total de 72 animais, sendo utilizados 36 animais em cada momento. Inicialmente, em cada um dos momentos, os animais foram distribuídos em dois grupos, com 18 animais por grupo. Um grupo recebeu ração controle (CON), ou seja, formulada segundo a AIN-93M, enquanto o outro grupo recebeu ração HL. Após 12 semanas, 6 animais de cada grupo sofreram eutanásia, os quais foram considerados grupos “*baseline*”. Posteriormente, os demais animais foram distribuídos em 4 grupos (n=6/grupo) (CON, CON+EM, HL e HL+EM), que continuaram recebendo ração CON e HL,. No entanto, os grupos CON+EM e HL+EM também receberam, por gavagem, durante um

período de quatro semanas, o extrato aquoso de EM (1 g/kg peso corporal/dia). Os demais grupos CON e HL receberam água por meio de gavagem. Desse modo, o estudo foi realizado com seis grupos de animais, nos momentos 1 e 2:

- **Grupo CONBL:** grupo “*baseline*”, com ração controle, que sofreu eutanásia após 12 semanas do início do protocolo (n=12).
- **Grupo CON:** grupo com ração controle, que recebeu gavagem com água entre a 13^a e 16^a semana de protocolo e, em seguida, sofreu eutanásia ao final da 16^a semana do protocolo experimental (n=12).
- **Grupo CON+EM:** grupo com ração controle, que recebeu extrato aquoso de EM (1 g/kg de massa corporal) entre a 13^a e a 16^a semana de protocolo e, em seguida, sofreu eutanásia ao final da 16^a semana do protocolo experimental (n=12).
- **Grupo HLBL:** grupo “*baseline*”, com ração hiperlipídica, que sofreu eutanásia após 12 semanas do início do protocolo (n=12).
- **Grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica, que recebeu gavagem com água entre a 13^a e 16^a semana de protocolo e, em seguida, sofreu eutanásia ao final da 16^a semana do protocolo experimental (n=12).
- **Grupo HL+EM:** grupo com ração hiperlipídica, que recebeu extrato aquoso de EM (1g/kg de peso corporal) entre a 13^a e a 16^a semana de protocolo e, em seguida, sofreu eutanásia ao final da 16^a semana do protocolo experimental (n=12).

Após a conclusão do momento 1, iniciamos o momento 2, seguindo os mesmos critérios e cuidados descritos acima.

5.1.5 Preparo e administração da EM

A bebida à base de EM foi preparada por meio da dissolução do chá mate instantâneo liofilizado (Leão Júnior S.A., Curitiba-PR, Brasil) em água, na temperatura ambiente, com o uso de um homogeneizador. A bebida sempre foi

preparada no momento da administração. O chá mate foi administrado através de sonda gástrica (gavagem), durante as últimas quatro semanas do protocolo experimental. O grupo controle recebeu água via gavagem. A quantidade administrada do chá mate correspondeu a 1 g/kg de peso corporal (ARÇARI et al., 2009; MARTINS et al., 2010).

Durante o protocolo experimental foram utilizados frascos do extrato liofilizado de EM do mesmo lote, visando à administração das mesmas quantidades de compostos bioativos para os animais. A fim de evitar a degradação dos compostos bioativos do extrato aquoso da EM, todos os frascos foram mantidos ao abrigo da luz e umidade.

5.1.6 Quantificação e identificação de compostos fenólicos e de cafeína presentes no extrato aquoso de erva-mate liofilizado

A quantificação e identificação dos compostos fenólicos e cafeína presentes na EM liofilizada foram realizadas por cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE). Para tanto foi utilizado um cromatógrafo líquido modelo Agilent 1200 SL, equipado com detector de arranjos de diodos (DAD) e espectômetro 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.

5.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Dois experimentos foram realizados para a obtenção do material biológico. No momento 1, foram coletadas amostras de sangue para análise dos parâmetros bioquímicos e inflamatórios e, a partir da carcaça dos animais,

foi realizada a análise da composição corporal (**Figura 1**). Posteriormente, num segundo momento, foram coletadas amostras do músculo sóleo para a avaliação da expressão das proteínas de interesse e análise histológica.

Figura 1. Delineamento experimental referente ao momento 1.

↓ indica eutanásia. Distribuição dos animais por grupos ao longo do protocolo. Na 12ª semana, os grupos CONBL (CON *baseline*) e HLBL (HL *baseline*) sofreram eutanásia enquanto os grupos CON (+ água), HL (+ água), CON+EM (CON+ suplementado com EAEM) e HL+EM (HL+ suplementado com EAEM) seguiram até o final do protocolo de 16 semanas.

Após 8 a 10 horas de jejum, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (50 mg/kg de peso corporal, Dopalen®, Paulínia/SP, Brasil) e cloridrato de quetamina (100 mg/kg de peso corporal, Anasedan®, Jacareí/SP, Brasil), aplicada por via subcutânea, por meio de uma seringa de insulina com agulha 20-G. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por decapitação, utilizando-se uma guilhotina apropriada. Esse procedimento foi realizado de forma rápida, visando minimizar qualquer forma de sofrimento ou

estresse nos animais. A eutanásia foi realizada no período da manhã, entre 8 h e 12 h.

Foram colhidas amostras do sangue de 6 animais de cada grupo em tubos contendo o anticoagulante EDTA a 10%. Posteriormente, o sangue foi centrifugado por 15 minutos, 4 °C, 3.000 rpm. A partir da obtenção do plasma, foram determinadas as concentrações de glicose, insulina, adiponectina, proteína C reativa, perfil lipídico, AGNE totais e perfil dos ácidos graxos plasmáticos.

A partir da carcaça dos animais, foi realizada a análise da composição química da mesma, ou seja, a quantificação de água, lipídios, proteínas e cinzas presentes na carcaça.

Cabe ressaltar que, em função da necessidade do estímulo com insulina, outro lote de animais foi submetido ao mesmo protocolo experimental, visando a coleta do tecido muscular para histologia e posterior avaliação da expressão de proteínas fosforiladas envolvidas na via de sinalização da insulina (**Figura 2**).

Figura 2. Delineamento experimental referente ao momento 2. ↓ indica eutanásia. Distribuição dos animais por grupos ao longo do protocolo. Na 12ª semana, os grupos CONBL (CON baseline) e HLBL (HL baseline) sofreram eutanásia enquanto os grupos CON (+ água), HL (+ água), CON+EM (CON+ suplementado com EAEM) e HL+EM (HL+ suplementado com EAEM) seguiram até o final do protocolo de 16 semanas.

Assim, após o período de jejum, os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente. Com auxílio de um bisturi, foi retirado uma amostra central do músculo sóleo (cerca de 50 mg) da pata direita e, imediatamente, a mesma foi armazenada no nitrogênio líquido. Posteriormente, realizou-se a abertura da cavidade abdominal para promover estímulo da via da insulina. Para tanto, foram utilizadas 10 unidades (U) de insulina regular humana (Novolin R, Novo Nordisk®, Montes Claros, M.G, 100 U/mL), diluídas em solução salina, na concentração de 1:1 (100 µL de insulina em 100 µL de solução salina) e injetadas 200 µL da solução na veia porta, com ajuda de uma seringa para insulina com agulha Ultra-fine™ (BD, Nova Jersey, EUA).

Noventa segundos após a infusão, outra amostra de músculo sóleo foi

retirada, no entanto, proveniente da pata esquerda do mesmo animal (cerca de 50 mg da parte central do tecido). A amostra foi armazenada em nitrogênio líquido e, posteriormente, em freezer -80 °C (KUBOTA et al., 2008).

Foi realizada a extração das proteínas do músculo sóleo para avaliação da expressão das proteínas IKK- β , JNK, AKT e IRS-1, nas suas formas total e fosforilada, e do NF- κ B, na sua forma fosforilada, por meio da técnica de *Western Blotting*.

5.3 TESTES DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E RESISTÊNCIA À INSULINA

5.3.1 Teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT)

Na primeira, décima segunda e décima sexta semanas após o início do protocolo experimental foram realizados o oGTT e o ipITT. Em ambos os testes os animais foram mantidos por 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, uma solução de glicose (20%) na concentração de 2 g/kg de peso corporal (WEISINGER et al., 2009). Após esse procedimento, amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos.

Para o ipITT, foi injetado uma dose de insulina regular (Novo Nordisk, Montes Claros, M. G., Brasil, 75 mU/100g de peso corporal) intraperitonealmente. 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 usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (KiTT), mediante análise da curva de decaimento (pelo programa *GraphPad Prism* versão 5.01 para Windows) de acordo com método proposto por Bonora e colaboradores (1989).

Para o oGTT, foi calculado a área sobre a curva (AUC), por meio do programa estatístico *GraphPad Prism* versão 5.01 para Windows. A determinação da concentração de glicose foi realizada utilizando-se o glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche®, Basel, Suíça).

O oGTT e o ipITT foram realizados com intervalos de 2 a 3 dias entre os mesmos, e 4 a 6 dias antes do dia da eutanásia. Tal atitude teve como intuito reduzir o estresse fisiológico dos animais, bem como evitar qualquer possível alteração referente às dosagens dos biomarcadores inflamatórios.

5.3.2 Determinação do Índice HOMA

Para determinação da resistência à insulina, foi utilizado o índice conhecido como HOMA (*Homeostasis Model Assessment*), que utiliza como parâmetros a glicemia e a insulinemia de jejum (período de 10 a 12 horas), utilizando o cálculo: $HOMA = \text{glicemia de jejum (mmol/mL)} \times \text{insulinemia de jejum (\mu IU/mL)} / 22,5$ (MATTHEWS et al., 1985).

5.3.3 Determinação do Índice QUICK

Para determinação da sensibilidade à insulina, foi utilizado o índice conhecido como QUICK (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*), que utiliza glicemia e insulinemia de jejum, utilizando o cálculo: $QUICK = 1 / [\log (\text{insulinemia de jejum } \mu\text{U/mL} + \log (\text{glicemia de jejum mg/mL}))]$ (KATZ et al., 2000).

5.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.4.1 Determinação da concentração sérica de glicose

Por meio do sangue da veia caudal, a glicemia de jejum foi determinada com o auxílio de um glicosímetro *Accu-Chek Performa* (Roche Diagnostics, Basel, Suíça).

5.4.2 Determinação das concentrações séricas de insulina e de adiponectina

As concentrações séricas de insulina e adiponectina foram quantificadas através do *kit* Lincoplex (Linco Research Inc., St. Charles, MO).

5.4.3 Determinação da concentração sérica de proteína C reativa.

A concentração sérica da 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 das concentrações séricas de triacilgliceróis, colesterol total, HDL- colesterol e colesterol não-HDL

A concentração sérica de triacilgliceróis (TAG), colesterol total e HDL- colesterol foram quantificadas por meio de *kits* comerciais em analisador automático multicanal (*Architect C 8000 Abbott Diagnostics*, Ilínois, EUA). A concentração sérica TAG foi determinada por meio de *kit* baseado em método enzimático (*Abbott Laboratories*, Chicago, IL, EUA). A determinação de colesterol total foi realizada por meio de *kit* baseado em método enzimático (*Abbott Laboratories*, Chigaco, IL, EUA). A dosagem de HDL-colesterol sérico também foi feita por método enzimático, utilizando o *kit* comercial *Randox HDL Cholesterol Direct* (*Randox Laboratories*, Crumlin, Reino Unido). A

determinação do colesterol não-HDL foi obtida por meio do cálculo da diferença entre as concentrações de colesterol total e HDL-colesterol.

5.5 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS PLASMÁTICOS

A concentração de ácidos graxos totais no plasma foi determinada por meio de *kit* (Biovision, Catálogo #K612-100, Califórnia, EUA).

O perfil dos ácidos graxos foi determinado, de acordo com o método proposto por LOBANCO et al. (2009), em cromatógrafo a gás da marca *Shimadzu*, equipado com coluna capilar SP 2560 da Supelco de 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme 0,2 µm.

Para tanto, foi utilizado hidrogênio como gás de arraste sob temperatura inicial de 140 °C e subsequente acréscimo de 4 °C/minutos, até atingir a estabilidade de 240 °C, permanecendo nessa condição por 15 minutos. Foi utilizado um padrão de mistura de ácidos graxos da marca *Sigma*. Os resultados foram expressos em % do total de ácidos graxos encontrados na amostra.

5.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARÇAÇA

A composição corporal dos animais (água, massa magra, lipídios, proteínas e cinzas) foi determinada por meio de análise química da carcaça, utilizando protocolo realizado por Rogero e colaboradores (2008).

O conteúdo de água foi determinado por meio da secagem da carcaça em uma estufa ventilada (aproximadamente 70 °C) durante sete dias. O conteúdo de água presente na carcaça 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, que foi determinado por meio da técnica de extração por solvente utilizando um extrator Soxhlet e éter etílico como solvente.

O restante da carcaça — sem o teor de água e de lipídios — foi completamente moído no triturador adequado (IKA M20 grinder, Labortechnik) e, posteriormente, peneirado para a remoção de pêlos, os quais podem reduzir a homogeneidade da amostra. Esse processo resulta em um pó altamente homogêneo, o qual foi utilizado para a determinação do conteúdo de proteína da carcaça pelo método de micro-Kjeldahl (ALBANESE; ORTO, 1963). Nesse pó homogêneo, também foi realizada a determinação do conteúdo de cinzas, a partir de dois gramas do pó, que 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. A quantidade de água, lipídios, proteínas e cinzas foram expressas em valores absolutos, bem como em valores percentuais em relação à massa total da carcaça.

5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MUSCULARES ENVOLVIDAS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA

Inicialmente, o tecido muscular foi dissecado, pesado e pulverizado em nitrogênio líquido, durante 10 segundos. Posteriormente, para cada 10 mg de tecido muscular, foram adicionados 80 µL do tampão de extração (**Quadro 1**) para a realização do processo de homogeneização, com auxílio do equipamento chamado politron (IKA, Werke Staufen, Alemanha). Logo, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos, a 4 °C, 12.000 rpm. O processo de centrifugação possibilitou a remoção do material insolúvel (VICHAIWONG et al., 2009).

Quadro 1. Descrição dos reagentes do tampão de extração de proteínas do músculo

Reagentes	Final	Estoque
Tampão de fosfato de potássio (pH= 7)	50 mM	0.1 M
Sacarose	0,3 M	1 M
DTT	0,5 mM	0,1 M
EDTA (pH=8)	1 mM	0,5 M
PMSF	0,3 mM	0,1 M
NaF	10 mM	0,5 M
Inibidor de fosfatase I	1 : 100	
Inibidor de fosfatase II	1 : 100	
Inibidor de protease	1 : 100	
Água ultrapura		

A partir do extrato proteico muscular foram realizados os ensaios de determinação da expressão das proteínas IKK- β , JNK, AKT e IRS-1, nas suas formas total e fosforilada,, e do NF- κ B, na sua forma fosforilada, por meio da técnica de *Western Blotting*. Cabe ressaltar que, com o objetivo de controlar a quantidade real de proteína pipetada de cada amostra no ensaio de *Western Blotting*, foi também determinada a expressão da proteína β -actina, a qual é expressa constitutivamente na célula e foi utilizada como controle nesse ensaio (KAWAMOTO et al., 2008).

Para o ensaio de avaliação da expressão da proteína IRS-1, nas suas formas total e fosforilada, foi utilizado outro protocolo de extração (**Quadro 2**). Para cada 50 mg de tecido muscular, foram utilizados 1 mL de tampão. Previamente, o tampão foi aquecido em banho-maria com água em ebulição, por 5 minutos. Logo, as amostras foram homogeneizadas e ficaram em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, somente após esse período, elas foram centrifugadas por 20 minutos, a 4 °C e 12.000 rpm.

Quadro 2. Descrição dos reagentes utilizados no tampão de extração de proteínas (adaptado para IRS-1).

Reagentes	Quantidade
Trisma-base 1M (pH=7,5)	10 mL
EDTA 200nM (pH=7,0)	5 mL
SDS 10%	10 mL
Fluoreto	0,42 g
Pirofosfato	0,45 g
Ortovanadato	0,189 g
Água ultrapura q.s.p	100 mL

5.7.1 Determinação da concentração de proteína muscular

A concentração de proteína muscular foi determinada por meio de ensaio colorimétrico utilizando o *kit BCA Protein Assay* (Pierce Biotechnology Rockford, IL, EUA). Esse método utiliza uma formulação detergente baseada no ácido bicinconínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação das proteínas totais. A leitura foi realizada por ELISA, com absorvância de 562 nm.

5.7.2 *Western Blotting*

5.7.2.1 Preparo do gel de poliacrilamida

Primeiramente, foram preparadas as soluções A, B e C de cada gel. Os reagentes de cada solução estão descritos no **quadro 3**.

