Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Efeito da erva-mate (*Ilex paraguarienses*) sobre a resposta inflamatória e via de sinalização da insulina no fígado de ratos

Patrícia Silva Jacob

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

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo
2012

Efeito da erva-mate (*Ilex paraguarienses*) sobre a resposta inflamatória e via de sinalização da insulina no fígado de ratos

Patrícia Silva Jacob

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

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo
2012

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

Dedicatória

À minha família, meu refúgio, minha base, minha alegria e, sobretudo, exemplo de amor incondicional.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, meu Pai celeste, pelo Seu amor imerecido por mim na Cruz, amor gracioso, que me impulsionou diariamente a continuar e vencer.

À minha família, pelo amor, pela educação, paciência e força. Obrigada pela construção do meu caráter e por me fazer ser quem eu sou. Agradeço por cada abraço e sorriso em momentos difíceis e pela compreensão da minha ausência em ocasiões, muitas vezes, especiais para vocês. Pai, obrigada pelo exemplo de determinação. Mãe, por cada colo acolhedor. Ori, por cada conselho precioso. Tati, por cada conversa animadora. Bia, por me entender pelo olhar. Mi, pela sua tranquilidade. Gutinho, por cada sorriso gostoso que faz o meu dia ruim ficar maravilhoso. Enfim, eu amo cada um de vocês de uma forma especial, única e imensurável.

Ao meu companheiro, Leonardo, por todo o amor e compreensão. Obrigada porque você surgiu em um momento tão atribulado da minha vida e fez este ser mais leve. Agradeço pelos seus sábios conselhos e pelo seu carinho. Obrigada por me fazer ser uma pessoa melhor. Te amo muito.

Ao professor Marcelo Macedo Rogero, pelo privilégio de ser sua aluna e por acreditar no meu potencial. Obrigada pelo teu exemplo moral e ético, por me

ensinar paciente e incessantemente. Saiba que aprendi muito em todos os momentos, mas, sobretudo, em nossas conversas.

Às minhas companheiras do grupo de pesquisa, que no decorrer do projeto se tornarão amigas, amigas para a vida toda. Obrigada por cada conversa no biotério, por cada lágrima enxugada, por cada sábio conselho. Obrigada por se alegrarem e se entristecerem comigo. Tati, agradeço pela sua paz e por seu cuidado. Carol, pela sua racionalidade e sabedoria. Môniquinha, pela sua disposição em ajudar e tranqüilidade. Marina, por nos ajudar sempre com um sorriso no rosto. Lú, pelas longas conversas. Vocês ocupam um lugar muito especial no meu coração.

À minha amiga e irmã, Cris, por toda a nossa caminhada juntas, aprendendo, crescendo e amadurecendo. Não imagino mais a minha vida sem você. Te amo.

À Professora Magali Stelato, pelo exemplo de amor e dedicação à família e ao trabalho. Agradeço pelos seus conselhos, por me fazer despertar a vontade de seguir a carreira acadêmica. Você é um exemplo.

Aos meus amigos, Téti, Dudú, Rick, Samir, Samuca, Vivi, Aninha, Camila, Mari, Tati, Gabriel, Talitinha, Miriam, por cada momento juntos, por fazerem meus finais mais alegres e inesquecíveis. Obrigada por serem meus irmãos espirituais.

Às minhas amigas Luiza e Adriana. Lú, que presente bom foi conhecer você no aprimoramento e seguir com você no mestrado, quantas experiências, quantas conversas, quanto crescimento. Obrigada por fazer parte da minha vida e, com sua calma, me ensinar a ser mais paciente. Dri, agradeço pela sua boa vontade, alegria e pelo seu amor à profissão que tantas vezes me incentivaram.

À Ivanir, técnica do laboratório que tanto nos ensinou e ajudou, mas acima de tudo, foi amiga e companheira. Sem você, nunca conseguiria terminar este trabalho. Obrigada por cada palavra de incentivo, por me escutar e fazer parte desta etapa da minha vida.

Ao Professor Júlio Tirapegui, ao Professor Ricardo Fock e à Professora Primavera Borelli por nos tratarem como seus próprios orientandos, por nos cederem gentilmente o laboratório e pelo exemplo profissional.

À Professora Déborah Bastos, por abrir as portas para o projeto.

À Professora Inar Alves de Castro, pelo auxílio na padronização e execução do método de determinação do perfil de ácidos graxos.

Aos alunos e ex-alunos do laboratório de Bioquímica da Nutrição, Léo, Emídio, Mari e Lucas, pelo aprendizado, pela solidariedade e compreensão.

Às alunas do laboratório de Hematologia, Jacke e Grazi, que tantas vezes me ajudaram no laboratório.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Saúde Pública e do Instituto de Medicina Tropical pelos esclarecimentos e pela atenção prestados quando necessário.

À FAPESP, pela bolsa de mestrado, essencial para meu sustento, e pelo auxílio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

JACOB PS. Efeito da ingestão de dieta hiperlipídica e do extrato aquoso da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de proteínas envolvidas na resposta inflamatória e na regulação da via de sinalização da insulina no fígado de ratos *Wistar* [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2012.

Resumo

Introdução – A obesidade está associada a um quadro de inflamação crônica e de baixa intensidade, que predispõe à resistência à ação da insulina e ao desenvolvimento do diabetes *mellitus* (DM) tipo 2. O aumento da concentração sanguínea de ácidos graxos não esterificados e de citocinas pró-inflamatórias eleva a expressão hepática de quinases (quinase do inibidor do fator nuclear kappa B (IKK)-β e a c-jun N-terminal quinase (JNK)) que aumentam a resposta inflamatória e prejudicam a via de sinalização da insulina. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contém compostos bioativos que apresentam a capacidade de reduzir a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória. **Objetivo –** Investigar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (EAEM) sobre a resposta inflamatória e via de sinalização da insulina no fígado de ratos alimentados com ração hiperlipídica (HL). **Métodos –** Ratos Wistar, machos, foram submetidos à dieta controle (CON) (n= 18) ou HL (n= 18) durante 12 semanas. Após esse período, seis animais de cada grupo foram eutanasiados, enquanto o restante dos animais foi distribuído em grupos que receberam, ou não, por gavagem, o EAEM (1 g/kg massa corporal/dia) durante quatro semanas. Após esse período, todos os animais foram eutanasiados e determinou-se as concentrações de glicose, insulina, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, triacilgliceróis (TAG), leptina, adiponectina, TNF-α, IL-6, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e a MCP-1 e a atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Foi realizada análise histológica para verificação da infiltração de lipídios. Foi avaliada também a composição corporal dos animais. Para a análise da expressão das proteínas JNK, IKK-β, AKT e IRS-1 nas suas formas totais e fosforiladas, e da proteína NF-κB, na sua forma fosforilada, um grupo de animais (n = 36) foi submetido ao mesmo protocolo experimental, porém neste foi realizada a infusão de insulina previamente ao momento da eutanásia. Todos os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT) na 1

ª, 12 ª e 16 ª semana do protocolo experimental. **Resultados –** Após 12 semanas de protocolo experimental, os animais submetidos à ração HL apresentaram maior consumo alimentar, no entanto, isocalórico em comparação àquele dos animais do grupo CONBL ($p < 0,05$). O grupo HLBL teve aumento significativo do ganho de peso; do peso coxim adiposo retroperitoneal e do fígado; da glicemia de jejum; da glicemia quando submetidos ao oGTT, em todos os tempos do teste, e ao ipITT no tempo 0, 5, 30 e 40; da concentração sérica de colesterol total, LDL-colesterol, PAI-1 e PCR, em relação ao grupo CONBL ($p < 0,05$). Apenas 1/3 dos animais HLBL apresentaram degeneração micro e macrogoticular discreta. O consumo da dieta HL diminuiu a fosforilação da AKT em relação aos animais que consumiram a ração CON ($p <0,05$). No que se refere aos efeitos do EAEM, observou-se que esta intervenção não alterou o consumo alimentar, sendo que os animais submetidos à ração HL, com ou sem a administração do EAEM, ingeriram significantemente menor quantidade em relação aos seus respectivos grupos controles ($p < 0,05$), todavia, o consumo energético novamente mostrou-se isocalórico ($p < 0,05$). A administração do EAEM reverteu o quadro de ganho de peso nos grupos que consumiram a ração HL e, ainda, reduziu o percentual de lipídios da carcaça nos animais que consumiram a ração CON, em relação aos respectivos grupos sem a intervenção ($p <0,05$). O grupo CONEM apresentou aumento do percentual de massa magra e redução da glicemia no ipITT nos tempos após 5 e 10 minutos do início do tese, quando comparado ao seu grupo controle ($p <0,05$). O EAEM reduziu as concentrações séricas de colesterol total no grupo alimentado com ração HL em relação ao grupo CON ($p < 0,05$). O grupo HLEM apresentou menor razão da expressão da IKK-β fosforilada pela total, fosforilação do NFκB, bem como maior razão da expressão da AKT fosforilada pela total em relação ao grupo HL ($p < 0,05$). **Conclusões –** O consumo de ração HL induziu no fígado perfil pró-inflamatório e quadro de intolerância à glicose Sendo assim, o consumo de ração HL pode ser considerado um fator relevante na etiologia da obesidade e no desenvolvimento das doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), em especial, do DM tipo 2. A intervenção com o EAEM modulou a resposta inflamatória e diminuiu a intolerância à glicose hepática Todos esse fatores, em conjunto, indicam que a erva-mate possa ter um efeito positivo na redução do risco e tratamento das DCNT.