Quadro 3. Descrição dos reagentes utilizados nas soluções A, B e C que compõe os géis de poliacrilamida.

Reagentes	Solução A	Solução B	Solução C
Acrilamida 30%	30 g	----	----
Bisacrilamida	0,8 g	----	----
Tris-Base 1,5 M (pH=8,8)	----	18,17 g	6,06 g
SDS 20%	----	2 mL	2 mL
Água ultrapura q.s.p	100 mL	100 mL	100 mL

Obs.: As soluções A e B estão presentes no gel de separação, enquanto as soluções A e C, no gel de empilhamento.

O gel de poliacrilamida foi preparado conforme protocolo de Sambrook e colaboradores (1989) e Harlow e Lane (1988). Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento ou empilhamento) 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 (gel de separação ou de corrida) foi preparado com 8% (somente para IRS-1 total e fosforilada) a 10% (demais proteínas) de poliacrilamida, 380 mM TrisHCl (pH 8,8), 0,1% persulfato de amônio e 0,077 % TEMED (**Quadro 4**).

Quadro 4. Descrição dos reagentes utilizados na preparação dos géis.

Reagentes	Gel de empilhamento	Gel de separação	
	5%	8%	10%
Água ultrapura (mL)	2,3	5,3	4,2
Solução A (mL)	670	2,7	3,3
Solução B (mL)	1	2,7	2,5
APS 10% (µL)	60	200	200
TEMED (µL)	18	25	25

5.7.2.2 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE

Os lisados de músculo foram preparados a partir das proteínas extraídas do tecido. Para IKK- β , JNK, AKT e NF- κ B, foram utilizadas 25 μ g de proteína muscular, enquanto para a IRS-1, foram utilizadas 100 μ g.

Ao extrato proteico foi adicionado de tampão Laemmli (4x concentrado, 100mM Tris HCL, pH 6,8, 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol) na proporção 4:1.

5.7.2.3 Empilhamento, corrida e transferência das proteínas

As amostras diluídas em tampão Laemmli foram pipetadas nos poços dos géis e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Como padrão, foi utilizado 5 μ L do marcador de peso molecular *ECL DualVue Western Blotting* (GE Healthcare Life Sciences, Munique, Alemanha).

Para o empilhamento, foi utilizado a corrente de 400 mA e 60 volts, enquanto para a corrida, foi utilizado a mesma corrente, porém com 120 volts. O tempo total varia de acordo com a proteína analisada. Em relação à IRS-1, foi utilizado 90 volts para a corrida das amostras.

Para a transferência, a membrana de nitrocelulose foi colocada por 10 segundos em água deionizada para sua ativação. E, em seguida, em tampão de transferência (25 mM tris-base, 192 mM glicina, 0,02% SDS, 10% metanol e água deionizada) pelo tempo de 10 minutos.

O sistema úmido foi utilizado na etapa de transferência (**Figura 3**). Para tanto, a montagem compreendeu a seguinte ordem: 1 esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm, gel, membrana, 2 folhas de 3 mm (Whatman) e 1 esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência gelado, sob corrente de 400 mA, 25 volts, por 90 minutos. Para IRS-1, estabeleceu-se corrente de 400 mA, 35 volts, durante 90 minutos.

Figura 3. Esquema de montagem do sistema úmido para etapa de transferência

A descrição dos reagentes do tampão de corrida e de transferência estão apresentadas no **quadro 5**.

Quadro 5. Descrição dos reagentes utilizados nas soluções do tampão de corrida e de transferência.

Reagentes	Tampão de corrida	Tampão de transferência
Tris-base	60,6 g	30,28 g
Glicina	288 g	144 g
SDS	20 g	2 g
Água ultrapura q.s.p	2 L	1 L

OBS.: Manter o pH das soluções entre 8,3 a 8,45. As soluções estão 10x concentras. Para o tampão de transferência, adicionar 100mL de metanol para cada 1 L de tampão 1x concentrado.

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 (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCl 0,9 %, 005% de Tween 20).

5.7.2.4 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados, por 90 minutos, com leite em pó desnatado Molico® (Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil),

na concentração de 5%, em tampão PBS com 0,05% de Tween 20 (PBST), sob agitação, na temperatura de 2 a 8 °C. A relação das concentrações dos anticorpos que foram utilizados para avaliar as expressões de IKK- β , JNK, AKT, IRS-1 e NF- κ B está descrita a seguir (**Tabela 2**).

Todos esses anticorpos foram diluídos em solução contendo leite em pó desnatado Molico®, a 3%, em tampão PBST, e foram utilizados para a incubação com as membranas, *overnight*, sob agitação, à temperatura de 2 a 8 °C. A membrana foi lavada 3 vezes, por 5 minutos, com PBST. As proteínas foram então marcadas com anticorpo anti-IgG de coelho (*Cell Signaling*, MA, EUA), conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:2.000 em tampão PBST com leite em pó desnatado Molico®, a 3%, por 1 hora, com agitação, na temperatura de 2 a 8 °C. Após, a membrana foi lavada com PBST 3 vezes, por 5 minutos, sob agitação.

Tabela 2 - Diluições dos anticorpos.

Anticorpos	Diluições*
Anti-fosfo IKK- α/β (Ser 176/180)	1:250
Anti-fosfo JNK (Thr183/Tyr 185)	1:500
Anti-fosfo AKT (Ser 473)	1:500
Anti-fosfo IRS-1 (Ser 307)	1:250
Anti-fosfo-NF- κ B (Ser 536)	1:500
Anti-IKK- β	1:250
Anti-JNK	1:1.000
Anti-AKT	1:1.000
Anti-IRS-1	1: 500
Anti- β -actina	1:50.000
Anti-IgG (secundário)	1:2.000

* Solução contendo 3% de leite em pó diluído em 10 mL de PBST.

5.7.2.5 Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura dos reagentes do kit ECL na proporção de 1:1 (1 parte da solução A para 1 parte da solução B). Essa solução foi colocada sobre a membrana de nitrocelulose, o que resulta em uma reação de quimioluminescência. A aquisição e a análise da imagem resultante foram feitas por meio de um sistema de imagem digital (IMAGE QUANT™ 400 versão 1.0.0, *Pittsburgh*, PA, EUA), utilizando o software ImageQuant™ Capture Software.

5.7.2.6 Normalização da proteína de interesse pela β -actina

Após a revelação com anticorpo secundário (IgG), a mesma membrana foi lavada mais 3 vezes por 5 minutos e, sob agitação, foi incubada com β -actina em tampão PBST com leite em pó desnatado Molico®, a 3%, por 1 hora,

na temperatura de 2 a 8°C.

5.7.2.7 Quantificação das proteínas de interesse

A quantificação da expressão das proteínas alvo foi realizada com o auxílio do programa *Quantity One 1-D Analysis*, versão 4.6.3 (Bio-Rad, CA, EUA).

5.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO MUSCULAR

Cada espécime de cada grupo foi submetido à necropsopia completa, por meio de incisão mentopubiana com abertura das cavidades torácica e abdominal, para a realização de exame macroscópico "*in situ*", a fim de se verificar não somente a topografia dos órgãos, presença ou ausência de coleção líquida anômala nas cavidades bem como o aspecto macroscópico dos mesmos. Fragmentos do sóleo foram imediatamente submetidos à fixação em formalina a 10%.

Passado um período de pelo menos 48 horas, fragmentos representativos de cada amostra fixada foram submetidos à inclusão em parafina e, cortes com 5 mm de espessura serão corados pela hematoxilina-eosina (MICHALANY, 1979). O tecido fixado permaneceu nos frascos para ser, posteriormente, utilizado em cortes por congelção para a realização de métodos histoquímicos para evidenciar gordura no citoplasma dos miócitos. Todos os preparados histológicos de cada espécime de cada grupo experimental foram observados em microscopia de luz para a leitura do histopatológico, seguida de descrição e documentação fotográfica para fins de ilustração.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram tabulados em planilhas do programa Excel versão 2007 (Microsoft Office®, EUA) e, a partir desses, foi realizada a análise estatística no programa *GraphPad Prism®* versão 5.01 (*GraphPad Prism Software Inc.*, CA, EUA).

Inicialmente, todas as variáveis foram avaliadas quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os resultados referentes ao efeito do consumo da ração hiperlipídica (até a 12ª semana de protocolo) dos grupos CONBL e HLBL foram avaliados utilizando teste F, seguido do teste t de *Student* para comparação das médias dos resultados. Já nas situações em que os resultados não apresentarem distribuição Gaussiana, aplicou-se o teste de *Mann-Whitney*.

Os resultados dos parâmetros relativos aos efeitos da ingestão do extrato aquoso de EM (*Ilex paraguariensis*) foram avaliados quanto à homogeneidade das variâncias (Testes de *Cochran C*, *Hartley*, *Bartlett*) e, posteriormente, foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de *Tukey* para identificação dos contrastes significantes. Nos casos em que não houve distribuição Gaussiana, foi aplicado um teste não paramétrico, com pós-teste de *Dunn*. Foi adotado $p < 0,05$ para todas as variáveis estudadas.

6. RESULTADOS

6.1 RESULTADOS REFERENTES À 1ª SEMANA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As rações experimentais (controle e HL) e a banha de porco foram analisadas quanto à composição de ácidos graxos. Os dados obtidos estão descritos na **tabela 3**. O percentual de ácidos graxos saturados totais da ração HL e da banha corresponde em média de 35 a 40%, ao mesmo tempo que o percentual de ácidos graxos monoinsaturados está entre 40 e 42%, valores esses superiores quando comparados à composição da ração controle.

As razões de $\omega 6:\omega 3$ também foram calculadas para as rações CON, HL e para a banha de porco, sendo as razões obtidas 9,7:1; 14,8:1 e 23,1:1, respectivamente.

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos (%) das rações experimentais e da banha de porco

Ácidos Graxos		CON	HL	Banha
C 14:0	Mirístico	0,8 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0
C 16:0	Palmítico	14,1 ± 0,0	23,2 ± 0,1	25,7 ± 0,7
C 18:0	Esteárico	4,4 ± 0,0	12,0 ± 0,2	12,8 ± 0,8
Saturados totais		19,3 ± 0,0	35,6 ± 0,2	39,9 ± 1,6
C 18:1 c (ω-9)	Oleico	27,1 ± 0,0	40,1 ± 0,1	41,9 ± 1,9
Monoinsaturados totais		27,1 ± 0,0	40,1 ± 0,1	41,9 ± 1,9
C 18:2 c n6 (ω-6)	Linoleico	48,4 ± 0,1	21,9 ± 0,2	17,3 ± 0,2
C 18:3 n6 (ω-6)	γ-linolênico	0,2 ± 0,0	ND	ND
C 18:3 n3 (ω-3)	Linolênico	4,9 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0
C 20:5 n3 (ω-3)	EPA	0,1 ± 0,0	ND	ND
ω-6 total		48,6 ± 0,1	21,9 ± 0,2	17,3 ± 0,2
ω-3 total		5,0 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Razão ω-6: ω-3		9,7:1	14,8:1	23,1:1
Poli-insaturados totais		53,6 ± 0,1	23,4 ± 0,2	18,1 ± 0,3

Resultados expressos em média ± desvio-padrão. Análise realizada em duplicata e triplicata. ND = Não detectado.

CON = ração controle; HL = ração hiperlipídica.

Na primeira semana do protocolo experimental, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos respectivos grupos experimentais, de acordo com o seu peso corporal, sendo que as médias de peso corporal entre os grupos não diferiram (**figura 4**). Nesse período, todos os animais foram submetidos ao oGTT (**figura 5A**) e ao ipITT (**figura 5B**), sem apresentarem diferença significativa entre os grupos em relação aos resultados obtidos em ambos os testes.

Figura 4. Distribuição dos animais nos grupos experimentais na primeira semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 12/\text{grupo}$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

CONBL: grupo *baseline* que consumiu ração controle até a 12ª do protocolo experimental.

HLBL: grupo *baseline* que consumiu ração hiperlipídica até a 12ª semana do protocolo experimental.

CON = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL = grupo que consumiu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM = grupo que consumiu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

HL+EM = grupo que consumiu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Figura 5. AUC do teste de tolerância oral a glicose -oGTT (A) e KiTT do teste de tolerância intraperitoneal a insulina-ipITT (B) de ratos *Wistar* no início do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n = 12/grupo).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

AUC=área sobre a curva; KiTT= taxa de decaimento por minuto da glicemia.

CONBL: grupo *baseline* que consumiu ração controle até a 12ª do protocolo experimental.

HLBL: grupo *baseline* que consumiu ração hiperlipídica até a 12ª semana do protocolo experimental.

CON = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo que consumiu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM = grupo que consumiu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

HL+EM = grupo que consumiu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

6.2 RESULTADOS REFERENTES À 12ª SEMANA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após 12 semanas do protocolo experimental, os animais do grupo HLBL não tiveram aumento significativo do peso corporal (**figura 6A**), bem como do percentual de ganho de peso (**figura 6B**) em relação ao grupo CONBL.

Figura 6. Curva de peso (A) e ganho de peso corporal (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 12/\text{grupo}$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

O grupo HLBL apresentou redução significativa de 24,2% na quantidade (g) de ração consumida, durante as 12 semanas, quando comparado ao grupo CONBL (**figuras 7A e 7B**). Todavia, o consumo energético médio semanal — exceto na décima segunda semana do protocolo (**figura 7C**) — e total (**figura 7D**) não diferiu estatisticamente entre os grupos HLBL.

Figura 7. Consumo médio semanal (A), total de ração em gramas (B), consumo médio em calorias (C) e total de ração em calorias (D) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 12$ / grupo). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 12$ / grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo CONBL.

O grupo HLBL apresentou valores de glicemia estatisticamente superiores ao grupo CONBL, em todos os tempos do oGTT (**figura 8A**), bem como a área sob a curva (AUC) foi estatisticamente maior em relação ao grupo CONBL (**figura 8B**).

Figura 8. Curva de glicemia do oGTT nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (A) e AUC (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) e submetidos ao teste de tolerância oral a glicose.

Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n = 12/grupo). * p < 0,05 em relação ao grupo CONBL. AUC: área sob a curva.

No tocante ao ipITT, verificou-se que o grupo HLBL apresentou valores de glicemia significativamente superiores nos tempos 0, 5, 30 e 40 minutos em comparação ao grupo CONBL(Figura 9A), porém, a taxa de decaimento da glicose (KiTT) (Figura 9B) não diferiu significativamente entre os grupos.

Figura 9. Curva glicêmica do ipITT nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos (A) e KiTT (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) e submetidos ao teste intraperitoneal de tolerância à insulina.

Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 12$ /grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL. KiTT= taxa de decaimento por minuto da glicemia.

Na **tabela 4** estão apresentados os resultados obtidos quanto ao peso dos coxins adiposos (g/ 100g do animal) e quanto à composição corporal dos animais (valores absolutos expressos em g). Podemos observar que o peso do coxim adiposo retroperitoneal foi estatisticamente superior no grupo HLBL em comparação ao grupo CONBL.

A **tabela 5** apresenta os resultados obtidos referentes aos parâmetros do sangue. Podemos observar que as concentrações de glicose, de colesterol total, de colesterol não-HDL e da proteína C reativa foram significativamente superiores no grupo HLBL em relação ao CONBL.

A **tabela 6** mostra a composição dos ácidos graxos plasmáticos. Podemos observar que o percentual do ácido palmítico e do ácido linoleico foi estatisticamente inferior no grupo HLBL em relação ao grupo CONBL, enquanto a concentração do ácido esteárico foi maior no grupo HLBL se comparado ao grupo CONBL.

Tabela 4. Peso relativo dos coxins adiposos e composição corporal dos animais

	CONBL	HLBL
Coxim adiposo periepididimal (g/100g)	2,7 ± 1,0	3,2 ± 0,6
Coxim adiposo retroperitoneal (g/100g)	2,0 ± 0,4	3,2 ± 0,8*
Soma dos coxins (g/100g)	4,4 ± 0,96	5,8 ± 1,9
Água (g)	256 ± 36	239 ± 17
Massa magra (g)	409 ± 61	394 ± 34
Lipídios (g)	94 ± 24	100 ± 22
Proteínas (g)	117 ± 32	110 ± 15
Cinzas (g)	25,6 ± 4,6	27,8 ± 4,2

Resultados expressos em média ± desvio-padrão (n=4-6/grupo). * difere significativamente (p<0,05) em relação ao grupo CONBL. CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

Tabela 5. Relação dos parâmetros sanguíneos analisados

Parâmetros	CONBL	HLBL
Glicose (mmol/L)	4,9 ± 0,4	5,5 ± 0,3*
Insulina (μU/mL)	23,5 ± 16,0	22,4 ± 5,1
Índice HOMA-IR	5,3 ± 3,9	5,5 ± 1,5
Índice QUICK	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3
Adiponectina (ng/mL)	13.515 ± 5.785	10.143 ± 3.373
PCR (ng/mL)	611 ± 260	1.002 ± 168*
Triacilgliceróis (mg/dL)	96,2 ± 20,1	104,5 ± 20,4
Colesterol total (mg/dL)	68,3 ± 7,1	79,3 ± 6,6*
HDL-colesterol (mg/dL)	21,8 ± 2,6	20,3 ± 1,4
Colesterol não-HDL (mg/dL)	46,5 ± 4,9	59,0 ± 6,3*
Ácidos graxos totais (nM/μL)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1

Resultados expressos em média e desvio-padrão (n= 6/grupo). * diferem significativamente (p<0,05) em relação ao grupo CONBL. CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

Tabela 6. Composição de ácidos graxos plasmáticos (%) de ratos *Wistar* na décima segunda semana do protocolo experimental

Ácidos graxos		CONBL	HLBL	P
C 10:0	Cáprico	ND	0,4 ± 0,2	
C 12:0	Láurico	ND	0,8 ± 0,4	
C 14:0	Mirístico	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,4	
C 16:0	Palmítico	21,1 ± 1,0	18,1 ± 1,9*	0,04
C 16:1	Palmitoleico	4,1 ± 0,9	ND	
C 18:0	Estearico	7,2 ± 0,7	12,8 ± 1,7*	0,01
Saturados totais		33,0 ± 9,0	33,3 ± 8,2	
C 18:1 c (ω-9)	Oleico	20,2 ± 2,1	18,1 ± 3,7	
Monoinsaturados totais		20,2 ± 2,1	18,1 ± 3,7	
C 18:2 c n6 (ω-6)	Linoleico	25,9 ± 2,5	18,5 ± 2,6*	0,01
C 20:4 n6 (ω-6)	Araquidônico	19,5 ± 2,9	23,8 ± 2,5	
C 18:3 n3 (ω-3)	α-Linolênico	ND	2,6 ± 0,9	
C 22:6 n3 (ω-3)	DHA	2,1 ± 0,1	ND	
C 20:5 n3 (ω-3)	EPA	ND	2,7 ± 0,9	
Poli-insaturados totais		47,5 ± 12,3	47,6 ± 10,9	

Resultados expressos em média ± desvio-padrão (n=4-6/grupo). *p<0,05 em relação ao grupo controle. A sigla ND representa ácidos graxos não detectados. CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

No que concerne à expressão proteica no tecido muscular, verificou-se pela quantificação da IKK- β , nas formas total (**Figura 10A**) e fosforilada (**Figura 10B**), que não houve diferença estatística entre os grupos. Todavia, a razão IKK- β fosforilada:total (**Figura 10C**) mostrou-se significativamente superior ($p=0,02$) no grupo HLBL em comparação ao grupo CONBL.

A expressão da JNK (formas total e fosforilada e razão JNK fosforilada:total) no músculo sóleo não diferiu entre os grupos estudados (**Figura 11**). A partir da **figura 12** verifica-se que não houve diferença significativa entre os grupos analisados em relação à expressão da AKT total e fosforilada e à razão AKT fosforilada:total. Similarmente, as proteínas IRS-1 fosforilada e total e o NF- κ B fosforilado não diferiram entre os grupos estudados (**figuras 13 e 14**).

Foram também realizadas a análise histológica do tecido muscular esquelético, a qual evidenciou que o tecido se manteve íntegro e bem preservado (**figura 15**).

Figura 10. Expressão da IKK-β total (A) e IKK-β fosforilada (Ser 180) (B) e razão da IKK- β fosforilada pela IKK- β total (C) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 5-6/grupo). UA = Unidades arbitrárias. *p < 0,05 em relação ao grupo controle.

CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

Figura 11. Expressão da JNK total (A) JNK fosforilada (Tyr 185) (B) e razão da JNK fosforilada pela JNK total (C) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5-6/\text{grupo}$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. UA = Unidades arbitrárias.

CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

Figura 12. Expressão da AKT total (A) e AKT fosforilada (Ser 473) (B) e razão da AKT fosforilada pela AKT total (C) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5-6$ /grupo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. UA = Unidades arbitrárias. Ins= Estímulo com 10U de insulina via veia porta.

CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

Figura 13. Expressão da IRS-1 total (A) e IRS-1 fosforilada (Ser 307) (B) e razão da IRS-1 fosforilada pela IRS-1 total (C) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 4-5/grupo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. UA = Unidades arbitrárias. Ins= Estímulo com 10U de insulina via veia porta.

CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

Figura 14. Expressão do NF-κB fosforilado (Ser 536) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3-6/\text{grupo}$). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. UA= Unidades arbitrárias.

CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

A **figura 15**, mostra a análise da avaliação histológica realizada no tecido muscular. Não foram observadas diferenças entre os grupos.

Figura 15. Fotomicrografia de corte histológico do músculo sóleo de animal do grupo CONBL (A), mostrando fibras com citoplasma e interstício preservados e do grupo HLBL (B), evidenciando o grau de preservação dos feixes de fibras e seus citoplasmas. Coloração: Hematoxilina Eosina. Aumento: 20x.

CONBL: grupo *baseline* alimentado com ração controle; HLBL: grupo *baseline* alimentado com ração HL.

6.3 RESULTADOS REFERENTES À 16ª SEMANA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL

6.3.1 Caracterização dos compostos bioativos do extrato aquoso da EM

Com base nos espectros de absorção UV e espectro de massas, foram identificados 11 compostos fenólicos, sendo quatro isômeros do ácido cafeoilquínico, três do ácido dicafeoilquínico, dois do ácido dicafeoilshimico e ainda a rutina e ácido feruloilquínico. Não foram encontrados os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico nas formas livres. A identificação dos compostos está descrita no cromatograma (**figura 16**), no espectro DAD (**figura 17**) e na **tabela 7**.

Figura 16. Cromatograma UPLC-DAD dos compostos fenólicos (A) ($\lambda = 324$ nm) e cafeína ($\lambda = 272$ nm) (B) presentes no extrato aquoso de erva-mate.

Figura 17. Espectro DAD (λ 220 a 400nm) dos compostos fenólicos e da cafeína presentes no extrato aquoso de erva-mate. Construção dos picos cromatográficos do ácido clorogênico (5-CQA) e de cafeína, detectados por UPLC/DAD/MS.

Tabela 7. Identificação e caracterização dos compostos fenólicos presentes na erva-mate e a ingestão média diária por animal

Compostos da erva-mate	Picos ^a	RT (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íon (s) produto (m/z)	Quantidade (mg/g extrato seco) ^b	Ingestão média diária (mg/animal) ^c	
						CON+EM	HL+EM
Ácido 3-cafeoilquínico	1	1,1	353	191, 2	17,1	8,7 ± 0,0	8,8 ± 0,0
Ácido cafeoilquínico	2	1,7	353	191, 2	0,8	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Ácido 5-cafeoilquinico	3	2,2	353	191	27,3	13,8 ± 0,1	14,1 ± 0,1
Ácido 4-cafeoilquínico	4	2,4	353	179	20,6	10,4 ± 0,1	10,6 ± 0,0
Ácido cafeoilshiquimico	5	4,5	335	160	1,9	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0
Ácido feruloilquinico	6	6,2	367	173	0,9	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Ácido cafeoilshiquimico	7	6,4	335	161	1,4	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0
Ácido di-cafeoilquinico	8	9,4	515	353	7,2	3,6 ± 0,0	3,7 ± 0,0
Ácido di-cafeoilquinico	9	9,6	515	353	9,3	4,7 ± 0,0	4,8 ± 0,0
Rutina	10	9,8	609	301	0,9	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Ácido di-cafeoilquinico	11	10,8	515	353	15,9	8,1 ± 0,0	8,2 ± 0,0
Total fenólicos					103,3	52,4 ± 0,3	53,3 ± 0,2
Cafeína			195	138	14,9	7,6 ± 0,0	7,7 ± 0,0
TOTAL					103,3	52,4 ± 0,7	53,3 ± 0,5

^a Refere-se à figura 17A. ^b Média de três replicatas. ^c Valores são expressos como média ± desvio-padrão, n = 8-12 animais/grupo.

6.3.2 Avaliação do efeito do extrato aquoso de erva-mate

Não se observou diferença estatística em relação ao peso corporal (**Figura 18A**) no período correspondente a 13^a e a 16^a semana de protocolo experimental. A **figura 18B** indica que a intervenção com EM promoveu redução no percentual de ganho de peso corpóreo dos animais submetidos à ração HL, sendo que o grupo HL+EM teve redução de, aproximadamente, 1% do peso, enquanto que o grupo HL teve aumento de cerca de 2% do peso em relação aos valores observados na 13^a semana do protocolo experimental.

Figura 18. Curva de peso (A) e percentual de ganho de peso (B) de ratos *Wistar* entre a 13^a e a 16^a semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n = 12/ grupo).

Barras com letras distintas diferem significativamente (p < 0,05).

CON= grupo com ração CON alimentado até a 16^a semana do protocolo experimental.

HL= grupo com ração HL alimentado até a 16^a semana do protocolo experimental.

CON+EM= grupo com ração CON alimentado até a 16^a semana e administrados com extrato aquoso de erva-mate a partir da 13^a semana do protocolo experimental.

HL+EM= grupo com ração HL alimentado até a 16^a semana e administrados com extrato aquoso de erva-mate a partir da 13^a semana do protocolo experimental.

Quanto ao consumo (g) médio semanal de ração, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais entre a 13^a e a 16^a semana do protocolo experimental (**Figura 19A**). Os animais alimentados com ração HL tiveram menor consumo total de ração (em gramas) em relação aos animais alimentados com a ração controle (**Figura 19B**). O consumo energético total de ração não diferiu entre os grupos ao final do protocolo experimental (**Figura 19 C e D**).

Figura 19. Consumo médio semanal (A), total de ração em gramas (B), Consumo médio em calorias (C) e total de ração em calorias (D) de ratos *Wistar* entre a 13^a. e a 16^a semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n = 12/ grupo).

Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).

CON= grupo com ração CON alimentado até a 16^a semana do protocolo experimental.

HL= grupo com ração HL alimentado até a 16^a semana do protocolo experimental.

CON+EM= grupo com ração CON alimentado até a 16^a semana e administrados com extrato aquoso de erva-mate a partir da 13^a semana do protocolo experimental.

HL+EM= grupo com ração HL alimentado até a 16^a semana e administrados com extrato aquoso de erva-mate a partir da 13^a semana do protocolo experimental.

Em relação à área sob a curva, calculada a partir dos valores de glicemia resultantes do oGTT (**Figura 20B**), nota-se que, 30 minutos após a carga de glicose, o grupo HL+EM apresentou glicemia significativamente maior em relação ao grupo CON+EM. Após 60 minutos de teste, o grupo que ingeriu a ração HL apresentou valores estatisticamente superiores de glicemia quando comparados ao grupo que consumiu a ração CON (**Figura 20A**).

Em relação ao teste de tolerância à insulina, os resultados mostram que após 5 e 10 minutos da carga insulínica, a intervenção com o EAEM melhorou a resposta à insulina nos animais que consumiram a ração HL+EM quando comparados ao grupo HL (**Figura 21**).

Figura 20. Curva de glicemia nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (A) e AUC (B) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental e submetidos ao teste de tolerância oral a glicose.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 12/\text{grupo}$). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$), onde: * CON+EM X HL+EM, # CON X HL. AUC: área sob a curva.

CON= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana e administrados com extrato aquoso de erva-mate a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

HL+EM= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana e administrados com extrato aquoso de erva-mate a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

Figura 21. Curva de glicemia nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos (A) e KiTT (B) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental e submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal a insulina.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio-padrão ($n = 12/\text{grupo}$). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$), onde: * HL X HL+EM. KiTT= taxa de decaimento por minuto da glicemia.

CON= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana e administrados com extrato aquoso de erva-mate a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

HL+EM= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana e administrados com extrato aquoso de erva-mate a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

Na **tabela 8** estão descritos os resultados obtidos quanto ao peso dos coxins adiposos e à composição dos animais. Podemos observar que não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 8. Peso relativo dos coxins adiposos e composição corporal dos animais.

	CON	HL	CON+EM	HL+EM
Coxim adiposo periepididimal (g/100g)	2,6 ± 0,9	2,6 ± 0,7	2,8 ± 1,3	3,4 ± 0,5
Coxim adiposo retroperitoneal (g/100g)	2,4 ± 0,6	2,5 ± 0,7	2,5 ± 1,0	2,6 ± 0,3
Soma dos coxins (g/100g)	5,1 ± 1,4	5,0 ± 1,4	5,3 ± 2,3	6,0 ± 0,3
Água (g)	269 ± 53	262 ± 32	280 ± 38	261 ± 30
Massa magra (g)	416 ± 48	412 ± 40	427 ± 53	412 ± 28
Lípidios (g)	100,1 ± 16,3	92,3 ± 24,9	84,5 ± 16,9	96,9 ± 7,2
Proteínas (g)	107 ± 32	112 ± 20	108 ± 31	113 ± 11
Cinzas (g)	22,4 ± 5,1	24,7 ± 4,1	21,4 ± 3,8	26,1 ± 3,1

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=4-6/grupo).

CON= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana e administrados com EAEM a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

HL+EM= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana e administrados EAEM a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

Na **tabela 9** estão apresentados os resultados obtidos a partir dos parâmetros sanguíneos. Podemos observar que as concentrações plasmáticas de proteína C reativa e TAG são significativamente superiores no grupo HL em relação ao grupo CON. A concentração de colesterol HDL apresentou significativa redução no grupo HL+EM em relação ao CON+EM, enquanto a concentração plasmática de colesterol total foi significativamente menor no grupo HL+EM quando comparada ao grupo HL. A concentração plasmática de

colesterol não-HDL não diferiu estatisticamente entre os grupos, quando realizado o pós teste de *Tukey*.

Tabela 9. Relação dos parâmetros sanguíneos analisados

Parâmetros	CON	HL	CON+EM	HL+EM
Glicose (mmol/L)	5,9 ± 0,6	5,4 ± 0,2	5,8 ± 0,8	5,6 ± 0,47
Insulina (μU/mL)	35,4 ± 12,0	27,1 ± 13,4	26,7 ± 15,7	28,3 ± 2,6
Índice HOMA-IR	9,2 ± 3,0	6,5 ± 3,1	7,1 ± 4,4	7,1 ± 1,0
Índice QUICK	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
Adiponectina (ng/mL)	17.073 ± 9.219	14.545 ± 6.623	15.218 ± 7.150	12.348 ± 4.696
PCR (ng/mL)	783 ± 195 ^a	1.151 ± 177 ^b	895 ± 134 ^{a,b}	1.114 ± 259 ^{a,b}
Triacilgliceróis (mg/dL)	95 ± 17 ^a	127 ± 24 ^b	101 ± 8 ^{a,b}	112 ± 20 ^{a,b}
Colesterol total (mg/dL)	76,5 ± 11,3 ^{a,b}	91,50 ± 10,8 ^a	76,2 ± 7,5 ^b	72,5 ± 10,5 ^b
HDL-colesterol (mg/dL)	23,8 ± 2,1 ^{a,b}	23,7 ± 2,0 ^{a,b}	25,2 ± 2,7 ^a	21,0 ± 1,8 ^b
Colesterol não-HDL (mg/dL)	52,7 ± 9,2	67,7 ± 9,7	52,0 ± 6,4	56,0 ± 8,2
Ácidos graxos totais (nM/μL)	0,18 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1

Resultados expressos em média e desvio padrão (n= 6/grupo). Letras distintas diferem significativamente (p<0,05) entre os grupos.

CON= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana e administrados com EAEM a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

HL+EM= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana e administrados EAEM a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

A **tabela 10** apresenta a composição do perfil dos ácidos graxos plasmáticos. Nota-se que o percentual do ácido graxo esteárico foi significativamente superior no grupo HL quando comparado ao grupo CON.