Descritores: Dieta hiperlipídica; Obesidade; Inflamação; Resistência à ação da insulina; Erva-mate.

JACOB PS. Efeito da ingestão de dieta hiperlipídica e do extrato aquoso da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão de proteínas envolvidas na resposta inflamatória e na regulação da via de sinalização da insulina no fígado de ratos *Wistar*/ Effect of the high-fat diet and yerba mate aqueous extract intake (*Ilex paraguariensis*) on the expression of proteins involved in the inflammatory response and insulin signaling regulation in the liver of *Wistar* rats [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2012.

Abstract

Introduction – Obesity is associated with a chronic low-grade inflammation that predisposes to insulin resistance and to the development of type 2 diabetes. The augmentation of plasmatic nonesterified fatty acids and proinflammatory cytokines increases the hepatic expression of some kinases (inhibitor of kappa **B** kinase (IKK-β) and c-jun N-terminal kinase (JNK)) that increases the inflammatory response and impairs the insulin signaling. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) contains bioactive compounds, which have the ability to reduce the expression of genes involved in inflammatory response. **Objective –** This aim of this project was to investigate the effect of yerba mate aqueous extract (YMAE) intake on the inflammatory response and insulin signaling regulation in the liver of *Wistar* rats submitted to adjusted high-fat diet (HFD). **Methods –** Male Wistar rats were fed with a control diet (n=18) or a HFD (n=18) for 12 weeks. After this, six animals of each group were euthanized and the rest of the animals were distributed in groups that received, or not, by gavage, YMAE (1g/kg body weight/day) for four weeks. Then, all the animals were euthanized and was determined the glucose, insulin, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, triacylglycerol (TAG), leptin, adiponectin, TNF-α, IL-6, C-reactive protein (CPR), plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 and MCP-1 concentration, and the alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) plasma activity. Histological analysis was performed for the evaluation of lipid infiltration. The body composition of the animal was also evaluated. To expression evaluation of the JNK, IKK-β, NF-κB, IRS-1 and AKT, a group of animals (n = 36) underwent the same experimental protocol, however, insulin infusion were done previously to moment of euthanasia. All animal were submitted to the oral glucose tolerance test (oGTT) and the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) in the first, twelfth and sixteenth weeks of the experimental protocol. **Results –** After 12 weeks of experimental protocol, HLBL group had higher feed intake, however, isocaloric intake when compared to the CONBL group ($p < 0,05$). The HLBL group had a significant

increase of weight gain; retroperitoneal adipose deposit and liver weight; fasting glycaemia; glycaemia when submitted to oGTT in all times of the test and upon ipITT at time 0, 5, 30 and 40; serum total cholesterol, LDL-cholesterol; PAI-1 and CRP in relation to CONBL ($p < 0.05$). Only one third of the HLBL animals presented micro and macrogoticular discrete degeneration. The consumption of HFD decreased the hepatic AKT phosphorylation compared to animals fed with the CON diet ($p < 0,05$). As regards to the YMAE effects, it was observed that this intervention did not alters food consumption, because the animals submitted to the HFD, with or without YMAE administration, ingested significantly lower quantity in relation to their respective control groups ($p < 0.05$). However, energy consumption again proved to be isocaloric ($p < 0.05$). The administration of YMAE reversed the weight gain in the groups fed with HFD and also reduced the percentage of carcass fat in the animals fed with the CON diet in relation to the respective groups without intervention ($p < 0.05$). The CONEM group presented an increased percentage of lean mass and reduction in blood glucose concentration in the ipITT after 5 and 10 minutes from the beginning of the test when compared to the control group ($p < 0.05$). The YMAE reduced serum total cholesterol concentration in the group fed with the HFD compared to CON group ($p < 0,05$). The HLEM group presented lowest ratio of expression of phosphorylated by total IKK-β, NFκB phosphorylation, as well as the major ratio of the expression of phosphorylated by total AKT than HFD group ($p < 0,05$). **Conclusions –** HFD intake induced liver pro-inflammatory profile and glucose intolerance. Thus, HFD intake can be considered a relevant factor in the etiology of obesity and the development of chronic non-comunicable diseases, in particular, the type 2 diabetes. The intervention with YMAE modulates the inflammatory response and decreased glucose intolerance. All these factors together indicate that yerba mate may have a positive effect on risk reduction and treatment of chronic diseases.

Descriptors: High-fat diet; Obesity, Inflammation; Insulin Resistance; Yerba Mate.

ÍNDICE

1 REVISÃO DA LITERATURA 27

1.1 OBESIDADE E PADRÃO DE DIETA 27

1.2 INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDA PELA OBESIDADE 30

1.3 EFEITO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA 31

1.4 RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA E INFLAMAÇÃO NO TECIDO HEPÁTICO 34

1.5 ERVA-MATE (*Ilex paraguarienses*) 37

1.5.1 Erva-mate e Inflamação 40

2 JUSTIFICATIVA 42

3 HIPÓTESE DE ESTUDO 43

4 OBJETIVO 44

4.1 OBJETIVO GERAL 44

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 44

5 MATERIAL E METODOS 45

5.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS 45

5.1.1 Animais 45

5.1.2 Ração 45

5.1.3 Grupos experimentais 46

5.1.4 Preparo e Administração da Erva-mate 48

5.1.5 Quantificação e Identificação de Compostos Fenólicos e de Cafeína Presentes no Extrato Aquoso de Erva-mate Liofilizado 49

5.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO 50

5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS 52

5.3.1 Determinação da Concentração Sérica de Glicose 52

5.3.2 Determinação da Concentração Sérica de Colesterol 52

Total, LDL-Colesterol, HDL-Colesterol e TAG
5.3.3 Determinação da Atividade Sérica das Enzimas Alanina Aminostransferase e Aspartato Aminotransferase 53
5.3.4 Determinação da Concentração Sérica de Insulina, Adiponectina, Leptina, PAI-1, PCR, MCP-1, TNF-A e IL-6 53
5.3.5 Determinação do Índice Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance (HOMA-IR) 54
5.3.6 Teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e teste intraperitonial de tolerância à insulina (ipITT) 54
5.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARCAÇA 55
5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO 56
5.6 AVALIACAO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HEPÁTICAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA 57
5.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DO LISADO HEPÁTICO 58
5.8 *WESTERN BLOTTING* 58
5.8.1 Preparo do Gel de Poliacrilamida 58
5.8.2 Preparo do Lisado de Proteínas para o Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) 59
5.8.3 Transferência de Proteínas do Gel para a Membrana de Nitrocelulose 59
5.8.4 Sondagem das Proteínas com Anticorpos 60
5.8.5 Revelação com sistema Quimioluminescente 61
5.8.6 Normalização da Quantidade de Proteína da Amostra Pipetada pela β-actina 61
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 62
6 RESULTADOS 63
6.1 RESULTADOS REFERENTES À 1ª SEMANA DO 63

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 65
6.2 RESULTADOS REFERENTES À 12ª SEMANA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL – EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA
6.3 RESULTADOS REFERENTES À 16ª SEMANA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL – EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA ERVA-MATE 89
6.2.1 Caracterização dos Compostos Bioativos do Extrato Aquoso da Erva-mate 89
6.2.2 Avaliação do Efeito do Extrato Aquoso da Erva-mate 91
7 DISCUSSÃO 119
7.1 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS REFERENTES À 12ª SEMANA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL 119
7.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS REFERENTES À 16ª SEMANA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL 130
8 CONCLUSÕES 136
9 REFERÊNCIAS 137
CURRÍCULO LATTES PATRÍCIA SILVA JACOB 160
CURRÍCULO LATTES MARCELO MACEDO ROGERO 161

Lista de Tabelas

Tabela 1	Composição das rações experimentais segundo valor energético	46
Tabela 2	Reagentes do tampão de extração de proteínas totais do fígado	57
Tabela 3	Parâmetros séricos referentes à resposta inflamatória na 12ª semana do protocolo experimental	77
Tabela 4	Identificação dos compostos fenólicos do chá mate por CLUE-ESI/MS no modo de ionização negativo	90
Tabela 5	Parâmetros de validação do método analítico (CLUE-DAD) para caracterização do chá mate solúvel: precisão intra e inter-dia para tempo de retenção e área dos picos, limite de detecção e limite de quantificação	91
Tabela 6	Quantificação dos compostos presentes no extrato solúvel da erva-mate	91
Tabela 7	Parâmetros séricos referentes à resposta inflamatória	106