Tabela 10. Composição plasmática de ácidos graxos (%)

Ácidos graxos		CON	HL	CON+EM	HL+EM
C 10:0	Cáprico	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	ND	ND
C 12:0	Láurico	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,3	ND	0,5 ± 0,5
C 14:0	Mirístico	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,9 ± 1,0
C 16:0	Palmítico	20,8 ± 1,2	17,8 ± 1,9	20,0 ± 0,9	13,2 ± 8,9
C 18:0	Esteárico	8,1 ± 0,8 ^a	13,8 ± 2,3 ^b	8,6 ± 1,2 ^{a,b}	12,3 ± 3,8 ^{a,b}
Saturados totais		30,2 ± 8,9	33,2 ± 8,5	29,3 ± 9,7	26,9 ± 6,9
C 18:1 c (ω-9)	Oleico	16,9 ± 1,6	17,5 ± 4,6	16,3 ± 3,3	14,3 ± 2,3
Monoinsaturados					
totais		16,9 ± 1,6	17,5 ± 4,6	16,3 ± 3,3	14,3 ± 2,3
C18:2 c n6 (ω-6)	Linoleico		17,2 ±		
		22,4 ± 2,6 ^a	2,2 ^{a,b}	22,7 ± 1,8 ^{a,b}	15,5 ± 2,8 ^b
C 20:4 n6 (ω-6)	Araquidônico	22,7 ± 2,7	25,5 ± 6,0	25,0 ± 4,6	20,5 ± 6,2
C 18:3 n3 (ω-3)	Linolênico	1,2 ± 0,3	2,5 ± 0,2	1,1 ± 0,3	2,1 ± 2,3
C 20:5 n3 (ω-3)	EPA	ND	ND	ND	ND
C 22:6 n3 (ω-3)	DHA	2,6 ± 1,3	1,6 ± 0,5	1,9 ± 0,3	1,3 ± 0,8
Poli-insaturados					
totais		49,0 ± 10,9	46,8 ± 11,6	50,7 ± 12,9	39,4 ± 9,6

Resultados expressos em média ± desvio padrão(n=3-6/grupo). ND=não detectado.

Grupos com letras distintas diferem significativamente (p<0,05).

CON= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM= grupo com ração CON alimentado até a 16ª semana e administrados com EAEM a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

HL+EM= grupo com ração HL alimentado até a 16ª semana e administrados EAEM a partir da 13ª semana do protocolo experimental.

A expressão das proteínas IKK- β (**Figura 22**), JNK (**Figura 23**) e IRS-1 (**Figura 25**) no músculo sóleo não diferiu significativamente entre os grupos estudados. Em relação à expressão da proteína AKT (**Figura 24 A e B**) não houve diferença entre os grupos. Quanto à razão AKT fosforilada pela AKT total, o pós-teste de *Tukey* realizado não permitiu avaliar a diferença entre os grupos.

Figura 22: Expressão da IKK-β total (A) e IKK- β fosforilada (Ser 180) (B) e razão da IKK- β fosforilada pela IKK-β total (C) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 5-6/grupo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. *UA = Unidades arbitrárias.

CON = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .

HL+EM = grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Figura 23: Expressão da JNK total (A) e JNK fosforilada (Tyr 185) (B) e razão da JNK fosforilada pela JNK total (C) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 5-6/grupo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. *UA = Unidades arbitrárias.

CON = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL = grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

HL+EM = grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Figura 24: Expressão da AKT total (A) e AKT fosforilada (Ser 473) (B) e razão da AKT fosforilada pela AKT total (C) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental e imagens de Western Blotting (D).

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5-6/\text{grupo}$). *Barras com letras distintas, diferem significativamente ($p < 0,05$). UA = Unidades arbitrárias. Ins = Estímulo com 10 U de insulina via veia porta.

CON = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL = grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

HL+EM = grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Figura 25. Expressão da IRS-1 total (A) e IRS-1 fosforilada (B) e razão da IRS-1 fosforilada pela IRS-1 total (C) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental e as imagens obtidas no Western Blotting (D).

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3-6/\text{grupo}$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. UA = Unidades arbitrárias. Ins= Estímulo com 10 U de insulina via veia porta.

CON = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .

HL+EM = grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

A expressão do NF- κ B (**Figura 26**) apresentou diferença estatística ($p=0,03$) entre os grupos experimentais, porém, o pós-teste de *Tukey* não permitiu identificar possíveis diferenças entre os grupos estudados..

Figura 26. Expressão do NF- κ B fosforilado (Ser 536) no músculo sóleo de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5-6$ /grupo). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

CON = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental.

HL= grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental.

CON+EM = grupo que ingeriu ração controle até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .

HL+EM = grupo que ingeriu ração hiperlipídica até a 16ª semana do protocolo experimental e administrados com EAEM entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Em função dos resultados obtidos a partir da histologia do músculo esquelético dos animais com 12 semanas de protocolo, optamos por não analisá-la com 16 semanas, uma vez que o consumo da ração HL não promoveu acúmulo de lipídios intramusculares.

7. DISCUSSÃO

7.1 EFEITO DA INGESTÃO ISOCALÓRICA DA RAÇÃO HL

A indução da obesidade ou do excesso de peso pela administração crônica da ração HL pode ser alternativa em estudos envolvendo ratos e camundongos (YORK, 1996). As rações HL mais utilizadas possuem teor de lipídios de 30% a 78% do valor energético total (BUETTNER et al., 2007).

No presente estudo, a ração HL utilizada, apesar de possuir teor de lipídios correspondente a 59% do valor calórico total e densidade energética distinta entre as rações (5,5 Kcal/g na ração HL comparado com 3,9 Kcal/g na ração CON), não propiciou aumento do peso corporal, diferentemente dos resultados observados em outros estudos (TAKEUCHI, 1995; WOODS et al., 2002; YANG et al., 2007). Tal fato pode estar associado ao consumo isocalórico da ração HL, que foi ajustada por densidade energética, a fim de se evitar reduzido consumo de vitaminas e de minerais no grupo HL em comparação ao grupo CON (COHEN-LAHAV et al., 2006; WINTERGERST et al., 2007).

De acordo com Buettner e colaboradores (2007), pequena parte dos animais submetidos à ração HL não desenvolve obesidade. Corroborando com este fato, Cabeço e colaboradores (2010) verificaram que ratos *Wistar*, machos, submetidos ao consumo da ração HL — dieta de cafeteria, composta por amendoim, bolacha *wafer*, leite condensado, farinha de soja e óleo de milho —, *ad libitum*, apresentaram diferenças quanto ao ganho de peso e, desse modo, os animais foram classificados em dois grupos: (i) resistente e outro (ii) propenso à obesidade.

A ingestão de AGS favorece os depósitos de gordura e acúmulo de tecido adiposo visceral, que, por sua vez, está associado à etiologia de morbididades crônicas, como *diabetes mellitus* tipo 2 e DCV (SPEAKMAN et al., 2007; WINZELL, AHRÉN; 2004). Em nosso estudo, não foi verificado diferenças na composição química da carcaça, porém, o coxim retroperitoneal

teve peso superior no grupo HLBL em relação ao CONBL, o que pode estar associado ao comprometimento da resposta glicêmica dos animais que receberam a ração HL, conforme observado nos testes de ipITT e oGTT, mostrando que a distribuição de gordura intra-abdominal é determinante na sensibilidade à insulina (WOODS et al., 2002; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

Corroborando com nossos resultados, De Assis e colaboradores (2009) constataram que ratos *Wistar*, que receberam ração HL (59% de lipídios, tendo como fonte a banha de porco), *ad libitum*, pelo período de 12 meses, tiveram aumento significativo do peso dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal, cujos resultados foram associados com a resistência à ação da insulina, a qual foi caracterizada pela realização do OGTT e ITT.

Embora no presente estudo não se tenha observado alteração nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos totais, é importante ressaltar que a elevação da concentração de AGNE pode favorecer a gliconeogênese no tecido hepático devido ao aumento da produção de ATP e de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo), além da ativação da piruvato carboxilase pela acetil-CoA, resultante da oxidação dos AG. Tal condição contribui para o aumento da glicemia, tanto pós-prandial, quanto em longo prazo, caracterizando o quadro de hiperglicemia (BODEN, 1997; BODEN, 2002).

Se por um lado não observamos diferenças na concentração plasmática de adiponectina, adipocina anti-inflamatória, que está reduzida em animais obesos (MULLEN et al., 2009), por outro lado, foi verificada concentração significativamente elevada da proteína C-reativa, decorrente do aumento da resposta inflamatória induzida pelo consumo de AGS (LOPEZ-GARCIA, 2005). Esse resultado sugere que a ingestão crônica da ração HL tenha estimulado a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e o TNF- α , os quais aumentam a expressão da proteína C reativa em hepatócitos. (LIUZZO et al., 2007; JIALAL; DEVERAJ, 2007). Cabe ressaltar que a proteína C reativa é considerada relevante marcador de risco cardiovascular, sendo

fator pró-aterosclerótico com papel causal no desenvolvimento da doença cardíaca (EVERETT et al., 2006; MANTECUCCO; MACH, 2008).

Machado e colaboradores (2010), utilizando camundongos recém-desmamados *knockout* (LDLr-KO) para o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), mostraram que a administração, por 16 semanas, de três tipos de rações hiperlipídicas: (i) rica em ácidos graxos (AG) *trans* (40% do valor energético total); (ii) rica em AG poli-insaturados; e (iii) rica em AG saturados, induziu esteatose hepática nos animais. O grupo que ingeriu AG *trans* apresentou hipercolesterolemia severa, além do aumento das concentrações séricas de TAG, VLDL-c e LDL-c em relação aos demais grupos experimentais.

Em nosso modelo experimental, os animais HLBL demonstraram concentrações superiores de colesterol não-HDL. O colesterol não-HDL representa toda apolipoproteína B aterogênica, que contém lipoproteínas (LDL-c, VLDL-c e IDL-c), além de quilomícrons e quilomícrons remanescentes (ROBINSON, 2009). Estudos apontam a elevação das taxas de colesterol não-HDL como preditor na mortalidade por DCV (CUI et al., 2001; FUKUSHIMA et al., 2012). A Diretriz do NCEP III (do inglês *Third Report of the National Cholesterol Education Program*) recomenda que as concentrações de colesterol não-HDL não ultrapassem 30 mg/dL a mais em relação à concentração de LDL-c (NCEP, 2002).

Ao analisar a concentração plasmática dos diferentes ácidos graxos dos animais, foi observado que o ácido graxo esteárico foi encontrado em maior proporção no grupo HLBL, ao passo que os ácidos graxos palmítico e linoleico tiveram menor percentual quando comparados ao grupo CONBL.

Varma e colaboradores (2009) estudaram os efeitos do ácido palmítico sobre a ação da insulina em culturas de miotubos oriundos da biópsia de tecido muscular de indivíduos obesos. A presença de ácido palmítico aumentou a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6, bem como da proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1, a qual é responsável pelo recrutamento de monócitos, a partir da circulação sanguínea, para o

tecido. No entanto, em nosso modelo não encontramos diferenças significativas quanto ao percentual plasmático total de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados entre os grupos.

Em nível molecular, ácidos graxos saturados provenientes da dieta, por exemplo, podem se ligar aos receptores do tipo *toll like* (TLR)-2 e TLR-4 e induzir sua ativação (BEUTLER, 2009). A supressão da sinalização da via da insulina, comumente observada na obesidade e no *diabetes mellitus* tipo 2, está relacionada à via de sinalização do TLR-4, a qual culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B e, consequentemente, no aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e moléculas de adesão (MANAVALAN; BASITH; CHOI, 2011).

O aumento da adiposidade é capaz de ativar a cascata inflamatória em tecidos alvo como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). No presente estudo, foi avaliada a expressão proteica muscular da IKK- β e da JNK, as quais são capazes de ativar a via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B. Evidências apontam a relação da IKK- β com prejuízos na via de sinalização à insulina (YUAN, 2001; JIAO et al., 2011). Também já se conhece o papel central da ativação da JNK na obesidade e na resistência à insulina (HIROSUMI et al., 2002).

Foram notados aumento significativo ($p=0,02$) da expressão da IKK- β (razão fosforilada:total) dos animais HLBL em relação ao grupo CONBL, fato que pode ser atribuído ao consumo da ração HL, indicando o potencial dos AGS em favorecer a resposta inflamatória no músculo esquelético, o que também pode justificar as alterações no perfil lipídico e a resistência periférica à insulina observada nos animais HLBL por meio da realização do oGTT e do iplTT.

Yaspelkis e colaboradores (2009) submeteram 32 ratos machos *Sprague-Dawley* a dois tipos de ração, utilizando óleo de coco como fonte de lipídios: (i) controle (20% do valor calórico total) e (ii) HL (59% do valor calórico total) pelo período de 12 semanas. Ao final do protocolo, a partir dos músculos quadríceps e gastrocnêmio, os pesquisadores observaram que a ração HL foi

capaz de induzir aumento significativo da IKK- α/β fosforilada e, posterior, redução do inibidor do NF- κ B (IkB α), o que evidencia a ativação da via de sinalização do NF- κ B nesse modelo experimental. Além disso, foram observados aumento da expressão gênica do TNF- α , sugerindo assim que o teor dos lipídios da ração não somente ativa a cascata inflamatória, como também compromete a sinalização celular da insulina.

Pelo fato da ativação da IKK- β ser capaz de fosforilar o resíduo 307 do IRS-1 e, desse modo, prejudicar a via de sinalização da insulina, investigamos a expressão de outras proteínas quinases, como a JNK, mas diferentemente dos resultados encontrados por Hirosumi e colaboradores (2002), o presente estudo não demonstrou ativação da JNK no tecido muscular.

De acordo com Mullen e colaboradores (2010), o tempo de exposição à ração HL parece influenciar a resposta inflamatória. A administração aguda de ração HL (60% do valor calórico total), por 3 dias, em ratos machos *Sprague-Dawley* não foi eficaz em induzir a inflamação no músculo sóleo dos animais tratados, visto que não houve ativação de proteínas envolvidas na via do fator de transcrição NF- κ B.

A redução da atividade do IRS-1 implica na redução da ativação da PI3K, diminuindo a fosforilação da AKT e reduzindo a translocação de vesículas de GLUT-4, o que acarreta na redução da captação de glicose pela célula e favorece o quadro de hiperglicemia (YU et al., 2002; SOLINAS e KARIN, 2010).

Em nosso estudo, a ingestão isocalórica da ração HL provocou, no músculo sóleo, a ativação da proteína quinase IKK- β , a qual independentemente da ativação de outras proteínas como a JNK e mesmo sem apresentar alterações na expressão proteica da AKT, do IRS-1 e do NF- κ B, está envolvida em mecanismos relacionados à resistência à ação da insulina.

Em relação à análise histológica do músculo sóleo, foi observado que o grupo HLBL apresentou integridade e preservação das fibras musculares, com ausência de lipídios intracelulares. Todavia, em outro estudo do nosso grupo,

utilizando os mesmos animais, foi verificado, no tecido hepático, que um terço dos ratos do grupo HLBL apresentou discreta degeneração microgoticular, indicando infiltração de lipídios no tecido hepático (JACOB et al., 2013), mostrando que, apesar do músculo sóleo não ter apresentado acúmulo intracelular de lipídios, a ingestão da ração HL promoveu acúmulo de lipídios no fígado dos animais do grupo HL.

7.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (EAEM)

A partir da identificação e caracterização dos compostos fenólicos e da cafeína presentes na erva-mate, foram encontrados 103,3 mg de compostos fenólicos totais/g de extrato seco, o que permitiu no consumo médio diário de 53,4 mg no grupo CON+EM e 53,3 mg no grupo HL+EM. A quantidade de cafeína foi de 15 mg/g de extrato seco, resultando no consumo médio diário de 8 mg e 9 mg nos grupos CON+EM e HL+EM, respectivamente.

Dentre os compostos fenólicos, o ácido clorogênico (5-CQA) apresentou quantidade de 27,3 mg/g, representando o maior conteúdo (26,4%). Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Pang e colaboradores (2008), em que o percentual de ácido clorogênico das amostras analisadas variou de 24-30%.

Arçari e colaboradores (2009) também avaliaram o chá mate instantâneo e verificaram que os compostos fenólicos totais representaram 348,8 mg/g de extrato seco, sendo que a maior quantidade foi de 5-CQA (32,3 mg/g de extrato), seguida da cafeína (5,8 mg/g de extrato).

Filip e colaboradores (2001), analisaram a composição química de espécies de *Ilex paraguariensis* da Argentina (região de *Misiones*) e espécies de *Ilex ssp* do Brasil (Paraná) e da Argentina (*Misiones* e *Tacumán*). Os resultados apontaram que a *I. paraguariensis* apresentou maior conteúdo significativo de cafeoil-derivados e flavonóides, seguido das concentrações dos ácidos caféico, clorogênico e 3-dicafeoiquínico em relação às *Ilex ssp*.

Anesini e colaboradores (2012) verificaram maiores quantidades significativas de ácido cafeico, de cafeína e de rutina nas folhas de mate verde em relação ao mate comercial, que apresentou concentração estatisticamente elevada ($p < 0,05$) do ácido clorogênico quando comparado com o mate verde.

Em nosso estudo, verificamos que após 16 semanas de protocolo experimental, os animais não diferiram quanto ao peso final. No entanto, verificamos que da 13ª até a 16ª semana (período de 4 semanas de

intervenção), a administração oral com EAEM (1 g/Kg peso corporal) promoveu a redução significativa de 1% do peso corporal dos animais HL+EM. Ao mesmo tempo, observamos ganho de peso de 2% nos animais HL não suplementados com EM.

Semelhantemente, Arçari e colaboradores (2009) observaram que a administração por 8 semanas de 1,0 g/Kg de peso corporal/dia de chá mate instantâneo em camundongos *Swiss*, que ingeriram ração HL (52% do valor calórico total), diminuiu significantemente o peso corpóreo final nos animais do grupo HL em relação aos demais grupos. Do mesmo modo, camundongos ddY (modelo diabético) alimentados com ração HL (45% do valor calórico total) e que receberam o EAEM na dose de 100 mg/Kg de peso corporal/dia, por três semanas, apresentaram redução significativa da quantidade de ração ingerida e do peso corporal final (HUSSEIN et al., 2011).

No entanto, diferentemente de outros trabalhos (ARÇARI et al., 2009; CHO et al., 2010), no presente estudo não foram observadas alterações significativas nos pesos dos coxins adiposos, tampouco na composição corporal dos animais.

Uma das explicações encontradas para se compreender o efeito termogênico da EM se refere à presença de metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina) contidas no extrato de EM (PANG et al., 2008). Martinet e colaboradores (1999) testaram os efeitos termogênicos de 12 preparações comerciais à base de plantas, dentre elas a *Ilex paraguariensis*. Participaram do estudo estudantes universitários, sendo 40 mulheres e 57 homens, distribuídos em 14 grupos. Foram monitorados os batimentos cardíacos, a pressão sanguínea e o coeficiente respiratório 30 minutos antes e 45 minutos depois da ingestão das preparações. A *Ilex paraguariensis* não alterou a pressão sanguínea, no entanto, diminuiu os batimentos cardíacos e o coeficiente respiratório dos 6 voluntários, indicando melhora da oxidação de lipídios e, possivelmente, colaborando com a redução de gordura corporal.

Em ratos *Sprague-Dawley* alimentados com ração HL (40% do valor calórico total) e suplementados com *I. paraguariensis*, na dose de 2,4 g/Kg de

ração HL, por 8 semanas, verificou-se que o peso corporal final, o ganho de peso e o peso dos coxins adiposos (epididimal, perirenal e mesentérico) reduziram significativamente em relação ao grupo HL não suplementado. A suplementação também foi eficaz em aumentar significativamente a expressão da proteína quinase ativada por AMP, sugerindo aumento da lipólise no tecido adiposo visceral (PANG et al., 2008).

Outro possível mecanismo para explicar os efeitos termogênicos da EM, seria a ativação de proteínas desacopladoras, denominadas UCP. O tecido adiposo marrom possui UCP1, enquanto o músculo esquelético expressa a UCP2 e a UCP3, tais proteínas podem ser ativadas pelo frio ou pela alimentação (em resposta à termogênese) (BOIVIN et al., 2000).

Há indícios de que a UCP4 e a UCP5 possam ser expressas no cérebro. Além disso, estímulos como o frio quanto e a ingestão de alimentos podem ativar o sistema nervoso simpático, promovendo liberação de noradrenalina, aumentando a concentração de AMPc (adenosina monofosfato cíclico), que por sua vez, ativa a lipase e posteriormente, a β -oxidação (ARGILÉS et al., 2002).

Nesse sentido, estudos apontam que no tecido adiposo marrom de roedores alimentados com ração HL e suplementados com EM, há aumento significativo da expressão gênica de UCP1 e UCP2 quando comparados aos animais HL não suplementados (PANG et al., 2008; ARÇARI et al, 2009; ARÇARI et al., 2011).

Somado a esse fato, Arçari e colaboradores (2009 e 2011), demonstraram que a expressão gênica da proteína coativadora de PPAR- γ (receptor γ ativado por proliferadores de peroxissoma), denominada PGC1- α estava significativamente reduzida nos animais do grupo HL, o que representa diminuição do gasto energético. No entanto, os níveis dessa proteína foram recuperados no grupo HL após a suplementação com EM, evidenciando o potencial efeito termogênico da EM.

Cabe destacar que a PGC1- α é uma proteína chave no metabolismo energético, devido à sua atuação em estimular a biogênese mitocondrial e promover remodelamento da composição das fibras musculares, participando

ainda da regulação do metabolismo dos lipídios e dos carboidratos (LIANG; WARD, 2006; BOSTRÖM et al., 2012).

Em nosso trabalho, a administração oral do EAEM promoveu melhora da sensibilidade à insulina nos animais do grupo HL, assemelhando-se aos resultados já vistos em trabalhos publicados anteriormente na literatura científica (ARÇARI et al., 2011; PEREIRA et al., 2012).

A administração *ad libitum* de EM também parece influenciar na resposta glicêmica. Neste sentido, Przygodda e colaboradores (2010) submeteram ratos *Wistar* a dois tipos de rações, HL (33,21% do valor calórico total) e hiperglicídica (56,35% do valor calórico total), com acesso livre ao chá mate em substituição à água, durante 8 semanas. A ingestão média de líquidos nos grupos tratados foi de 25 mL/dia/animal, enquanto a ingestão de água no grupos controles foi de 35mL/dia/animal. Em ambos os grupos tratados, os autores verificaram redução significativa da glicemia de jejum.

Uma das hipóteses propostas para explicar a ação da EM sobre o metabolismo da glicose se deve ao papel do ácido clorogênico em inibir a enzima glicose-6-fosfatase, que é responsável por catalisar a etapa final da glicogenólise e gliconeogênese, cujo fato promove redução da liberação hepática de glicose (HEMMERLE et al., 1997). Bassoli e colaboradores (2008), por meio de ensaio *in vitro*, confirmaram os efeitos inibitórios do ácido clorogênico na atividade da glicose-6-fosfatase.

A ingestão da EM também pode controlar a absorção de glicose pela redução da expressão gênica do co-transportador de glicose no intestino delgado, denominado SGLT-1 (transportador 1 ativo de glicose dependente de sódio) (OLIVEIRA et al., 2008). O SGLT-1 é o principal co-transportador de glicose no intestino delgado e sua expressão gênica pode ser regulada pela quantidade de carboidratos e de íons de sódio, além de compostos fenólicos como catequinas presentes no lúmen intestinal que são capazes de interagir com esse co-transportador (FERRARIS, 2001).

Em geral, animais alimentados com ração rica em ácidos graxos saturados apresentam perfil hiperlipidêmico (MACHADO et al., 2010). Desse

modo, investigamos os efeitos da ingestão de EM no perfil lipídico dos animais e encontramos melhora nas concentrações plasmáticas de colesterol total e de colesterol não-HDL. O perfil de ácidos graxos plasmáticos não demonstrou diferenças nos animais HL+EM.

Similarmente, Kang e colaboradores (2012) demonstraram que independente da dose (1 g ou 2 g/Kg/peso corporal), os animais apresentaram redução de colesterol total e LDL-c, sem alterações no TAG ou HDL-c. Já em ratos *Wistar* machos que receberam EAEM na dose de 2 g/Kg/peso corporal durante 12 semanas, apresentaram redução significativa de TAG, mas não de colesterol total (DE ANDRADE et al., 2012). Contraditoriamente, Silva colaboradores (2011) não encontraram diferenças no perfil lipídico tanto na administração do extrato comercial quanto do extrato bruto.

Os ácidos clorogênico e cafeico são capazes de reduzir a biossíntese de colesterol em culturas de hepatócitos e em fígados de ratos hipercolesterolêmicos, por meio da redução da atividade da HMG-CoA redutase (3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A) (GEBHARDT, 1998; CHO et al., 2010; KARTHIKESAN et al., 2010).

As saponinas que também estão presentes na EM parecem atuar no metabolismo do colesterol e, tardiamente, interferem na absorção intestinal por meio da inibição da atividade da lipase pancreática (HAN et al., 2002; MARTINS et al., 2009).

Além disso, as catequinas e a cafeína reduzem a solubilidade das micelas (IKEDA et al., 1992; WANG; NOH; KOO, 2006) — o que contribui para a diminuição da absorção intestinal de colesterol —, enquanto as quercetinas aumentam a excreção de colesterol nas fezes (BOK et al., 2002).

No presente estudo, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos no tocante à avaliação da expressão das proteínas quinases (IKK- β , JNK, NF- κ B, AKT e IRS-1). Diferentemente, Arçari e colaboradores (2011) encontraram aumento da expressão proteica do IRS1 (Tyr) e da AKT no músculo sóleo dos camundongos do grupo HL suplementados com EM, mostrando que o tratamento melhorou a sensibilidade à insulina.

Em ratos *Sprague-Dawley*, a administração aguda de cafeína (60 minutos antes da eutanásia), por meio de injeção via veia caudal, na dose de 5 mg/Kg peso corporal, mostrou que a cafeína bloqueou a expressão proteica da AKT fosforilada (Ser 473) e induziu a expressão proteica do IRS-1 (Ser 307) no tecido muscular dos animais, sugerindo redução do transporte de glicose nesse tecido (EGAWA et al., 2011).

Um dos motivos relacionados à diversidade dos efeitos da administração do EM se refere à absorção dos compostos bioativos presentes no chá mate. Sabe-se que os ácidos clorogênico e cafeico são absorvidos em humanos (OLTHOF et al, 2001) e em roedores (AZUMA et al., 2000). Estudos com animais têm demonstrado que na infusão gástrica de ácido clorogênico isolado (5-CQA) somente uma parte é absorvida intacta no estômago (LAFAY et al., 2006). Ácidos hidroxicinâmicos, incluindo o 5-CQA, podem sofrer ação enzimática na mucosa intestinal e em outros tecidos, como no fígado (KONISHI et al., 2006).

Além disso, os compostos fenólicos podem formar conjugados sulfatados, glicuronados e sofrer metilação por meio de mecanismo semelhantes ao reconhecimento e detoxificação de xenobióticos, com eliminação via bile e urina (D'ARCHIVIO et al., 2007; OLTHOF et al, 2001).

Konishi e colaboradores (2006) verificaram que, após 5 minutos da administração de ácidos fenólicos, a concentração desses compostos foram determinadas na veia porta e na artéria abdominal de ratos *Wistar*. Os autores ainda mostraram que os níveis não metabolizados de ácido clorogênico na veia porta e na artéria abdominal foram de 0,12 e 0,04 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, o que corresponde à eficácia da absorção gástrica, a qual foi determinada pela concentração plasmática. Cabe ressaltar que a ingestão diária de compostos bioativos nem sempre diz respeito à dose que atingirá o alvo fisiológico, fato que pode elucidar a falta ou a inconsistência da correlação entre dados epidemiológicos e estudos de intervenção (BASTOS et al., 2011).

Somado à esse fato, torna-se relevante considerar os hábitos alimentares que variam entre as populações. Quando se trata do consumo de

chás, mesmo que a ingestão média diária seja 1 L, essa quantidade nem sempre é representativa se compararmos ao conteúdo de compostos bioativos e, particularmente em nosso caso, utilizando a dose adotada de 1 g/Kg peso, a ingestão para uma pessoa com 70 Kg, seria de 2,8 L, quase três vezes mais do consumo habitual na população em geral.

8. CONCLUSÃO

O consumo isocalórico da ração HL não promoveu ganho de peso, porém, influenciou no aumento da adiposidade, prejudicou a resposta glicêmica e alterou o perfil lipídico, além de provocar aumento da concentração plasmática da proteína C reativa, bem como ativou uma proteína quinase envolvida na resposta inflamatória no tecido muscular. Por outro lado, a administração do EAEM reduziu o peso corporal e melhorou a sensibilidade à ação da insulina e o perfil lipídico dos animais alimentados com a ração HL, contribuindo assim para a redução do risco cardiovascular.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*. 2006 May 14;71(10):1397-421.
2. Albanese AA, Orto LA. Protein and amino acids. In: Albanese AA, ed. *Newer methods of nutritional biochemistry: with applications and interpretations*. New York: Academic Press, 1963. 1, p.84.
3. Anesini C, Turner S, Cogoi L, Filip R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Science and Technology*. 2012, 45: 299-304.
4. Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, de Souza MF, Saad MJ, Bastos DH, Gambero A, Carvalho Pde O, Ribeiro ML. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Dec;17(12):2127-33.
5. Arçari DP, Bartchewsky W Jr, dos Santos TW, Oliveira KA, DeOliveira CC, Gotardo ÉM, Pedrazzoli J Jr, Gambero A, Ferraz LF, Carvalho Pde O, Ribeiro ML. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Mar 30;335(2):110-5.
6. Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 17;293(4):1145-52.
7. Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem*. 2000 Nov;48(11):5496-500.

8. Bassoli BK, Cassolla P, Borba-Murad GR, Constantin J, Salgueiro-Pagadigorria CL, Bazotte RB, da Silva RS, de Souza HM. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochem Funct.* 2008 Apr;26(3):320-8.
9. Bastos DH, Fornari AC, Queiroz YS, Soares RAM, Torres EAFS. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages *acta farmaceutica bonaerense*. 2005, 24: 91-95.
10. Bastos DHM, Fornari AC, Quiroz YS, Torres EAFS. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*. 2006, 49 (3): 399-404.
11. Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya AC, Cunha IB, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*. 2007a Mar 12;12(3):423-32.
12. Bastos DHM, Oliveira DM. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*. 2011, 34(6): 1051-1056.
13. Bastos DHM, Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PO, Ribeiro ML. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 2007b,1:37-46.
14. Bastos DHM, Torres EPFS. Bebidas à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. *Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nut*. 2003, 26: 77-89.

15. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2005 May 13;96(9):939-49.
16. Borges MC, Vinolo MA, Crisma AR, Fock RA, Borelli P, Tirapegui J, Curi R, Rogero MM. High-fat diet blunts activation of the nuclear factor- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages of Wistar rats. *Nutrition*. 2013 Feb;29(2):443-9.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2011 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012.
18. Brehm A, Krssak M, Schmid AI, Nowotny P, Waldhäusl W, Roden M. Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. *Diabetes*. 2006 Jan;55(1):136-40.
19. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Apr;15(4):798-808.
20. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009 Feb 12;113(7):1399-407.
21. Bixby M, Spieler L, Menini T, Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sci*. 2005 Jun 3;77(3):345-58.

22. Boivin M, Camirand A, Carli F, Hoffer LJ, Silva JE. Uncoupling protein-2 and -3 messenger ribonucleic acids in adipose tissue and skeletal muscle of healthy males: variability, factors affecting expression, and relation to measures of metabolic rate. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 May;85(5):1975-83.
23. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes.* 1997 Jan;46(1):3-10. Review. Erratum in: *Diabetes* 1997 Mar;46(3):536.
24. Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002 Sep;5(5):545-9.
25. Bok SH, Park SY, Park YB, Lee MK, Jeon SM, Jeong TS, Choi MS. Quercetin dihydrate and gallate supplements lower plasma and hepatic lipids and change activities of hepatic antioxidant enzymes in high cholesterol-fed rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2002 May;72(3):161-9.
26. Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. 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 Feb;68(2):374-8.
27. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012 Jan 11;481(7382):463-8.

28. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol*. 2011 Jul 14;136(3):378-84.
29. Cabeço LD, Akiba M, Calsa MS, Sartori DRS, Vicentini-Paulino MLM, Pinheiro DF. Dieta hiperlipídica com farinha de soja como fonte proteica: utilização na seleção de ratos propensos e resistentes à obesidade. *Revista de Nutrição*. 2010, 23(3): 417-424.
30. Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Haller D, Holgate ST, Jönsson LS, Latulippe ME, Marcos A, Moreines J, M'Rini C, Müller M, Pawelec G, van Neerven RJ, Watzl B, Zhao J. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr*. 2013 Jan;109 Suppl 1:S1-34.
31. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, Esposito K, Jönsson LS, Kolb H, Lansink M, Marcos A, Margioris A, Matusheski N, Nordmann H, O'Brien J, Pugliese G, Rizkalla S, Schalkwijk C, Tuomilehto J, Wärnberg J, Watzl B, Winklhofer-Roob BM. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr*. 2011 Dec;106 Suppl 3:S5-78.
32. Chanseaume E, Malpuech-Brugère C, Patrac V, Bielicki G, Rousset P, Couturier K, Salles J, Renou JP, Boirie Y, Morio B. Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. *J Nutr*. 2006 Aug;136(8):2194-200.
33. Capurso C, Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol*. 2012 Sep-Oct;57(2-4):91-7.