Lista de Figuras

Figura 1	Possível mecanismo de ação dos compostos bioativos presentes no extrato aquoso de erva-mate.	43
Figura 2	Distribuição dos animais nos grupos experimentais (1ª SEMANA)	63
Figura 3	Teste de tolerância oral a glicose e teste de tolerância intraperitoneal a insulina (1ª SEMANA)	63
Figura 4	Consumo médio e consumo total de ração (12ª SEMANA)	65
Figura 5	Consumo energético médio e consumo energético total (12ª SEMANA)	66
Figura 6	Curva de peso e ganho de peso corporal (12ª SEMANA)	67
Figura 7	Coteúdo de água da carcaça total, água relativa ao peso, conteúdo de lipídeos da carcaça total e lipídeos relativos ao peso (12ª SEMANA)	68
Figura 8	Conteúdo de massa magra da carcaça total, massa magra relativa ao peso, conteúdo de proteínas da carcaça total, proteínas relativas ao peso, conteúdo de cinzas total e cinzas relativas ao peso (12ª SEMANA)	69
Figura 9	Peso dos coxins adiposos periepididimal, peso dos coxins adiposos retroperitoneal, soma dos pesos dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal (12ª SEMANA)	70
Figura 10	Peso do coração e do fígado (12ª SEMANA)	71

Figura 11	AUC e curva de glicemia nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos referentes ao oGTT (12ª SEMANA)	72
Figura 12	AUC e curva glicêmica nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos referentes ao ipITT (12ª SEMANA)	73
Figura 13	Glicemia, insulina e índice HOMA-IR (12ª SEMANA)	74
Figura 14	Perfil lipídico (12ª SEMANA)	75
Figura 15	Atividade da enzima alanina aminotransferase, atividade da enzima aspartato aminatransferase e razão ALT/AST (12ª SEMANA)	76
Figura 16	PAI-1, adiponectina e PCR (12ª SEMANA)	78
Figura 17	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo CONBL – AUMENTO 10 x (12ª SEMANA)	79
Figura 18	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo CONBL – Aumento 20 X (12ª SEMANA)	80
Figura 19	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo CONBL – Aumento 40 X (12ª SEMANA)	80
Figura 20	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo HLBL – Aumento 10 X (12ª SEMANA)	81
Figura 21	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo HLBL – Aumento 20 X (12ª SEMANA)	81
Figura 22	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo HLBL – Aumento 40 X (12ª	82

	SEMANA)	
Figura 23	Fotomicrografia de corte histológico de congelação de fígado de rato – Aumento 40 X (12ª SEMANA)	82
Figura 24	Expressão da IKK-β total, IKK- β fosforilada (Ser 180) e razão da IKK-β fosforilada pela IKK-β total (12ª SEMANA)	84
Figura 25	Expressão da JNK total, JNK fosforilada (Tyr 185) e razão da JNK fosforilada pela JNK total (12ª SEMANA)	85
Figura 26	Expressão do NFκB fosforilado (12ª SEMANA)	86
Figura 27	Expressão da IRS-1 total, IRS-1 fosforilada (Ser 307) e razão da IRS-1 fosforilada pela IRS-1 total (12ª SEMANA)	87
Figura 28	Expressão da AKT total, AKT fosforilada (Ser 473) e razão da AKT fosforilada pela AKT total (12ª SEMANA)	88
Figura 29	Cromatograma CLUE-DAD (λ = 324 nm) com compostos fenólicos presentes no chá mate (16ª SEMANA)	89
Figura 30	Cromatograma CLUE-DAD (λ = 272 nm) com identificação da cafeína presente no chá mate (16ª SEMANA)	90
Figura 31	Consumo médio e total de ração em gramas (16ª SEMANA)	93
Figura 32	Consumo energético médio e consumo energético total (16ª SEMANA)	94
Figura 33	Curva de peso e ganho de peso corporal (16ª SEMANA)	95
Figura 34	Conteúdo de água da carcaça total, água relativa ao peso, conteúdo de lipídeos da	96

	carcaça total e lipídeos relativos ao peso (16ª SEMANA)	
Figura 35	Conteúdo de massa magra da carcaça total, massa magra relativa ao peso, conteúdo de proteínas da carcaça total, proteínas relativas ao peso, conteúdo de cinzas total e cinzas relativas ao peso (16ª SEMANA)	97
Figura 36	Peso dos coxins adiposos periepididimal, peso dos coxins adiposos retroperitoneal, soma dos pesos dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal (16ª SEMANA)	98
Figura 37	Peso do coração e do fígado (16ª SEMANA)	99
Figura 38	AUC e curva de glicemia nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos referentes ao oGTT (16ª SEMANA)	100
Figura 39	AUC e curva glicêmica nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos referentes ao ipITT (16ª SEMANA)	101
Figura 40	Glicemia, insulina e índice HOMA-IR (16ª SEMANA)	102
Figura 41	Perfil lipídico (16ª SEMANA)	104
Figura 42	Atividade da enzima alanina aminotransferase, atividade da enzima aspartato aminatransferase e razão ALT/AST (16ª SEMANA)	105
Figura 43	PAI-1, adiponectina e PCR (16ª SEMANA)	107
Figura 44	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo CON – Aumento 10 X (16ª SEMANA)	108
Figura 45	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo CON – Aumento 20 X (16ª	109

	SEMANA)	
Figura 46	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo HL – Aumento 10 X (16ª SEMANA)	109
Figura 47	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo HL – Aumento 20 X (16ª SEMANA)	110
Figura 48	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo HL – Aumento 40 X (16ª SEMANA)	110
Figura 49	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo CONEM – Aumento 10 X (16ª SEMANA)	111
Figura 50	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo CONEM – Aumento 20 X (16ª SEMANA)	111
Figura 51	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo HLEM – Aumento 10 X (16ª SEMANA)	112
Figura 52	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal do grupo HLEM – Aumento 20 X (16ª SEMANA)	112
Figura 53	Expressão da IKK-β total, IKK- β fosforilada (Ser 180) e razão da IKK-β fosforilada pela IKK-β total (16ª SEMANA)	114
Figura 54	Expressão da JNK total, JNK fosforilada (Tyr 185) e razão da JNK fosforilada pela JNK total (16ª SEMANA)	115
Figura 55	Expressão do NFκB fosforilado (16ª SEMANA)	116
Figura 56	Expressão da IRS-1 total, IRS-1 fosforilada (Ser 307) e razão da IRS-1 fosforilada pela IRS-1	117

	total (16ª SEMANA)	
Figura 57	Expressão da AKT total, AKT fosforilada (Ser 473) e razão da AKT fosforilada pela AKT total (16ª SEMANA)	118

Siglas Utilizadas

AGNE	Ácidos graxos não esterificados
AGS	Ácidos graxos saturados
AIN	American Institute of Nutrition
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	Área sob a curva
BCA	Ácido bicinconínico
CBA	Compostos bioativos dos alimentos
chSREBP	*Carbohydrate responsive element-binding protein*
CON	Controle
COX	Ciclooxigenase
CLUE	Cromatografia líquida de ultra-eficiência
CQA	Ácido dicafeoilquínico
DAD	Detector de arranjos de diodos
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DIO	Obesidade induzida pela dieta
DM	Diabetes *mellitus*
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DTT	Ditiotreitol
EAEM	Extrato aquoso de erva-mate
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica
ERK	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
ERO	Espécies reativas de oxigênio

FOXO	*Forkhead box protein O*
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GLP	Peptídeo semelhante ao glucagon
GLUT	Transportador de glicose
GSK	Quinase da glicogênio sintetase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HF	Rica em frutose
HL	Hiperlipídica
HOMA-IR	*Homeostasis model assessment – insulin resistance*
IASO	*International association for the study of obesity*
ICH	*International conference of harmonization*
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL	Interleucina
IKK-β	Inibidor β da quinase do fator nuclear de transcrição kappa B
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ipITT	Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JNK	c-jun N-terminal quinase
LD	Limite de detecção
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipoxigenase
LLP	Lipase de lipoproteína
LPS	Lipopolissacarídeos
LQ	Limite de quantificação
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP	Proteína quimiotática para monócitos
mTOR	Proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCHS	*National center for health statistics*
NF-κB	Fator nuclear kappa B

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
oGTT	Teste oral de tolerância à glicose
OMS	Organização mundial da saúde
PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Proteína C reativa
PDK	Quinase dependente de fosfoinositol
PE	Ficoeritrina
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI 3-K	Fosfatidilinositol 3–quinase
PGC	Co-ativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas
PKB/AKT	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PKR	Proteína quinase R
POF	Pesquisas de orçamentos familiares
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
SH2	Homologia a Src 2
SIM	*Single ion monitoring*
SOCS	Supressoras da sinalização de citocinas
SREBP	Proteína ligadora do elemento regulado por esterol
TAG	Triacilgliceróis
TAK	Quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento-β
TEMED	*Tetramethylethylenediamine*
TIG	Taxa de infusão de glicose
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do TNF
TR	Tempo de retenção
U	Unidades

UA	Unidades arbitrárias
UCP	Proteína desacopladora
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WB	*Western Blotting*

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 OBESIDADE E PADRÃO DE DIETA

No ano de 1997, a Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou a obesidade como grave problema de saúde pública (OMS, 2000) e, atualmente, considera que há, pelo menos, cerca de um bilhão de adultos acima do peso e 300 milhões de obesos em todo o mundo (OMS, 2010). A publicação mais recente do *National Center for Health Statistics* (NCHS) revelou que nos Estados Unidos da América (EUA), entre 2009-2010, a prevalência na obesidade era de 35,5% e 35,85% para homens e mulheres, respectivamente (FLEGAL et al., 2012).