34. Cave MC, Hurt RT, Frazier TH, Matheson PJ, Garrison RN, McClain CJ, McClave SA. Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition. *Nutr Clin Pract*. 2008 Feb;23(1):16-34.

35. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: State-specific obesity prevalence among adults - United States, 2009. *Early Release*, 59, 2010.

36. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Obesity halting epidemic by making health easier. *At a Glance*. 2011.

37. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, Lee MK. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol*. 2010 Mar;48(3):937-43.

38. Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim CH. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J*. 2004 Nov;18(14):1670-81.

39. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Apr;21(4):889-97.

40. Conforti AS, Gallo ME, Saraví FD. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Bone*. 2012 Jan;50(1):9-13.

41. Cui Y, Blumenthal RS, Flaws JA, Whiteman MK, Langenberg P, Bachorik PS, Bush TL. Non-high-density lipoprotein cholesterol level as a predictor of cardiovascular disease mortality. *Arch Intern Med*. 2001 Jun 11;161(11):1413-9.

42. Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med.* 2010 Dec;31(6):446-67.
43. D'Archivio M, Filesì C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(4):348-61.
44. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007 Mar;10(2):142-8.
45. De Andrade F, de Albuquerque CA, Maraschin M, da Silva EL. Safety assessment of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) dried extract: results of acute and 90 days subchronic toxicity studies in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol.* 2012 Feb;50(2):328-34.
46. Egawa T, Tsuda S, Ma X, Hamada T, Hayashi T. Caffeine modulates phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs insulin signal transduction in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2011 Dec;111(6):1629-36.
47. Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, Dariva C, Oliveira C. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciência e tecnologia de alimentos* 2002 . 22, 2: 193-204.
48. EMBRAPA, 2010. Moacir José Sales Medrado [*on line*]. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-Mate/CultivodaErvaMate_2ed/Processamento_preparacao_cha_mate.htm. Acesso em 30 de março de 2013.
49. Everett BM, Kurth T, Buring JE, Ridker PM. The relative strength of C-reactive protein and lipid levels as determinants of ischemic stroke compared

with coronary heart disease in women. J Am Coll Cardiol. 2006 Dec 5;48(11):2235-42.

50. Ferraris RP. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. Biochem J. 2001 Dec 1;360(Pt 2):265-76.

51. Filip R, Davicino R, Anesini C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. Phytother Res. 2010 May;24(5):715-9.

52. Filip R, Ferraro GE. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis*: phytochemical and pharmacology study. Eur J Nutr. 2003 Jan;42(1):50-4.

53. Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. Nutrition Research. 2000, 20: 1437–1446.

54. Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. Fitoterapia. 2001 Nov;72(7):774-8.

55. Finkelstein EA, Fiebelkorn IC, Wang G. National medical spending attributable to overweight and obesity: how much, and who's paying? Health Aff (Millwood). 2003 Jan-Jun;Suppl Web Exclusives:W3-219-26.

56. Fukushima Y, Ohmura H, Mokuno H, Kajimoto K, Kasai T, Hirayama S, Miyauchi K, Miida T, Amano A, Daida H. Non-high-density lipoprotein cholesterol is a practical predictor of long-term cardiac death after coronary artery bypass grafting. Atherosclerosis. 2012 Mar;221(1):206-11.

57. Gebhardt R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Sep;286(3):1122-8.

58. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2000 Aug;106(4):453-8.
59. González A, Ferreira F, Vázquez A, Moyna P, Paz EA. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 1993 Aug;39(3):217-20.
60. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:45673.
61. Han LK, Zheng YN, Xu BJ, Okuda H, Kimura Y. Saponins from platycodi radix ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. *J Nutr.* 2002 Aug;132(8):2241-5.
62. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev.* 2010 Dec;23(2):270-99.
63. Harlow MB, Lane D. In: **Antibody**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.
64. Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci.* 2007 Nov;72(9):R138-51.
65. Hemmerle H, Burger HJ, Below P, Schubert G, Rippel R, Schindler PW, Paulus E, Herling AW. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *J Med Chem.* 1997 Jan 17;40(2):137-45.

66. Hirabara SM, Curi R, Maechler P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 2010 Jan;222(1):187-94.
67. Hirabara SM, Silveira LR, Abdulkader F, Carvalho CR, Procopio J, Curi R. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. *J Cell Physiol.* 2007 Jan;210(1):7-15.
68. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002 Nov 21;420(6913):333-6.
69. Holland WL, Knotts TA, Chavez JA, Wang LP, Hoehn KL, Summers SA. Lipid mediators of insulin resistance. *Nutr Rev.* 2007 Jun;65(6 Pt 2):S39-46.
70. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006 Dec 14 ;444(7121):860-7.
71. Hussein GM, Matsuda H, Nakamura S, Hamao M, Akiyama T, Tamura K, Yoshikawa M. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: involvement of glucagon-like peptide-1. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(12):1849-55.
72. Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Jul 29;1127(2):141-6.
73. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF): linhas gerais de análise. Rio de Janeiro, 1975.

74. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro, 2004.
75. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil Rio de Janeiro, 2010.
76. Isolabella S, Cogoi L, López P, Anesini C, Ferraro G, Filip R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. Food Chemistry. 2010, 122: 695-699.
77. 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 Apr;31(3):244-53.
78. Jéquier E. Pathways to obesity. Int J Obes Relat Metab Disord. 2002 Sep;26 Suppl 2:S12-7.
79. Jialal I, Devaraj S. The role of C-reactive protein activation of nuclear factor kappa-B in the pathogenesis of unstable angina. J Am Coll Cardiol. 2007 Jan 16;49(2):195-7.
80. Jiao P, Ma J, Feng B, Zhang H, Diehl JA, Chin YE, Yan W, Xu H. FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKK β pathways. Obesity (Silver Spring). 2011 Mar;19(3):483-91.
81. Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee MJ, Smith SB, Spencer TE, Fried SK, Wu G. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and

enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *J Nutr*. 2009 Feb;139(2):230-7.

82. Kaburagi Y, Yamauchi T, Yamamoto-Honda R, Ueki K, Tobe K, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T. The mechanism of insulin-induced signal transduction mediated by the insulin receptor substrate family. *Endocr J*. 1999 Mar;46 Suppl:S25-34.

83. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):840-6.

84. Kang YR, Lee HY, Kim JH, Moon DI, Seo MY, Park SH, Choi KH, Kim CR, Kim SH, Oh JH, Cho SW, Kim SY, Kim MG, Chae SW, Kim O, Oh HG. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Lab Anim Res*. 2012 Mar;28(1):23-9.

85. Karthikesan K, Pari L, Menon VP. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chem Biol Interact*. 2010 Dec 5;188(3):643-50.

86. 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 Jul;85(7):2402-10.

87. Kawamoto EM, Lepsch LB, Boaventura MF, Munhoz CD, Lima LS, Yshii LM, Avellar MC, Curi R, Mattson MP, Scavone C. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. *J Neurosci Res*. 2008 Mar;86(4):845-60.

88. Kewalramani G, Bilan PJ, Klip A. Muscle insulin resistance: assault by lipids, cytokines and local macrophages. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Jul;13(4):382-90.
89. 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 Feb;136(2):433-9.
90. Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *J Agric Food Chem*. 2006 Oct 4;54(20):7539-43.
91. Koshihara Y, Neichi T, Murota S, Lao A, Fujimoto Y, Tatsuno T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1984 Jan 17;792(1):92-7.
92. Kraemer KH, Taketa AT, Schenkel EP, Gosmann G, Guillaume D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemistry*. 1996 Jul;42(4):1119-22.
93. Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab*. 2008 Jul;8(1):49-64.
94. Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J Nutr*. 2006 May;136(5):1192-7.

95. Larsen GL, Henson PM. Mediators of inflammation. *Annu Rev Immunol.* 1983;1:335-59.
96. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 2006 Dec;30(4):145-51.
97. Liuzzo G, Santamaria M, Biasucci LM, Narducci M, Colafrancesco V, Porto A, Brugaletta S, Pinnelli M, Rizzello V, Maseri A, Crea F. Persistent activation of nuclear factor kappa-B signaling pathway in patients with unstable angina and elevated levels of C-reactive protein evidence for a direct proinflammatory effect of azide and lipopolysaccharide-free C-reactive protein on human monocytes via nuclear factor kappa-B activation. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jan 16;49(2):185-94.
98. Lobanco CM, Vedovato GM, Cano CV, Bastos DHM. Fidedignidade de rótulos de alimentos comercializados no município de São Paulo, SP. *Revista de Saúde Pública.* 2009;43: 499-505.
99. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Meigs JB, Manson JE, Rifai N, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr.* 2005 Mar;135(3):562-6.
100. Machado RM, Stefano JT, Oliveira CP, Mello ES, Ferreira FD, Nunes VS, de Lima VM, Quintão EC, Catanozi S, Nakandakare ER, Lottenberg AM. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. *J Nutr.* 2010 Jun;140(6):1127-32.
101. Manavalan B, Basith S, Choi S. Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol.* 2011;2:41.

102. Mantecuccio F, Mach F. New evidences for C-reactive protein (CRP) deposits in the arterial intima as a cardiovascular risk factor. *Clin Interv Aging*. 2008;3(2):341-9.

103. Martin S, Millar CA, Lyttle CT, Meerloo T, Marsh BJ, Gould GW, James DE. Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. *J Cell Sci*. 2000 Oct;113 Pt 19:3427-38.

104. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R, Hirabara SM. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis*. 2012 Feb 23;11:30.

105. Martins F, Noso TM, Porto VB, Curiel A, Gambero A, Bastos DH, Ribeiro ML, Carvalho Pde O. Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jan;18(1):42-7.

106. Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DH, Carvalho Pde O. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *Br J Nutr*. 2009 Feb;101(4):527-32.

107. Martinet A, Hostettmann K, Schutz Y. Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity. *Phytomedicine*. 1999 Oct;6(4):231-8.

108. 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 Jul;28(7):412-9.

109. Michalany J. [The surgeon, histologic technics and surgical pathology]. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1979 Jan;25(1):44-6.

110. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T, Dannenberg AJ. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res*. 1999 May 15;59(10):2347-52.

111. Mirzoeva OK, Yaqoob P, Knox KA, Calder PC. Inhibition of ICE-family cysteine proteases rescues murine lymphocytes from lipoxigenase inhibitor-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 1996 Nov 4;396(2-3):266-70.

112. Moodie R, Stuckler D, Monteiro C, Sheron N, Neal B, Thamarangsi T, Lincoln P, Casswell S; Lancet NCD Action Group. Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. *Lancet*. 2013 Feb 23;381(9867):670-9.

113. Monteiro CA, Mondini L, Costa RBL. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). *Revista de Saúde Pública*. 2000, 34, 3: 251-258.

114. Mullen KL, Pritchard J, Ritchie I, Snook LA, Chabowski A, Bonen A, Wright D, Dyck DJ. Adiponectin resistance precedes the accumulation of skeletal muscle lipids and insulin resistance in high-fat-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Feb;296(2):R243-51.

115. Nardini M, Leonardi F, Scaccini C, Virgili F. Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 2001 Apr 1;30(7):722-33.
116. Nawrocki AR, Scherer PE. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Jun;4(3):281-9.
117. National Cholesterol Education Program (NCEP). Third report of NCEP Expert Panel on detection, evaluation and treatment on high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). NHI publication. 2002 Sep; 02-5215: 284p.
118. Oliveira DM, Freitas HS, Souza MF, Arçari DP, Ribeiro ML, Carvalho PO, Bastos DH. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats. *J Agric Food Chem*. 2008 Nov 26;56(22):10527-32.
119. Oller do Nascimento CM, Ribeiro EB, Oyama LM. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. *An Acad Bras Cienc*. 2009 Sep;81(3):453-66.
120. Olmos A, Giner RM, Recio MC, Ríos JL, Gil-Benso R, Máñez S. Interaction of dicaffeoylquinic derivatives with peroxynitrite and other reactive nitrogen species. *Arch Biochem Biophys*. 2008 Jul 1;475(1):66-71.
121. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr*. 2001 Jan;131(1):66-71.

122. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004 Oct 15;306(5695):457-61.

123. 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 Aug 15;476(2):178-85.

124. Pedersen BK, Akerström TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol*. 2007 Sep;103(3):1093-8.

125. Pereira DF, Kappel VD, Cazarolli LH, Boligon AA, Athayde ML, Guesser SM, Da Silva EL, Silva FR. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. *Phytomedicine*. 2012 Jul 15;19(10):868-77.

126. Pinheiro ARO, Freitas SFT, Corso ACT. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Revista de Nutrição*. 2004;17: 523-533.

127. Pomilio AB, Trajtemberg S, Vitale AA. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2002;13: 235-241.

128. Przygodda F, Martins ZN, Castaldelli, APA, Minella TV, Vieira LP, Cantelli K, Fronza J, Padoin MJ. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St., Aquifoliaceae) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. *Revista Brasileira de Farmacologia*. 2010 Dez 20; 6: 956-961.

129. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007 Jun 15;21(12):1443-55.

130. Racette SB, Deusinger SS, Deusinger RH. Obesity: overview of prevalence, etiology, and treatment. *Phys Ther.* 2003 Mar;83(3):276-88.

131. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963 Apr 13;1(7285):785-9.

132. 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 Nov;123(11):1939-51.

133. Robinson JG. Are you targeting non-high-density lipoprotein cholesterol? *J Am Coll Cardiol.* 2009 Dec 29;55(1):42-4.

134. Rogero MM, Tirapegui J, Vinolo MA, Borges MC, de Castro IA, Pires IS, Borelli P. Dietary glutamine supplementation increases the activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J Nutr.* 2008 Jul;138(7):1343-8.

135. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):519-29.

136. Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol.* 1977 Jan;86(1):183-276.

137. Safwat GM, Pisanò S, D'Amore E, Borioni G, Napolitano M, Kamal AA, Ballanti P, Botham KM, Bravo E. 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 Nov-Dec;25(11-12):1157-68.

138. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*. 2002 Feb;12(2):65-71.

139. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: *Molecular cloning*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p. 174-184.

140. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 2007 Apr;87(2):507-20.

141. Schrauwen P, Hoeks J, Schaart G, Kornips E, Binas B, Van De Vusse GJ, Van Bilsen M, Luiken JJ, Coort SL, Glatz JF, Saris WH, Hesselink MK. Uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. *FASEB J*. 2003 Dec;17(15):2272-4.

142. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2169-80.

143. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1793-801. Review. Erratum in: *J Clin Invest*. 2006 Aug;116(8):2308.

144. Silva RD, Bueno AL, Gallon CW, Gomes LF, Kaiser S, Pavei C, Ortega GG, Kucharski LC, Jahn MP. 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 Sep;82(6):818-26.

145. Silveira LR, Fiamoncini J, Hirabara SM, Procópio J, Cambiaghi TD, Pinheiro CH, Lopes LR, Curi R. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. *J Cell Physiol.* 2008 Oct;217(1):1-12.
146. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2010 Aug;24(8):2596-611.
147. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. Animal models of obesity. *Obes Rev.* 2007 Mar;8 Suppl 1:55-61.
148. Sugden MC. In appreciation of Sir Philip Randle: the glucose-fatty acid cycle. *Br J Nutr.* 2007 May;97(5):809-13.
149. Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr.* 2006 Mar;136(3):582-7.
150. Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr.* 2012 Aug 21;32:261-86.
151. Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Shimomura Y, Suzuki M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *J Nutr.* 1995 Apr;125(4):920-5.
152. Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD. Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett.* 2004 Jan 2;556(1-3):111-5.

153. 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 Jan;14(1):17-23.

154. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb;7(2):85-96.

155. Thorpe KE, Florence CS, Howard DH, Joski P. The impact of obesity on rising medical spending. *Health Aff (Millwood)*. 2004 Jul-Dec;Suppl Web Exclusives:W4-480-6.

156. Tormen MJ. Economia ervateira brasileira. *In: Winge H, Ferreira AG, Mariath JEA, Tarasconi LC. Erva-mate: Biologia e cultura no cone Sul. Editora da Universidade: Porto Alegre, 1995, 356p.*

157. Vanderjagt TJ, Ghattas R, VanderJagt DJ, Crossey M, Glew RH. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sci*. 2002 Jan 18;70(9):1035-40.

158. Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Nolen GT, Phanavanh B, Starks T, Gurley C, Simpson P, McGehee RE Jr, Kern PA, Peterson CA. Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jun;296(6):E1300-10.

159. 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 Sep 1;47(5):593-9.