No Brasil, dados recentes da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008-2009 indicam diminuição progressiva do déficit de peso em adultos (2,7%) e aumento constante do excesso de peso e da obesidade nessa faixa etária. O excesso de peso foi constatado em cerca de metade dos homens (50,1%) e das mulheres (48%), com uma prevalência total de 49%. A obesidade, por sua vez, foi observada em 14,8% dos indivíduos avaliados, sendo que as mulheres apresentaram-se mais obesas (16,9%) do que os homens (12,5%). Ressalta-se também a crescente prevalência, em crianças e adolescentes, de excesso de peso (33,5% e 20,5%, respectivamente) e de obesidade (14,3% e 4,9%), respectivamente (IBGE, 2010).

Estima-se que a obesidade represente um gasto de 2-6% dos custos totais com saúde em países desenvolvidos, no entanto, os valores reais provavelmente são muito maiores, visto a gravidade do problema e da participação da obesidade na etiologia de outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (OMS, 2003). No Brasil, os custos diretos e indiretos relacionados à obesidade representam cerca de 1,5 bilhão de reais por ano, o qual inclui internações hospitalares, consultas médicas e uso de medicamentos. Desse valor, 600 milhões são provenientes do Sistema

Único de Saúde (SUS), o que representa 12% do orçamento gasto em relação às demais doenças (ANJOS, 2006).

A obesidade pode ser definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal, em tal extensão que acarrete prejuízos à saúde dos indivíduos, como dificuldades respiratórias, problemas dermatológicos e distúrbios do aparelho locomotor, além de propiciar o surgimento de algumas doenças, como dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* (DM) tipo 2 e alguns tipos de cânceres (OMS, 2000; HOTAMISLIGIL, 2006). Além disso, o excesso de peso está relacionado a outras condições como, por exemplo, cálculos biliares, doenças osteoarticulares e depressão (CICUTTINI et al., 1996; BERGSTRÖM et al., 2001; FIELD et al., 2001; WILSON et al., 2002; STEIN; COLDITZ, 2004; SULLIVAN et al., 2005; HEO et al., 2006; PÉREZ PÉREZ et al., 2007).

A obesidade possui etiologia multifatorial (OMS, 2000; PENA; BACALAU, 2000), envolvendo fatores históricos, ecológicos, políticos, socioeconômicos, psicossociais, biológicos e culturais (BRASIL, 2006; MONDINI; MONTEIRO, 1998; STUNKARD, 2000). Dentre os principais fatores relacionados à ocorrência da obesidade, destacam-se aqueles relacionados ao estilo de vida, como dieta, atividade física e tabagismo (ROBERTS; BARNARD, 2005). Sob este aspecto, pode-se dizer que o fenômeno da transição nutricional ocorrida no século passado foi um dos principais fatores que acarretou em alterações dos hábitos alimentares, convergindo para a ingestão de uma dieta mais rica em lipídios (particularmente de origem animal), açúcares e alimentos refinados, e pobre em carboidratos complexos e fibras alimentares, a qual tem sido designada como "dieta ocidental" (MONTEIRO et al., 1995).

A alta quantidade de lipídios na dieta está associada ao elevado consumo de ácidos graxos saturados, *trans* e poliinsaturados ômega-6 (OMS, 2003; IBGE, 2004). Há evidências de que o alto consumo de ácidos graxos saturados eleva a concentração plasmática de colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, deste modo, a incidência da aterosclerose, a qual aumenta o risco de ocorrência de doenças

cardiovasculares (DCV) (GRUNDY, 2001). Atuando da mesma forma, a ingestão de ácidos graxos *trans* também acarreta em alteração da concentração plasmática de colesterol total, VLDL-colesterol, LDL-colesterol e triacilgliceróis (TAG), além de induzir um quadro de esteatohepatite não alcoólica. Todos estes fatores estão associados ao desenvolvimento da resistência à ação da insulina e hiperglicemia, ao mesmo tempo em que possuem relação positiva com as DCV (MACHADO et al., 2010; WILLETT, ASCHERIO, 1995).

As informações disponibilizadas pela POF 2002-2003 evidenciaram aumento do consumo de produtos industrializados, lipídios totais e de gorduras saturadas, aliado ao baixo consumo de frutas e de hortaliças e à diminuição da ingestão de cereais e de leguminosas. Esses fatos estão associados à crescente participação das DCNT no perfil de morbi-mortalidade da população brasileira e, particularmente, com o aumento da prevalência do excesso de peso no país (IBGE, 2004; LEVY-COSTA et al., 2005).

Os dados mais atuais da POF indicam uma pequena melhora no que diz respeito ao aumento do consumo de frutas, legumes e verduras, bem como à diminuição do consumo de farinhas, féculas e massas; açúcares; panificados e óleos e gorduras. No entanto, o consumo de cereais, leguminosas e oleaginosas continua decrescendo e, em contrapartida, o consumo de carnes, vísceras, pescados e alimentos industrializados, aumentando (IBGE, 2010; MONTEIRO et al., 2010). Tais fatos evidenciam uma dieta ainda caracterizada pela presença excessiva de lipídios, ao mesmo tempo em que há evidências de que o elevado consumo desse nutriente possa contribuir para o desenvolvimento da obesidade (WEST; YORK, 1998; ASTRUP et al., 2000).

1.2 INFLAMAÇÃO CRÔNICA INDUZIDA PELA OBESIDADE

A resposta inflamatória promove a síntese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores angiogênicos e de crescimento, bem como a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio, sendo esse processo parte fundamental da resposta imune na presença de patógenos (BEUTLER et al., 2006). Entretanto, há exemplos de situações nas quais a inflamação não é decorrente da presença de patógenos no organismo, sendo esta estimulada contra componentes teciduais, conforme pode ser observado em doenças auto-imunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (ABOU-RAYA; ABOU-RAYA, 2006). Há também classes de doenças que apresentam um componente latente de inflamação crônica, conforme se verifica nas doenças inflamatórias intestinais — doença de Crohn e retocolite ulcerativa inespecífica —, nas quais há evidente relação entre fatores genéticos e ambientais na etiologia (GUARNER, 2007).

Cabe ressaltar que a obesidade também representa um fator etiológico da inflamação crônica e, consequentemente, da disfunção de órgãos (QATANANI; LAZAR, 2007; BERG; SCHERER, 2005). A ingestão excessiva de lipídios acarreta em maior armazenamento desse nutriente no interior do adipócito (hipertrofia), no entanto, quando o adipócito ultrapassa o seu limiar critico de armazenamento, esta célula exibe sinais de estresse como: hipóxia, alteração da função mitocondrial, aumento da produção de ERO, ativação de vias de sinalização intracelulares envolvidas com apoptose, liberação de ácidos graxos não esterificados (AGNE), aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e estresse do retículo endoplasmático (HOTAMISLIGIL, 2010; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2007; OPIE; WALFISH, 1963).

Em estudos envolvendo humanos e animais, constata-se que a resposta inflamatória decorrente da obesidade reside, inicialmente, no tecido adiposo, que é responsável pela secreção de diversas citocinas pró-

inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF)-α, a interleucina (IL)-6 e a IL-1 e de fatores com ação quimiotática, como a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1. Neste sentido, constata-se que a expressão de adipocinas com ação pró-inflamatória é elevada em camundongos e humanos obesos, enquanto a síntese de adiponectina — adipocina com ação antiinflamatória — é reduzida (CANCELLO; CLÉMENT, 2006). Uma das hipóteses sugeridas para a redução da concentração plasmática da adiponectina em indivíduos obesos está relacionada à modulação exercida por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, que promove a redução da expressão gênica e da liberação da adiponectina em adipócitos (OUCHI et al., 2000). Cabe destacar que a concentração plasmática de adiponectina possui correlação negativa com o percentual de gordura corporal, a distribuição de gordura central, a concentração plasmática de insulina em jejum, a tolerância oral à glicose e com fatores de risco cardiovascular, como pressão arterial sistólica e diastólica e concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-colesterol, TAG e ácido úrico (MATSUZAWA et al., 2004).

1.3 EFEITO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SOBRE A VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA

A insulina é um hormônio produzido pelas células β das ilhotas pancreáticas e é importante para a manutenção da homeostase da glicose e do crescimento e diferenciação celular. Sua secreção ocorre em resposta ao aumento da concentração plasmática de glicose e de aminoácidos. Sob esse aspecto, destaca-se, dentre as suas funções, a redução da produção hepática de glicose — por meio da diminuição da gliconeogênese e da glicogenólise —, aumento da captação periférica de glicose pelos tecidos

muscular e adiposo, estímulo da lipogênese no fígado e no tecido adiposo branco, redução da lipólise, bem como aumento da síntese proteica e inibição da proteólise (BOGARDUS et al., 1995).

A partir de uma complexa via de sinalização, a insulina realiza suas funções biológicas, que são inicialmente desencadeadas pela sua ligação ao receptor de insulina (IR) (TANIGUCHI et al., 2006). Em condições normais, a ligação da insulina à subunidade α de seu receptor permite que a subunidade β adquira atividade quinase, o que promove a alteração conformacional e auto-fosforilação do IR. Uma vez ativado, o IR fosforila resíduos de tirosina contidos em vários substratos proteicos, como o substrato do receptor de insulina (IRS) (SALTIEL; PESSIN, 2002). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS-1 e IRS-2 propicia a formação de sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), como a fosfatidilinositol 3–quinase (PI 3-K) (WHITE, 1998), o que culmina na ativação de quinases, como a quinase dependente de fosfoinositol (PDK)-3 (SALTIEL, KAHN, 2001). Dentre os substratos conhecidos dessa quinase, destaca-se a proteína quinase B (PKB/AKT), bem como as formas atípicas da proteína quinase C (PKC) (LIU et al., 1999). A AKT, por sua vez, é responsável por mediar os efeitos da insulina no transporte de glicose, o qual é realizado pelo transportador de glicose (GLUT)-4 em tecidos periféricos, como no músculo e no tecido adiposo (SALTIEL, KAHN, 2001).

Dentre outras funções, a ativação da AKT também favorece a síntese de glicogênio, uma vez que a AKT inativa a proteína quinase da glicogênio sintase (GSK)-3, o que reduz a taxa de fosforilação da enzima glicogênio sintase e, consequentemente, aumenta a atividade desta enzima (CROSS et al., 1995). Neste contexto, a ativação da PI 3-K induz a ativação da proteína fosfatase 1, o que promove a desfosforilação da enzima glicogênio sintase (BRADY et al., 1997).

A ativação da AKT também tem influência na supressão da gliconeogênese hepática, uma vez que esta proteína fosforila uma família de fatores de transcrição designada FOXO, o que reduz a expressão de genes

que codificam enzimas envolvidas na neoglicogênese, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) (LIAO et al., 1998; HALL et al., 2000).

A fosforilação do IRS-1 no seu resíduo de serina na posição 307 por determinadas quinases acarreta em diminuição da sua capacidade de ligação ao IR, com consequente diminuição da ativação da PI 3-K e do transporte de glicose nos tecidos muscular e adiposo, ao mesmo tempo em que promove redução da capacidade de síntese de glicogênio e da inibição da produção hepática de glicose no fígado, cuja associação de fatos culmina no aumento da glicemia (ZICK, 2005).

As citocinas pró-inflamatórias podem prejudicar a sinalização da insulina por diversos mecanismos, incluindo a ativação da família de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS), uma vez que estas podem diminuir a capacidade de ligação do IRS-1 e do IRS-2 ao IR, bem como reduzir a atividade e aumentar a degradação do IRS-1 (HOWARD; FLIER, 2006; LEBRUN; VAN OBBERGHEN, 2008). Cabe destacar que o aumento da expressão da SOCS-3 no tecido hepático diminui a atividade da PI-3K (UEKI et al., 2004).

Algumas quinases podem ser consideradas proteínas-chave no que diz respeito à fosforilação do resíduo de serina 307 da IRS-1, como a quinase do inibidor do fator nuclear kappa B (IKK)-β, a c-jun N-terminal quinase (JNK) e a PKC, as quais estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento da resistência à ação da insulina em resposta a um estresse fisiológico, como observado, por exemplo, em animais submetidos à ingestão de ração hiperlipídica (HL) (HIROSUMI et al., 2002; AGUIRRE et al., 2000; GAO et al., 2003; GRIFFIN et al., 1999; ZICK, 2005; GAO et al., 2002).

A JNK é ativada por citocinas, como o TNF-α, e por AGNE (AGUIRRE et al., 2000; GAO et al., 2002). Por outro lado, camundongos *knockout* para os genes que codificam as proteínas JNK-1 e JNK-2, quando submetidos à ingestão de ração HL (50% do valor energético total na forma de lipídios), apresentam redução da fosforilação do resíduo de serina 307 do IRS-1

(TUNCMAN et al., 2006). A IKK-β também está envolvida na ativação da via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) e, consequentemente, esta quinase pode favorecer o aumento da resposta inflamatória e do desenvolvimento da resistência periférica à ação da insulina (SHOELSON et al., 2006). Em ensaios envolvendo culturas de hepatócitos, o bloqueio da ativação da IKK proporciona às células resistência à ação do TNF-α. Portanto, similarmente à JNK, a ativação da IKK-β no fígado por si só parece ser suficiente para ocasionar a resistência à ação da insulina (CAI, et al., 2005).

1.4 RESISTÊNCIA À AÇÃO DA INSULINA E INFLAMAÇÃO NO TECIDO HEPÁTICO

Embora o tecido adiposo tenha sido o principal foco em alguns estudos sobre a sinalização e a resposta inflamatória em condições obesogênicas, tem sido evidente que há outros tecidos metabolicamente importantes no que diz respeito às respostas imune e metabólica nessas circunstâncias (OLEFSKY; GLASS, 2010). O fígado é um órgão que apresenta diversas funções relevantes no organismo, como regulação do metabolismo de macronutrientes, papel na detoxificação de xenobióticos, bem como possui a capacidade de regeneração, o que evidencia a capacidade deste órgão de executar reações adequadas para manter a homeostase corporal (RACANELLI; REHERMANN, 2006).

O fígado é um órgão essencial no que diz respeito à regulação do metabolismo da glicose, de aminoácidos e de lipídios (CONSOLI, 1992; RADZIUK; PYE, 1999). Dentre as células que estruturam este tecido, encontram-se os hepatócitos, que são responsáveis por funções de síntese, de secreção e de eliminação; as células estelares, que secretam colágeno;

as células de *Kupffer*, que são macrófagos residentes; as células epiteliais do ducto biliar; e as células endoteliais dos sinusóides (ZAHLTEN et al., 1981). As células de *Kupffer* são o maior grupo de macrófagos residentes do organismo humano e representam aproximadamente 20% das células não parenquimais hepáticas — derivadas de monócitos circulantes —, que residem no espaço vascular sinusóide, predominantemente na área periportal (MACKAY, 2002).

A função central do fígado na resposta inflamatória é ressaltada pela sua localização anatômica única, que permite aporte sanguíneo contínuo não apenas pelo sistema arterial (artérias hepáticas), mas também pelo trato digestório, via veia porta. A organização estrutural do parênquima hepático tem importante implicação na função imunológica e, nesse contexto, destaca-se que cerca de um terço do total do sangue circulante perfunde o fígado por minuto (RACANELLI; REHERMANN, 2006), o que implica que cerca de 10^8 linfócitos entram em contato, diariamente, com o tecido hepático (WICK et al., 2002). Aliado a esse fato, células sanguíneas do sistema imune inato e adaptativo circulam por uma rede de sinusóides no fígado, o que permite contato com uma variedade de células, como hepatócitos, células endoteliais e células *Kupffer.* A comunicação entre essas células e a regulação das funções hepáticas são principalmente mediadas por citocinas, as quais têm ação endócrina, parácrina e autócrina (RACANELLI; REHERMANN, 2006; TACKE et al., 2009).

A obesidade, especialmente do tipo visceral, leva ao desenvolvimento da resistência à ação da insulina no fígado, sendo esta uma das principais causas do desenvolvimento da intolerância à glicose e, subsequentemente, do DM tipo 2, cujo fato pode estar relacionado à ausência da supressão da produção endógena hepática de glicose após as refeições (SIRONI et al., 2011; MADEC et al., 2011; FERRANNINI et al., 1988).

Diversos estudos têm demonstrado que a sinalização hepática da insulina ocorre, principalmente, em função da proteína IRS-2, ao invés do IRS-1 (ROTHER et al., 1998; KIDO et al., 2000). As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram estabelecidas em estudos envolvendo camundongos

knockout para esses substratos. O camundongo que não expressa o IRS-1 apresenta resistência à ação da insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico (ARAKI et al., 1994). Entretanto, o camundongo que não expressa o IRS-2 apresenta um fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1: hiperglicemia acentuada devido à resistência à ação da insulina nos tecidos periféricos, falência da atividade secretória e redução significativa da massa das células β pancreáticas (WITHERS et al., 1998). A resistência hepática à ação da insulina é um fator relevante envolvido na fisiopatologia do DM tipo 2, sendo que a diminuição da expressão do IRS-2, com resultante interrupção da sinalização mediada pela PI-3K e pela proteína PKB/AKT, têm sido observadas em estudos envolvendo modelos animais, como em ratos *ob/ob* (KEROUZ et al.,1997; SHIMOMURA et al., 2000). Em conjunto, esses estudos evidenciam que a resistência à ação da insulina no fígado é mediada também pela inibição da IRS-2 (YAHAGI et al., 2002).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma das doenças hepáticas crônicas mais prevalentes em todo o mundo (SMITH; ADAMS, 2011; CHARLTON et al., 2001). Estudos populacionais em países ocidentais como os Estados Unidos da America têm demonstrado prevalência entre 20-30% para esta doença, enquanto em países orientais, como a China, entre 13-17% (BROWNING; HORTON, 2004a; ZELBER-SAGI et al., 2006; FAN et al., 2005; SHEN et al., 2003) A resistência à ação da insulina é um fator de risco para o desenvolvimento da DHGNA, a qual apresenta prevalência de 95% na população obesa. Dentre os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento dessa doença, destacam-se o estilo de vida e o aumento do consumo de alimentos com alto teor de lipídios e de açúcares. Ressalta-se que a DNAFG é caracterizada por acúmulo de lipídios em hepatócitos, que representa, ao menos, 5% do peso deste tecido (BASARANOGLU et al., 2010).

A esteatose hepática não alcoólica (EHNA), a qual é considerada um subgrupo da DHGNA, apresenta prevalência de 3% em indivíduos adultos e pode ser caracterizada como uma patologia crônica e progressiva, que possui a capacidade de evoluir, em longo prazo, para a fibrose hepática, a

cirrose, o carcinoma hepatocelular e a falência hepática (CALDWEL et al., 1999; POONAWALA et al., 2000; MARCHESINI et al., 1999; RATZIU et al., 2002).