160. von Ruesten A, Feller S, Bergmann MM, Boeing H. Diet and risk of chronic diseases: results from the first 8 years of follow-up in the EPIC-Potsdam study. *Eur J Clin Nutr.* 2013 Apr;67(4):412-9.
161. Wang S, Noh SK, Koo SI. Epigallocatechin gallate and caffeine differentially inhibit the intestinal absorption of cholesterol and fat in ovariectomized rats. *J Nutr.* 2006 Nov;136(11):2791-6.
162. Weisinger RS, Stanley TK, Begg DP, Weisinger HS, Spark KJ, Jois M. Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiol Behav.* 2009 Aug 4;98(1-2):192-7.
163. White MF, Shoelson SE, Keutmann H, Kahn CR. A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem.* 1988 Feb 25;263(6):2969-80.
164. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab.* 2007;51(4):301-23. Epub 2007 Aug 28.
165. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004 Dec;53 Suppl 3:S215-9.
166. 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 Apr;133(4):1081-7.
167. World Health Organization. World health statistics 2012. Geneva. Switzerland, 2012.

168. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Feb;9(2):162-76.

169. Yang Y, Zhou L, Gu Y, Zhang Y, Tang J, Li F, Shang W, Jiang B, Yue X, Chen. Dietary chickpeas reverse visceral adiposity, dyslipidaemia and insulin resistance in rats induced by a chronic high-fat diet. *Br J Nutr.* 2007 Oct;98(4):720-6.

170. Yaspelkis BB 3rd, Kvasha IA, Figueroa TY. High-fat feeding increases insulin receptor and IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKK α /beta phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Jun; 296(6):R1709-15. Epub 2009 Apr 22.

171. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med.* 2013 Mar;7(1):14-24.

172. York DA. Lessons from animal models of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996 Dec;25(4):781-800.

173. Young D, Camhi S, Wu T, Hagberg J, Stefanick M. Relationships among changes in C-reactive protein and cardiovascular disease risk factors with lifestyle interventions. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012 Jul 24.

174. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50230-6.

175. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or

targeted disruption of Ikkbeta. Science. 2001 Aug 31;293(5535):1673-7.
Erratum in: Science 2002 Jan 11;295(5553):277.

176. Youngren JF, Paik J, Barnard RJ. Impaired insulin-receptor utophosphorylation is an early defect in fat-fed, insulin-resistant rats. Journal of Applied Physiology. 2001 Nov;91(5):2240-7.

177. Zamora-Ros R, Rabassa M, Llorach R, González CA, Andres-Lacueva C. Application of Dietary Phenolic Biomarkers in Epidemiology: Past, Present, and Future. J Agric Food Chem. 2012 Feb 22.

178. Zaporozhets OA, Krushynska OA, Lipkovska NA, Barvinchenko VN. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. J Agric Food Chem. 2004 Jan 14;52(1):21-5.

179. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. Sci STKE. 2005 Jan 25;2005(268):pe4.

ANEXO 1-CURRÍCULO *LATTES* TATIANE MIEKO M FUJII

Tatiane Mieko de Meneses Fujii

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7921142804891415>

Última atualização do currículo em 23/04/2013

Graduada em Nutrição pelo Centro Universitário São Camilo (2010). Foi aluna de iniciação científica do laboratório de nutrigenômica do departamento de Nutrição, da Faculdade de Saúde Pública (FSP), da Universidade de São Paulo. Bolsista do CNPq (vigência de agosto de 2009 a julho de 2010). Mestranda do programa de Nutrição em Saúde Pública pela FSP/USP. Possui interesse pela área de Nutrição Experimental, Obesidade, Inflamação, Nutrigenômica e Nutrigenética. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Tatiane Mieko de Meneses Fujii
Nome em citações bibliográficas	FUJII, T. M. M.;Fujii, TMMM;de MENESES FUJII, T.M.;de Meneses Fujii, TM

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Avenida Doutor Arnaldo, 715 Cerqueira César 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617850 URL da Homepage: www.usp.br
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2011	Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - USP. Título: Efeito do consumo isocalórico da ração hiperlipídica e da administração da erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i>) sobre a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina no músculo sóleo de ratos Wistar, Orientador: 😊 Marcelo Macedo Rogero. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2006 - 2010	Graduação em Nutrição. Centro Universitário São Camilo. Título: Atuação dos ácidos graxos essenciais (ômega 3, ômega 6, ômega 9) no processo inflamatório induzido pela obesidade sob perspectivas da genômica nutricional. Orientador: Roberta de Medeiros.

ANEXO 2- CURRÍCULO *LATTES* MARCELO MACEDO ROGERO

Marcelo Macedo Rogero

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6607279993080828>

Última atualização do currículo em 20/04/2013

Graduado em Nutrição pela Universidade de São Paulo (1994), Mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2002) e Doutorado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2007). Pós-doutorado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2007-2008). Professor Doutor, Ref. MS-3, em Regime de Dedicação Integral à Docência e à Pesquisa, junto ao Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública - USP desde 2009. Tem experiência nas áreas de Nutrigenômica, Nutrigenética e Inflamação; Imunonutrição; e Metabolismo de Macronutrientes e Exercício Físico. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Marcelo Macedo Rogero
Nome em citações bibliográficas	ROGERO, M. M.;ROGERO, MARCELO M.;Rogero, Marcelo Macedo;Rogero, Marcelo M;Rogero, Marcelo

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira Cesar 01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617850 Fax: (11) 30617705
------------------------------	--

ANEXO 3 - ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

O artigo científico à seguir, intitulado " ISOCALORIC INTAKE OF A HIGH-FAT DIET PROMOTES INSULIN RESISTANCE AND INFLAMMATION IN WISTAR RATS", foi publicado no periódico *Cell Biochemistry & Function* (v. 31: 244-253, 2013).

ISOCALORIC INTAKE OF A HIGH-FAT DIET PROMOTES INSULIN RESISTANCE AND INFLAMMATION IN WISTAR RATS

Authors: Patrícia Silva Jacob¹; Tatiane Mieko de Meneses Fujii¹; Monica Yamada¹; Maria Carolina Borges¹; Lucas Carminatti Pantaleão²; Primavera Borelli³; Ricardo Fock³; Marcelo Macedo Rogero^{1*}

¹Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo, Brazil,²Department of Human Physiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil,³Department of Clinical and Toxicological Analyzes, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil.

*** Corresponding author:**

Department of Nutrition, School of Public Health, University of Sao Paulo.

Avenida Doutor Arnaldo, 715, Sao Paulo, SP 01246-904, Brazil. Tel.: +55 11 3061-7850. Fax: +55 11 3061-7705.

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

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of isocaloric intake from a high-fat diet (HFD) on insulin resistance and inflammation in rats. Male Wistar rats were fed on a HFD (n = 12) or control (CON) diet (n = 12) for twelve weeks. Subsequently, all animals were euthanized and blood glucose, insulin, free-fatty acids, C-reactive protein (CRP), lipid profile, cytokines and hepatic-enzyme activity were determined. Carcass chemical composition was also analyzed. During the first and twelfth weeks of the experimental protocol, the oral glucose tolerance test (oGTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed and demonstrated insulin resistance ($p < 0.05$) in the HFD group. Although food intake (g) was lower ($p < 0.05$) in the HFD group, compared to the CON group, the concentration of total cholesterol, LDL, CRP and liver weight were all significantly higher. IKK- β , JNK and AKT gene expressions were determined in the liver and skeletal muscle. Following an insulin stimulus, the HFD group demonstrated decreased ($p = 0.05$) hepatic AKT expression, while the IKK β phospho/total ratio was elevated in the HFD muscle ($p = 0.02$). In conclusion, the isocaloric intake from the HFD induced insulin resistance, associated with impaired insulin signaling in the liver and an inflammatory response in the muscle.

Keywords: Obesity. Inflammation. High-Fat Diet. Liver. Skeletal Muscle.

Introduction

High consumption of diets rich in lipids, especially saturated fats, is associated with metabolic disorders, such as insulin resistance and dyslipidemia, conditions that promote the development of obesity. The pathophysiology of chronic diseases is associated with low-intensity chronic inflammation (FERGUSON; PHILPOTT, 2007). In this state, there is a greater release of proinflammatory cytokines, chemokines and growth and angiogenic factors (BEUTLER et al., 2006). Adipose tissue is the main organ responsible for the synthesis and release of biomarkers, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6, and is considered to be the origin of the systemic inflammatory response and insulin resistance (STEINBERG, 2007). However, hypertrophy of this tissue leads to a reduction in plasma adiponectin levels (CANCELLO; CLÉMENT, 2006).

There is some evidence to support the hypothesis that, in both humans and animals, the intake of a high-fat diet (HFD) induces proinflammatory protein expression in the liver (TOBAR et al., 2011) and skeletal muscle (YASPELKIS et al., 2009). The inflammatory response involves the activation of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway by activating kinase proteins, such as kinase inhibitor of κ B (IKK- β) and c-Jun N terminal (JNK). In the liver and skeletal muscle, IKK- β and JNK together impair insulin signaling by phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) proteins on serine residues, consequently, reducing the activation of kinase protein B (AKT) and decreasing glucose uptake, thereby contributing to insulin resistance (GAO et al., 2000; ZICK, 2005). However, is not clear whether this mechanism is associated with the higher consumption of lipids and/or with the excess of energy. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of an isocaloric intake of a HFD on insulin resistance and inflammation in rats. For this purpose, the ingredients (except for starch and lard) of the diet were normalized, according to their energy densities.

Materials and Methods

Animals and Treatment

Male Wistar rats (initial weight: 298 ± 27 g), aged two-months old, were obtained from the Animal Laboratory of the Faculty of Medicine at the University of Sao 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 07:00h). 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 Sao 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) (REEVES; NIELSEN; FAHEY Jr, 1993), rats were randomly assigned to 2 groups: the HFD group and the control diet-fed (CON) group. For twelve weeks, the CON group ($n = 12$) received the AIN-93M diet (total energy: 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 (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 CON diet (3.99 kcal/g), the daily energy intake did not differ between the groups. The insufficient intake of micro- and macronutrients by the HFD group, caused by the lower diet consumption, could seriously affect the outcome of the study. Thus, in order to ensure comparable intakes of such micro- and macronutrients between the groups, diet ingredients (except for starch and lard) were normalized, according to their energy densities. Furthermore, due to the greater susceptibility of lard to oxidation, we added a

higher amount of tertbutylhydroquinone to the HFD (PANG et al., 2008) (**Table 1**).

Table 1.Composition of experimental diets.

Ingredients	CON diet ¹	HFD
	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

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

¹According to AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY Jr, 1993).

Obtaining biological material

Two experiments were conducted. Experiment 1: Collection of blood, adipose pads, heart, liver and subsequent evaluation of the chemical composition of the carcass. Experiment 2: Infusion of insulin via the portal vein with subsequent collection of the liver and muscle tissues for analysis of protein expression by the Western blotting technique (liver and soleus muscle) and for histology (liver). All animals were anesthetized with xylazine(50 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) administered subcutaneously, by means of an insulin syringe with a 20G needle (BIKMAN et al., 2009).

In the first experiment, after anesthetization, the animals 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, a sample of the soleus muscle of the right paw was withdrawn (50 mg), the abdominal cavity was opened and then a sample of liver tissue (100 mg) was taken from the right lobe. 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 with 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 (100mg) and at 90 seconds after the injection of insulin, a sample of the soleus muscle of the left paw of the animal was obtained (50mg) (Kubota et al., 2008). After the samples were taken from the soleus muscle and liver, both were immediately stored in liquid nitrogen. Subsequently, extraction of total proteins in both tissues was carried out and used for evaluating the expressions of JNK, IKK- β and AKT, in its total and phosphorylated forms, by the Western Blotting technique.

Blood Analyses

Fasting blood glucose from the tail vein was determined using an Accu-Chek Advantage II meter (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The serum total cholesterol, HDL-cholesterol and TAG levels were quantified using commercial kits for the automatic multichannel analyzer (Abbott Diagnostics Architect C8000, Illinois, USA). LDL cholesterol and VLDL-cholesterol levels were estimated using the following equations proposed by Friedewald et al (1972). Serum insulin, adiponectin, CRP, TNF- α and IL-6 levels were quantified using the Lincoplexkit (LincoResearch Inc., St. Charles, MO). Plasma total fatty acid concentration was determined using a commercial kit (Biovision, Catalog #100-K612, California, USA). 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).

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 (MICHALANY, 1979). Another sample of the liver was used to perform the Sudan Black method, to evaluate lipid infiltration in the hepatocytes (PEARSE, 1968).

Tolerance of glucose and insulin resistance

The determination of the blood glucose concentration using the oral glucose tolerance test (oGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) was performed using an Accu-Chek Advantage II glucometer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). 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 22.5 (MATTHEWS et al., 1985).

Carcass chemical composition analyses

Water, lipid, protein and ash contents present in the carcass of rats were determined as described elsewhere (ROGERO et al., 2008).

Fatty acid compositions of the diets and lard

Fatty acid compositions were determined by gas chromatography. Analyses of FAMES 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 60m x 0.25mm id; film thickness of 0.15 μ m

(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**.

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	nd

Results are expressed as mean ± SD. nd means non identified fatty acids.

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, DTT, EDTA, PMSF, 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. The

protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with primary antibodies (Cell Signaling, MA, USA): anti-IKK- β , anti- β -pIKK(Ser 180), anti-JNK, anti-pJNK (Tyr 185), anti-AKT, anti-pAkt (Ser 473). 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 analysed using a digital image system (Image Quant [™] 400 version 1.0.0, Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) with ImageQuant[™] software Capture software. We used β -actin as a normalizer protein (Sigma-Aldrich[®] Co., Saint Louis, MO, USA).

Statistical analyses

All variables were tested for normality of distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. To evaluate the variance of the results regarding the effect of isocaloric intake of HFD we used the F test, followed by the unpaired Student's t-test. In cases where results did not demonstrate a normal distribution, we applied the Mann-Whitney test. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism[®] software version 5.01 (GraphPadSoftware Inc., CA, USA), and the level of significance adopted was 0.05.

Results

Effect of isocaloric HFD intake diet on body weight and weigh gain

After 12 weeks of the experimental protocol, the HFD group demonstrated no statistical differences in body weight (**Figure 1A**), or in the percentage of weight gain (**Figure 1B**) in comparison to the CON group.

Effect of isocaloric HFD intake diet on food consumption

With regard to food intake, the HFD group demonstrated a significant reduction (24%) in the amount of food consumed over 12 weeks, in comparison to the CON group (**Figures 1C and 1D**). However, the average weekly energy intake did not differ between the groups, except in the twelfth week of the protocol (**Figure 1E**). In addition, the total energy intake during the experimental protocol did not differ between the groups (**Figure 1F**).

Figure 1. Weight curve (A), body weight gain (B), average weekly consumption in grams (C), total intake in grams (D), average weekly consumption in energy (E) and total energy intake (F) of Wistar rats fed *ad libitum* with a control (CON) diet or high-fat diet (HFD) until the 12th week of the experimental protocol. Values are expressed as means $\pm$ SD (n= 6/group). *p<0.05 vs. CON group.

Effect of isocaloric HFD intake diet on adipose pads and liver weight

The weight of the periepididymal adipose tissue, as well as the sum of the fatty pads (**Table 3**) did not differ between groups, although there was a trend towards an increase in the HFD group ($p=0.09$ and $p=0.06$, respectively). In addition, the retroperitoneal adipose tissue weight was significantly higher in the HFD group, in comparison to the CON group. The HFD group presented a significant increase in liver weight, in relation to the CON group (**Table 3**).

Effect of isocaloric HFD intake diet on carcass chemical composition

The CON and HFD groups did not differ in relation to the carcass chemical composition (**Table 3**).

Table 3. Fat pads, tissue weight, and body composition of rats fed on a control diet (CON) or a high-fat diet (HFD) for 12 weeks.

	CON	HFD
Periepididymal pad (g)	14.20 $\pm$ 7.60	15.60 $\pm$ 3.56
Retroperitoneal pad (g)	11.70 $\pm$ 5.90	14.80 $\pm$ 5.20
Sum of adipose pads (g)	25.80 $\pm$ 13.30	30.40 $\pm$ 8.50
Liver (g)	16.80 $\pm$ 2.18	19.93 $\pm$ 0.38*
Moisture (%)	51.12 $\pm$ 5.13	48.55 $\pm$ 4.61
Lean mass (%)	81.40 $\pm$ 2.51	79.74 $\pm$ 3.73
Lipid (%)	18.60 $\pm$ 2.51	20.26 $\pm$ 3.73
Protein (%)	22.95 $\pm$ 4.15	18.93 $\pm$ 9.44
Ash (%)	4.15 $\pm$ 2.13	3.62 $\pm$ 2.84

Results are expressed as mean $\pm$ SD (n= 6 group). *p < 0.05 vs. CON group.

Effect of isocaloric HFD intake diet on glucose tolerance and insulin resistance

The HFD group presented higher blood glucose levels at all times during the oGTT (**Figure 2A**), and a higher area under the curve (AUC), in comparison to the CON group (**Figure 2B**). Similarly, the data for the ip ITT indicated resistance to the action of insulin in the HFD group, since the glucose curve (**Figure 2C**) and AUC (**Figure 2D**) of the HFD group were significantly higher than those of the CON group. Confirming the results described above, **Table 4** shows that the animals in the HFD group had significantly higher fasting glucose levels, compared to animals of the CON group; however, there was no difference in fasting serum insulin concentration and HOMA-IR.

Figure 2. Glycemic curve at 0, 30, 60, 90 and 120 minutes for oGTT (A), AUC of oGTT (B), glycemic curve at times 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 40 minutes for ipITT (C) and AUC in ITT (D) of Wistar rats fed ad libitum with a control (CON) diet or high-fat diet (HFD) until the 12th week of the experimental protocol and

submitted to oral tolerance test to glucose. Values are expressed as means $\pm$ SD (n= 6/group) * $p < 0.05$ vs. CON group. AUC: area under the curve.

Effect of isocaloric HFD intake diet on lipid profile and free-fatty acids

HFD diet resulted in a statistically significant increase in serum total cholesterol and LDL-cholesterol in relation to values for the CON diet group (**Table 4**). The groups did not differ significantly in relation to HDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and TAG. There was no statistical difference between the groups in relation to plasma total fatty acids concentration.

Effect of isocaloric HFD intake diet on hepatic enzymes, CRP and cytokines

There were no effects of the HFD on serum ALT, AST, leptin, IL-6, TNF- α and adiponectin levels; however the serum CRP concentration was higher ($p = 0.02$) in the HFD group, in relation to the CON group (**Table 4**).

Effect of isocaloric HFD intake diet on hepatic lipid infiltration

The H/E technique demonstrated that one third of the HFD group showed discrete microgoticular degeneration, indicating lipid infiltration, as confirmed by the Sudan Black method (Data not shown).

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

Parameters	CON	HFD
Glucose (mmol/L)	4.92 ± 0.43	5.52 ± 0.33*
Insulin (μU/mL)	23.55 ± 16.02	22.40 ± 5.12
HOMA-IR	5.27 ± 3.99	5.56 ± 1.55
Total cholesterol (mg/dL)	68.00 ± 7.10	79.00 ± 6.60*
HDL-c (mg/dL)	22.00 ± 2.60	20.00 ± 1.40
LDL-c (mg/dL)	27.00 ± 7.50	38.00 ± 5.40*
TAG (mg/dL)	96.00 ± 20.10	105.00 ± 20.40
VLDL (mg/dL)	19.00 ± 4.00	21.00 ± 4.10
Free fatty acids (nM/μL)	0.10 ± 0.12	0.10 ± 0.11
ALT (U/L)	31.0 ± 7.30	35.0 ± 6.10
AST (U/L)	106 ± 24.80	122 ± 17.20
Leptin (pg/mL)	3,74 ± 2,04	3,39 ± 82
IL-6 (pg/mL)	15.50 ± 4.51	21.68 ± 10.71
TNF-α (pg/mL)	3.94 ± 0.82	4.13 ± 1.61
Adiponectin (ng/mL)	13,51 ± 5,78	10,14 ± 3,37
CRP (ng/mL)	610.83 ± 260.27	1,002 ± 168*

Results are expressed as mean ± SD (n= 6/group). *p<0.05 vs. CON group.

Effect of isocaloric HFD intake diet on hepatic expression of proteins

The CON and HFD groups did not present any significant differences with regard to the expression or phosphorylation of the inflammatory proteins, JNK and IKK-β, in the liver (**Figures 3A, B, C and 3D**). However, there was a significant reduction in AKT phosphorylation in the liver of the HFD group following insulin stimulation, when compared to the respective control group (**Figure 3H**); these results corroborate the occurrence of the resistance to insulin, as previously described.

Figure 3. Expression of total IKK- β (A), phospho IKK- β (Ser 180) (B), total JNK (C), phospho JNK (Tyr 185) (D), ratio of phospho JNK: total JNK (E), total AKT (F), phospho AKT (Ser 473) (G) and ratio of phospho AKT: total AKT (H) in hepatic tissue of Wistar rats fed ad libitum with a control (CON) diet or high-fat diet (HFD) until the 12th week of the experimental protocol. Values are expressed as means $\pm$ SD (n=6/group). Bars with different letters differ significantly (p<0.05). AU=Arbitrary units.

Effect of isocaloric HFD intake diet on skeletal muscle expression of proteins

IKK- β protein expression was determined in the muscle tissue in its total form (**Figure 4A**) and phosphorylated form (**Figure 4B**), and no statistical difference was observed between the groups. However, the ratio between the phosphorylated and total IKK- β (**Figure 4C**) was significantly higher ($p=0.02$) in HFD group, in comparison to the CON group. We also observed that there was no significant difference between the groups with regard to the expressions of JNK and AKT.

Figure 4. Expression of total IKK- β (A), phospho IKK- β (Ser 180) (B), ratio of phospho IKK- β : total IKK- β (C) , total JNK (D), phospho JNK (Tyr 185) (E), ratio of phospho JNK: total JNK (F), total AKT (G), phospho AKT (Ser 473) (H) and ratio of phospho AKT: total AKT (I) in skeletal muscular tissue of Wistar rats fed ad libitum with a control (CON) diet or high-fat diet(HFD) until the 12th week of the experimental protocol. Values are expressed as means $\pm$ SD(n=4-6/group). AU = Arbitrary units. *p<0.05 vs. CON group.

Discussion

Epidemiological studies suggest a positive association between dietary fatty acid content with weight gain and development of metabolic disorders, such as glucose intolerance (BRAY and POPKIN 1998; MASKARINEC et al. 2006). Both the quantity and quality of fat intake, especially saturated fat, can influence insulin sensitivity, which is associated with the etiology of chronic morbidities such as type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease (SPEAKMAN et al. 2007; WINZELL and AHREN, 2004).

Palmitic and stearic fatty acids are the common saturated fatty acids present in the occidental diet (OKERE et al., 2006; MANCO et al., 2009), and these are present in high concentrations in lard, which was used in the present study to induce resistance to the action of insulin in rats.

However, unlike observations from several studies using this model (YANG et al. 2007; WOODS et al. 2002), animals fed on a HFD showed no significant weight gain. Firstly, it should be highlighted that the HFD ingredients were adjusted for energy density, in order to meet the nutrient recommendations of the experimental animals. This adjustment is extremely important to avoid a lower intake of vitamins and minerals in the HFD group, compared to the CON diet animals (COHEN-LAHAV et al. 2006; WINTERGERST et al. 2007). Thus, the energy adjustment density provided an isocaloric intake between the groups, which, as expected, did not cause any significant weight gain, but resulted in significant metabolic changes.

Safwat et al. (2009) used the same type of adjustment for the preparation of the HFD (57% of calories from lipids) and, after 18 weeks, they observed a significantly higher (about 20%) energy intake in the HFD group. TAG and LDL levels were also increased, as well as the accumulation of fat in the hepatocytes, without any change in the liver weight; no alterations in plasma glucose levels and no modifications in plasma leptin, adiponectin or TNF- α were observed when comparing the HFD group to the CON group. Although our study employed an isocaloric intake, we found important metabolic changes.

We hypothesized that the presence of dietary saturated fat, per se, was the key factor in the inflammatory response.

With regard to the isocaloric intake between the groups, it should be noted that HFD can induce anorexigenic mechanisms, which can reduce the expression of hypothalamic anorexigenic peptides such as alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH), which might explain the absence of any hyperphagic behavior in the HFD group in the present study (BUETTNER et al. 2007). Accordingly, De Meijer et al. (2010) tested the hypothesis that a number of metabolic changes, including increased adipose pads, result from ingested lipid content and not excess energy. For this purpose, the animals were grouped in CON, HF and pair-fed HFD groups. The authors observed that, even after isoenergetic consumption, the animals in this latter group presented significantly increased weights for the inguinal, mesenteric, retroperitoneal and periepididymal pads.

In the present study, we did not observe significant changes in body weight, energy intake or body composition; however, fasting glucose was increased in the HFD group and this fact may lead to a resistance to insulin, changes in lipid profile and increased production and release of proinflammatory cytokines, also known as meta-inflammation (HOTAMISLIGIL, 2006). To evaluate insulin resistance in the animals, oGTT and ipITT were conducted. Glucose intolerance and insulin resistance were strongly evident after 12 weeks of the experimental protocol in the animals submitted to the HFD. For the oGTT, this result is indicative of a decrease in the hepatic response of hepatic gluconeogenesis inhibition, as well as a reduction in glucose uptake by the muscles and the pancreatic secretion of insulin. The results of the ipITT suggest the development of insulin resistance in the muscles and in the adipose tissue. Another interesting result was the finding that the fasting glucose was significantly increased in the HFD group, when compared to the CON group. Under normal conditions, β -pancreatic cells exposed to a high concentration of glucose and free-fatty acids demonstrate increased release of insulin; however, the chronic exposure to free-fatty acids

may result in a low level inhibition of the secretion of this hormone (MINGRONE, 2006).

Another study showed the influence of inflammation on the establishment of insulin resistance in rats submitted to HFD for short and long term periods (LEE, et al., 2011). Interestingly, after three days of HFD consumption, animals showed impaired glucose tolerance, compared to controls animals. Similarly, this occurrence was observed after 10 weeks of HFD consumption. Using the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, the authors detected that the fasting glucose and hepatic glucose production were increased after three days of the experimental protocol in HFD rats. All these results are consistent with the hypothesis that hepatic glucose production is the determinant key factor in basal hyperglycemia.

The evaluation of inflammatory protein phosphorylation and expression in the liver and skeletal muscles is extremely important since these proteins are involved in the development of metabolic disorders such as insulin resistance (BULLÓ et al. 2006). Although no significant alteration in JNK expression was observed in either tissue, the ratio between the phosphorylated and total IKK- β in the muscle was greater in the HFD group, in comparison with the CON diet. This finding indicates that important inflammatory signaling pathways were activated by the HFD, and may imply their involvement in the hyperglycemia, dyslipidemia and increase in adiposity observed. A study conducted by Yasperlkis et al. (2009) showed that HFD administration to Sprague-Dawley male rats for 12 weeks increased IKK- β phosphorylation, indicating activation of this protein in the HFD group. Bikman et al. (2009) also reported an increase of IKK- β phosphorylation in the skeletal muscle of rats submitted to HFD.

Confirming the importance of the liver in basal hyperglycemia, AKT phosphorylation in this tissue was reduced in animals that consumed isocaloric HFD after twelve weeks, when stimulated with insulin and compared to the CON group. Indeed, the fact that there was no activation of the investigated inflammatory proteins in the liver suggests that the reduction in AKT phosphorylation could be due to the activation of other proteins such as protein

kinase R (PKR), the ribosomal protein S6K, protein kinase C (PKC), the extracellular signal-regulated kinases (ERK) and mammalian target of rapamycin (mTOR), which also have the capacity of inhibiting the phosphorylation of the IRS-1 in tyrosine 1.222 (BOURA-HALFON and ZICK, 2009).

In conclusion, the present study showed that the isocaloric intake of HFD increased body adiposity, resulting in a hyperglycemia, glucose intolerance and a dyslipidemic state, as well as an increase in the inflammatory response. Additionally, HFD decreased the phosphorylation of AKT in the liver, promoting the development of insulin resistance, while HFD increased the muscular ratio of phosphorylated IKK- β -to- total IKK- β , in response to the inflammatory process in this tissue. All these results suggest that the isocaloric intake of HFD induced insulin resistance and glucose intolerance, which may be associated with an inflammatory response in the muscle and impairments in hepatic-insulin signaling.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (09/54395-0). The authors thank I.S.O. Pires and M.C. Ferreira for technical assistance and declare no conflicts of interest.

References

BEUTLER, B. et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annual Review of Immunology*, 2006; 24:353-389.

BIKMAN, B.T. et al. High-fat diet induces Ikk β and reduces insulin sensitivity in rats with low running capacity. *International Journal of Sports Medicine*, 2009; 30: 631-635.

BOURA-HALFON, S; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2009; 296: E581–591.

BRAY, G.A; POPKIN, B.M. Dietary fat does affect obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998; 68: 1157 - 1173.

BUETTNER, R. et al. High fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 2007; 15: 798-808.

BULLÓ, M. et al. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutrition*, 2006; 10: 1164-1172.

CANCELLO, R; CLÉMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*, 2006; 113: 1141-1147.

COHEN-LAHAV et al. 2006 COHEN-LAHAV, M., A. Vitamin D decreases NF-Kappa B activity by increasing I Kappa B alpha levels . *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2006; 21(4): 889-97.

DE MEIJER, V.E. et al. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. *Metabolism*, 2010; 59(8): 1092-105.

FERGUSON, L.R; PHILPOTT, M. Nutrigenomics and chronic inflammation. 2007. In: KOK, F.; BOUWMAN, L.; DESIERE, F. 2007. *Personalized Nutrition: principles and applications*. New York: CRC Press; 49-60..

FRIEDEWALD, W.T; LEVI, R.I; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 1972; 18: 499-502.

GAO, Z. et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *Journal of Chemical Biology*, 2002; 277: 48115–48121.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006; 444: 860 - 867.

KUBOTA, N.; KUBOTA, T.; ITOH, S. Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metabolism*, 2008; 8: 49-64. LEE Y.S. et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2474-83, 2011.

LEE Y.S. et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2474-83, 2011

MANCO, M. et al. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes, obesity and metabolism*, 2004; 6: 402-413.

MASKARINEC, G. et al. Trends and Dietary Determinants of Overweight and Obesity in a Multiethnic Population. *Obesity*, 2006; 14(4): 717 - 726.

MATTHEWS, D.R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 1985, 28: 412-9.

MICHALANY, J. The surgeon, histologic techniques and surgical pathology. *AMB Revista da Associação Médica Brasileira*, 1979; 25: 44-46.

MINGRONE, G. Dietary fatty acids and insulin secretion. *Food & Nutrition Research*, 2006; 50: 79-84.

OKERE, I.C; CHANDLER, M.P; McELFRESH, T.A et al. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2006; 291: H38-H44.

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. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2008; 476: 178–185.

PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and applied*: Little, Brown. 1968.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. 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. *Journal of Nutrition*, 1993; 123:1939-1951.

ROGERO, M.M. et al. Dietary glutamine supplementation increases the function of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated

with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Journal of Nutrition*, 2008; 138: 1343-1348.

SAFWAT, G.M. 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: 1157-1168.

SPEAKMAN, J. et al. Animal models of obesity. *Obesity Reviews*, 2007; 8 (suppl. 1): 55-61.

STEINBERG, G.R. Inflammation in obesity is the common link between defects in fatty acid metabolism and insulin resistance. *Cellular Cycle*, 2007; 6: 888-894.

TOBAR, N. et al. Diacerein Improves Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity in Mice on a High-Fat Diet. *Endocrinology*, 2011; 152: 4080–4093.

WANG, Z. et al. Betaine improved adipose tissue function in mice fed a high-fat diet: a mechanism for hepatoprotective effect of betaine in nonalcoholic fatty liver disease. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010; 298: 634-642.

WINTERGERST E.S; MAGGIANI S; HORNIG, D.H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2007; 51: 301-23.

WINZELL, M.S.; AHRÉN, B. A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 2004; 53: 215-219.

WOODS, S.C. et al. A controlled high fat diet induces an obese syndrome in rats. *Journal of Nutrition*, 2002; 1081-1087.

YANG, Y. et al. Dietary chickpeas reverse visceral adiposity, dyslipidaemia and insulin resistance in rats induced by a chronic high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 2007; 98:720-726.

YASPELKIS, B.B; KVASHA, I.A; FIGUERON, T.Y. High - fat feeding encreases insulin receptor ad IRS-1 coimmunoprecipitation with SOCS-3, IKK α/β phosphorylation and decreases PI-3 kinase activity in muscle. *American Journal of Phisiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2009; 296: R1709-R1715.

ZICK, Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Science STKE*, 2005, 268: 4.

ANEXO 4 - ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO EM PROCESSO DE REVISÃO

O artigo científico à seguir, intitulado "YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) MODULATES NF-KappaB PATHWAY AND AKT EXPRESSION IN THE LIVER OF RATS FED ON A HIGH-FAT DIET", foi submetido no periódico *Food and Function*, no mês de março de 2013 e atualmente está em processo de revisão.

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 Analyses, 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- κ B 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.