A fisiopatologia da EHNA ainda não está completamente esclarecida, no entanto, a principal hipótese implica em duas fases, sendo que, na primeira fase, a EHNA ocorre, inicialmente, devido ao armazenamento inadequado de lipídios ou acúmulo ectópico desse nutriente. Na segunda fase, o estresse oxidativo provoca lesão do hepatócito e, consequentemente, desenvolvimento da inflamação (TILG; MOSCHEN, 2010; MARCHESINI et al., 2001; MARCHESINI et al., 1999).

O aumento da produção de ERO e da peroxidação lipídica na membrana plasmática e em organelas de hepatócitos promove a necroinflamação, a ativação de células estelares e a fibrose no fígado. Nesse contexto, a elevada concentração de AGNE na circulação e no fígado; as anormalidades mitocondriais; as endotoxinas derivadas do intestino, como lipopolissacarídeos (LPS), oriundos de bactérias Gram negativas e sua interação com o fígado; e a síntese de adipocitocinas são considerados os principais fatores de risco no desenvolvimento da esteato-hepatite em modelos animais. Os AGNE também são considerados importantes indutores da produção hepática mitocondrial, peroxissomal e microssomal de ERO, bem como têm relevante papel na transição da esteatose simples para a EHNA (SEPPÄLÄ-LINDROOS et al., 2002; MILAGRO; CAMPIÓN; MARTÍNEZ, 2006).

1.5 ERVA-MATE *(Ilex paraguariensis)*

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore da família das aquifoliáceas nativa da região subtropical da América do Sul presente no sul

do Brasil, norte da Argentina, no Paraguai e no Uruguai (ANDERSEN; FOGH, 2001). O consumo de bebidas a base de erva-mate é uma prática observada há centenas de anos, sendo que sua propriedade estimulante já era previamente conhecida pelos indígenas antes da chegada dos europeus na América do Sul (BASTOS et al., 2007a; BASTOS et al., 2007b; BASTOS et al., 2005). Segundo a medicina popular e herboristas, sua ingestão poderia atuar na melhoria da artrite, cefaléia, constipação intestinal, reumatismo, obesidade, fadiga, edema, hipertensão arterial sistêmica, digestão lenta e distúrbios hepáticos (BASTOS; TORRES, 2003; ANESI; FERRARO; FILIP, 2005).

De acordo com a legislação brasileira, o extrato aquoso de erva-mate (EAEM) pode ser classificado como tal quando se utiliza exclusivamente como produto folhas/ramos secos e desintegrados da *Ilex paraguariensis* (ANVISA, 1998). O chá mate, atualmente, é consumido de forma regular por milhões de pessoas, com ingestão média diária de um litro nas regiões em que seu consumo é cotidiano, sendo esta bebida considerada uma alternativa para a ingestão de café (MOSIMANN; WILHELM-FILHO; SILVA, 2006). Dentre as principais formas de consumo, são amplamente conhecidas: o chimarrão, tererê, chá-mate e mate cozido. O primeiro se caracteriza pela bebida obtida da maceração da erva-mate verde e cancheada em água quente, sendo consumido no sul do Brasil, no Uruguai, na Argentina e no Paraguai. O tererê é feito com a erva nas mesmas condições, entretanto, utilizando-se água fria ou gelada, sendo consumido mais frequentemente no leste e no sul do Brasil, na Argentina e no Uruguai (MAZZAFERA et al., 1997). O chá mate, por sua vez, se caracteriza pela infusão da erva-mate torrada, enquanto que o mate cozido se refere a erva verde fermentada na forma de chá, usualmente comercializada em sacos, como o chá-mate (BASTOS et al., 2005).

Apesar do mercado para bebidas a base de erva-mate ter crescido em função dos benefícios à saúde vinculados pela mídia e pelo lançamento de novos produtos com maior aceitação pelo público, como as bebidas prontas para ingestão aromatizadas com aroma natural de frutas (maçã e

pêssego) (IBGE, 2005), os resultados científicos relatando os efeitos da erva-mate são relativamente recentes, sendo que, apenas na década de 1990, que foram publicados os primeiros trabalhos que demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de infusões de erva-mate verde (chimarrão) (CAMPOS et al., 1998). Além disso, alguns estudos aventam que a ingestão do chá mate possa estimular o sistema nervoso central (GONZALEZ et al., 1993) e aumentar a proteção de oxidação do DNA e da lipoperoxidação da LDL (BRACESCO et al., 2003; HECK; DE MEJIA, 2007).

Compostos bioativos (CBA) e nutrientes têm sido identificados no chá mate, como: 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, numerosas saponinas triterpênicas — derivadas do ácido ursólico e conhecidas como metasaponinas —, alguns aminoácidos, minerais (fósforo, ferro e cálcio) e vitaminas (B1, B2 e C) (POMILIO et al., 2002; ZAPOROZHETS et al., 2004; KRAEMER et al., 1996). No que concerne à atividade antioxidante do chá-mate, os cafeoil-derivados são considerados os principais constituintes primários responsáveis pela capacidade antioxidante do chá mate (HECK; DE MEJIA, 2007). De modo geral, a concentração de polifenóis na erva-mate é superior à do chá verde e similar àquela encontrada em vinhos tintos (BIXBY et al., 2005).

Embora a presença das metilxantinas colabore para a maior parte dos efeitos fisiológicos da erva-mate, como, por exemplo, o efeito termogênico (PANG et al., 2008; POMILIO et al. 2002), muitas outras propriedades têm sido encontradas independentemente da presença desses compostos. A presença de saponinas na erva-mate apresenta a capacidade de interferir no metabolismo do colesterol e retardar a absorção intestinal de lipídios dietéticos, por meio da inibição da lipase pancreática (HAN et al., 2002; RODRIGUEZ DE SOTILLO; HADLEY, 2002). O ácido clorogênico, que é um composto fenólico também encontrado na erva-mate, pode melhorar a tolerância à glicose, diminuir os lipídios hepáticos e plasmáticos em ratos Zucker obesos, hiperlipidêmicos e resistentes à ação da insulina

(HOSTTETMANN; MARSTON, 1995), bem como a oxidação de ácidos graxos insaturados no fígado (MARTINS et al., 2009).

1.5.1 Erva-mate e Inflamação

Os estudos que relacionam a ingestão do EAEM e sua capacidade de modular a resposta inflamatória são escassos, no entanto, diversos autores têm pesquisado a atuação de CBA isolados presentes no EAEM sob este enfoque. O ácido cafeico, por exemplo, possui a capacidade de inibir a atividade das enzimas 5-lipoxigenase (LOX), 12-LOX e ciclooxigenase (COX), que estão diretamente relacionadas com a síntese de eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) (KOSHIHARA et al., 1984; MIRZOEVA et al., 1996; MICHALUART et al., 1999), enquanto o ácido 3,5-dicafeoilquínico, por sua vez, também presente no chá-mate, possui a capacidade de inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase-2 (NOS-2) e de diminuir a atividade transcricional do fator de transcrição NF-κB em macrófagos ativados por LPS (OLMOS et al., 2008).

Em um estudo *in vitro*, utilizando macrófagos ativados por LPS, a quercetina demonstrou ser um dos mais potentes inibidores da resposta inflamatória, uma vez que reduz a atividade da COX-2 nessas céulas (PUANGPRAPHANT; DE MEJIA, 2009). Além disso, em macrófagos ativados, o *Kaempferol* e a quercetina, os quais estão presentes no chá mate, são capazes dede inibir a expressão gênica e proteica da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), bem como a produção de óxido nítrico. Interessantemente, estes dois flavonóides também apresentam a capacidade de inibir a ativação do fator de transcrição NF-κB, que é um potente fator de transcrição para a iNOS (HÄMÄLÄINEN et al., 2007).

Em adendo, novamente em macrófagos ativados por LPS, a combinação de quercetina/saponinas da erva-mate resultou em interação sinérgica, inibindo a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas E2. Essa combinação também suprimiu a síntese de IL-1β e de IL-6, o que resultou na redução da translocação do NF-κB, induzida por LPS, do citoplasma para o núcleo celular. Entretanto, o extrato bruto não possui esse potente efeito antiinflamatório em função dos efeitos antagonistas de alguns compostos presentes na erva-mate (PUANGPRAPHANT; DE MEJIA, 2009).

Um estudo recente conduzido por Arçari e colaboradores (2011) verificou que a suplementação com o EAEM em camundongos alimentados com ração HL por 16 semanas diminuiu a expressão gênica das citocinas IL-6, TNF-α e iNOS, bem como aumentou a expressão proteica do IRS-1 (Tyr 1.222) e da AKT (Ser 473), nas suas formas fosforiladas, no tecido hepático. Tais resultados indicam que o EAEM diminui a resposta inflamatória, bem como reverte o prejuízo da via de sinalização da insulina no tecido hepático em animais alimentados com ração HL.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos apontam que a obesidade, principalmente visceral, está associada a um quadro de inflamação crônica e de baixa intensidade, o qual pode ser considerado como fator etiológico para o desenvolvimento da resistência à ação da insulina, que representa o defeito primário na gênese do DM tipo 2 (QATANANI; LAZAR, 2007; BERG; SCHERER, 2005). Além disso, verifica-se que há um aumento da concentração sanguínea de biomarcadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR), IL-1, IL-6, TNF-α, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI)-1 e MCP-1 em indivíduos obesos e em roedores submetidos à dieta HL.

A elevada ingestão de lipídios pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade, na qual há hipertrofia do adipócito, acarretando em aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da lipólise. Tais fatos culminam em um aumento da concentração plasmática de AGNE e de TNF-α, os quais induzem aumento da expressão hepática de proteínas quinases (IKK-β e JNK) envolvidas na inibição da via de sinalização da insulina e na ativação do fator de transcrição NF-κB, o qual promove a ativação da transcrição de diversos genes envolvidos na resposta inflamatória.

Estudos recentes mostram que o EAEM contém compostos bioativos como o ácido cafeico, o ácido 3,5-dicafeoilquínico, a quercetina e o *kaempferol*, os quais apresentam a capacidade de reduzir a resposta inflamatória (CAVE et al., 2008; NARDINI et al., 2001; OLMOS et al., 2008).

Dentro desse contexto, verifica-se que a inflamação e a resistência à ação da insulina induzidas pela ingestão de dieta HL podem ser tratadas não apenas pela redução da gordura corporal, mas potencializadas por meio da ingestão de nutrientes e de CBA dos alimentos. Sendo assim, torna-se essencial a realização de estudos que avaliem *in vivo* o efeito da ingestão do EAEM na modulação da resposta inflamatória e da via de sinalização da insulina.

3 HIPÓTESE DE ESTUDO

A ingestão de dieta HL acarreta em aumento das concentrações de citocinas e dos AGNE circulantes, o que aumenta a resposta inflamatória e induz resistência à ação da insulina. O EAEM contém CBA que podem diminuir a expressão hepática da quinases JNK e IKK-β e, desta maneira, reduzir a ativação do fator de transcrição NF-κB, bem como atenuar a intolerância à glicose (**figura 1**).

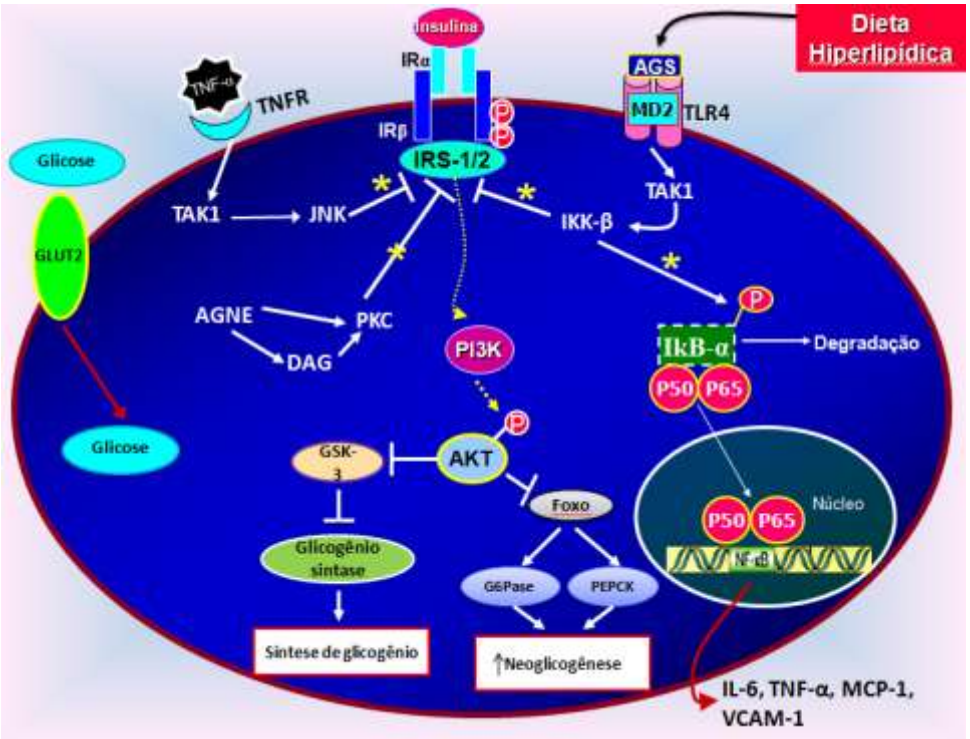

Figura 1. Possível mecanismo de ação dos compostos bioativos presentes no extrato aquoso de erva-mate. (┬) indica inibição; (→) indica ativação; (*) indica possível ponto de atuação dos CBA presentes no EAEM; (TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral-alfa; IR: receptor de insulina; AGS: ácidos graxos saturados; MD2: proteína MD2; TLR4: receptor do tipo Toll 4; TAK 1: quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento β; JNK: c-Jun N terminal kinase; IRS-1/2: substrato do receptor de insulina 1/2; IKK-β: quinase do inibidor do kappa B; GLUT2: transportador de glicose 2; AGNE: ácidos graxos não-esterificados; PKC: proteína quinase C; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; IκB-α: inibidor do fator nuclear kappa B; NF-κB: Fator nuclear kappa B; GSK-3: proteína quinase da glicogênio sintase; AKT: PKB ou proteína quinase B; FOXO: *forkhead box protein O1*; G6Pase: glicose-6-fosfatase; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase; IL-6: interleucina-6, MCP-1: proteína quimiotática para monócitos-1; VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1).

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da ingestão do EAEM (*Ilex paraguariensis*) sobre a resposta inflamatória e via de sinalização da insulina no fígado de ratos alimentados com ração HL.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da ingestão do EAEM (*Ilexparaguariensis*) sobre:

- A expressão das proteínas JNK, IKK-β e IRS-1, nas suas formas totais e fosforiladas, quando estimuladas ou não por insulina intravenosa, no fígado de ratos alimentados com ração HL.
- A composição corporal de ratos alimentados com ração HL.
- A concentração sangüínea de glicose, insulina, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, TAG, adiponectina, leptina, TNF-α, IL-6, MCP-1, PAI-1 e PCR e a atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) em ratos alimentados com ração HL.
- A resposta glicêmica após o teste oral de tolerância à glicose (oGTT) e o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) em ratos alimentados com ração HL.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

5.1.1 Animais

Foram utilizados 36 ratos *Wistar*, machos, adultos e com dois meses de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de criação, sob condições ambientais controladas, temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de 55 ± 10% e ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro (luz acesa às 7:00 h).

Todos os procedimentos a serem realizados com os ratos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (nº de protocolo 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; NIELSEN; FAHEY Jr, 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, consequentemente, favorecer a indução de ganho de peso em ratos.

Em um estudo piloto, observou-se que os animais alimentados com ração HL apresentavam redução da quantidade de ração consumida (em gramas) em comparação aos animais alimentados com ração controle (CON). Todavia, em razão da maior densidade energética da ração HL, o consumo calórico não diferiu entre os grupos. Sendo assim, optou-se por ajustar a quantidade dos ingredientes das rações experimentais pelo seu

valor energético em detrimento do ajuste pelo peso da ração com o objetivo de promover um consumo diário semelhante de proteínas, sacarose, micronutrientes, ácidos graxos essenciais e fibras 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, aumentou-se a quantidade de tertbutil hidroquinona nessa ração (PANG et al., 2008).

Tabela 1 – Composição das rações experimentais segundo valor energético.

	Ração CON	**Ração HL**
Ingredientes	**Gramas por 1.000 kcal de ração**	
Amido	155,40	29,65
Sacarose	25,04	25,04
Caseína (78,49%)	35,05	35,05
Óleo de soja	10,01	10,01
Banha de porco	0,00	55,44
Celulose	12,52	12,52
Mix minerais	8,76	8,76
Mix de vitaminas	2,50	2,50
L- cistina	0,45	0,45
Bitartarato de colina	0,63	0,63
Tertbutil hidroquinona	0,002	0,007

5.1.3 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos inicialmente em dois grupos, com 18 animais em cada grupo. Um grupo recebeu a ração CON, ou seja, a ração formulada segundo a AIN-93M, enquanto o outro grupo recebeu a ração HL.

Após 12 semanas de protocolo, seis animais de cada grupo foram sacrificados, os quais foram considerados grupos “baseline”. Posteriormente, seis animais de cada grupo receberam, por gavagem, durante um período de quatro semanas, o EAEM (*Ilex paraguariensis*) tostada (1 g/kg/dia) (ARÇARI et al., 2009; MARTINS et al., 2010). Desse modo, o estudo foi realizado com seis grupos experimentais:

- **Grupo CONBL:** grupo “baseline”, com ração CON, que foi eutanasiado após 12 semanas do início do protocolo (n = 6).
- **Grupo CON:** grupo com ração CON, que foi eutanasiado após 16 semanas do início do protocolo (n = 6).
- **Grupo CONEM 1:** grupo com ração CON, que recebeu o EAEM (1 g/kg de massa corporal) entre a 13ª e a 16ª semana de protocolo, sendo eutanasiado após 16 semanas do início do protocolo (n = 6).
- **Grupo HLBL:** grupo “baseline”, com ração HL, que foi eutanasiado após 12 semanas do início do protocolo (n = 6).
- **Grupo HL:** grupo com ração HL, que foi eutanasiado após 16 semanas do início do protocolo (n = 6).
- **Grupo HLEM 1:** grupo com ração HL, que recebeu o EAEM (1 g/kg de massa corporal) entre a 13ª e a 16ª semana de protocolo, sendo eutanasiado após 16 semanas do início do protocolo (n = 6).

Torna-se importante ressaltar que, em função da necessidade do estímulo da via da insulina, um lote de animais foi submetido ao mesmo protocolo experimental, visando à aquisição de amostras hepáticas que foram destinadas apenas para a extração dos tecidos e, posteriormente, para a realização do ensaio de *Western Blotting* (WB) das proteínas AKT e IRS-1 fosforiladas.

5.1.4 Preparo e Administração da Erva-mate

A bebida à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foi preparada por meio da dissolução do chá mate instantâneo liofilizado (Leão Júnior S.A., Curitiba-PR, Brasil) em água à temperatura ambiente autoclavada, com o uso de um homogeneizador. A bebida foi sempre preparada no momento da administração para evitar degradação dos CBA presentes no EAEM. Visando o controle da quantidade a ser suplementada, o EAEM foi administrado através de sonda gástrica (gavagem) durante as últimas quatro semanas do protocolo experimental. O grupo controle recebeu água via gavagem. Conforme descrito na literatura científica, a quantidade administrada do EAEM correspondeu a 1 g/kg de massa corporal/dia (ARÇARI et al., 2009; MARTINS et al., 2010) em uma concentração de 0,2 g/mL, sendo esta a diluição máxima possível de ser obtida a partir da manipulação do EAEM.

Ressalta-se que, no dia da eutanásia, os animais não receberam o EAEM e a água por gavagem, no intuito de evitar qualquer tipo de estresse aos animais, o que poderia acarretar em alteração dos parâmetros metabólicos de forma aguda. Em adendo, a administração do EAEM no dia da eutanásia poderia ser um fator de confusão na análise dos dados, visto que os compostos presentes na erva-mate poderiam causar um efeito agudo em diferentes vias metabólicas, sendo que o desfecho principal do presente estudo é a avaliação dos efeitos crônicos da ingestão do EAEM.

Cabe destacar que, no decorrer das duas etapas do protocolo experimental, foram utilizados frascos do EAEM liofilizado do mesmo lote, o que permitiu a administração da mesma quantidade de CBA presentes na erva-mate aos animais. Para evitar degradação dos mesmos, todos os frascos foram armazenados, no decorrer no experimento, ao abrigo de luz e de umidade.

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

A fase móvel foi constituída de ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,1% (v/v) em água deionizada (A) e metanol grau HPLC (Gold, CER Brasil) (B). Os solventes foram filtrados com membrana e desgaseificados em ultrassom antes de serem acoplados ao sistema cromatográfico. O sistema foi equilibrado com uma mistura de 85:15 dos eluentes A e B, respectivamente.

A análise de compostos fenólicos foi realizada no modo de ionização negativo e a análise de cafeína, no modo positivo. Foi realizada primeiramente uma análise *scan* para selecionar os íons mais abundantes de cada pico para análise do modo SIM (*single ion monitoring).*

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

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

os resultados, somados ao do 5-CQA pela estimativa do teor de fenólicos totais.

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

5.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Dois procedimentos foram realizados para a obtenção do material biológico, visando primeiramente às amostras de sangue para análise sérica dos parâmetros bioquímicos e inflamatórios e, posteriormente, as amostras para a avaliação da expressão das proteínas escolhidas por meio do método de WB.

Desta maneira, no primeiro procedimento, com os animais em jejum de 8 a 12 horas, determinou-se a glicemia por meio do sangue da veia caudal, utilizando-se um glicosímetro *Accu-Chek Advantage II* (*Roche Diagnostics*, Basel, Suíça).

Primeiramente, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (50 mg/kg) e cloridrato de quetamina (100 mg/kg), aplicados por via subcutânea, por meio de uma seringa de insulina com agulha 20-G (BIKMAN et al., 2009). Posteriormente, os animais foram eutanasiado por decapitação,

utilizando-se uma guilhotina apropriada. Esse procedimento foi realizado de forma rápida, visando a minimizar qualquer forma de sofrimento ou estresse dos animais. A eutanásia procedeu no período da manhã, entre 8 h e 12 h.

Foram colhidas amostras do sangue de todos os animais de cada grupo com anticoagulante para a obtenção do soro, a partir do qual foram determinadas as concentrações de insulina, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, TAG, adiponectina, leptina, TNF-α, IL-6, MCP-1, PAI-1, PCR e a atividade sérica das enzimas ALT e AST.

Posteriormente à coleta do sangue, os coxins adiposos e o fígado foram retirados e pesados. Fragmentos de cada lobo hepático foram imediatamente submetidos à fixação em formalina a 10%, para posterior preparo dos cortes histológicos.

Ainda, a partir da carcaça desses animais foi realizada a análise da composição química da mesma, ou seja, a quantificação do conteúdo de água,proteína, lipídios e cinzas presentes na carcaça.

No segundo procedimento, após constatar que o animal estava anestesiado, a cavidade abdominal foi aberta e, em seguida, uma amostra do tecido hepático (100 mg) foi retirada do lobo superior direito. Para promover o estímulo da via da insulina, foram injetadas 10 unidades (U) de insulina regular humana (Novolin R, Novo Nordisk*, Montes Claros, M. G., 100 U/ml) diluídas em solução salina na veia porta utilizando uma seringa para insulina com agulha Ultra-fine® ii de comprimento de 8 mm e calibre de 0,3mm. Após um período de 30 segundos, outra amostra do mesmo lobo de tecido hepático foi dissecada (KUBOTA et al., 2008). Depois de retiradas as amostras do fígado, ambas foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido até o final da eutanásia. 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 dos animais. O experimento foi realizado no período da manhã, entre entre 8 h e 12 h.

Posteriormente, foi realizada a extração das proteínas totais do tecido hepático dissecado. O fígado foi utilizado para avaliação da expressão, por

meio da técnica de WB, das proteínas JNK, IKK-β, AKT e IRS-1, tanto na sua forma fosforilada quanto na sua forma total, e da proteína NFκB, apenas na sua forma fosforilada.

5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

5.3.1 Determinação da Concentração Sérica de Glicose

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

5.3.2 Determinação da Concentração Sérica de Colesterol Total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e TAG

As dosagens das concentrações séricas de colesterol total e de TAG foram realizadas 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). Os valores de VLDL-c e LDL-c foram calculados por uma fórmula estimativa, proposta por Friedewald e colaboradores (1972), conforme segue abaixo:

$$\boxed{\text{VLDL} = \text{TAG} / 5}$$

$$\boxed{\text{LDL} = \text{COLESTEROL TOTAL} - (\text{HDL-c} + \text{VLDL-c})}$$

5.3.3 Determinação da Atividade Sérica das Enzimas Alanina Aminotransferase e Aspartato Aminotransferase

A atividade sérica das enzimas ALT e AST foram quantificadas por meio de *kits* comerciais (*Abbott Laboratories*, Chicago, IL, EUA), em analisador automático multicanal (*Architect C 8000 Abbott Diagnostics*).

5.3.4 Determinação das Concentrações Séricas de Insulina, Adiponectina, Leptina, PAI-1, MCP-1, TNF-α, IL-6 e PCR

As concentrações séricas de insulina, adiponectina, leptina, PAI-1, MCP-1, TNF-α e IL-6 foram quantificadas com o auxílio do *kit* Lincoplex (*Linco Research Inc*., St. Charles, MO). Basicamente, o *kit* utiliza-se do método de imunoensaio e na tecnologia Luminex^{TM} xMAP. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão presos a microesferas por meio de ligações covalentes não-reversíveis. Tais microesferas são coradas com dois tipos de fluoróforos. Desta forma, o analito se liga ao anticorpo de captura localizados na superfície das microesferas e a detecção final é realizada por meio de um marcador fluorescente, a ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única por meio de feixes de dois *lasers* diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe detecta a microesfera por meio da identificação da coloração e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

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

5.3.5 Determinação do Índice *Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance* (HOMA-IR)

O cálculo do HOMA-IR foi realizado por meio do produto da concentração da glicose (mmol/L) pela concentração da insulina (µIU/mL), dividido por 22,5 (MATTHEWS et al., 1985).

5.3.6 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 inicio do protocolo experimental foram realizados o oGTT e o ipITT. Em ambos os testes, os animais foram deixados 10 a 12 horas em jejum. No oGTT, uma amostra de sangue foi retirada da veia caudal de cada rato (tempo 0), os quais receberam, imediatamente após, via gavagem, uma solução de glicose (20%) na concentração de 2 g/kg/ p. c. (WADA et al., 2010; WANG et al., 2010). 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 (Novolin R, Novo Nordisk*, Montes Claros, M. G., Brasil, 75 mU/100 g p.c.)

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.

A determinação da concentração de glicose sanguínea em ambos os testes foi realizada utilizando-se o glicosímetro *Accu-Chek Advantage II* (*Roche Diagnostics*, Basel, Suíça).Em função do estresse causado nos animais durante os testes, foi determinado um tempo de sete dias entre a execução dos mesmos e anteriormente à eutanásia.

5.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARCAÇA

A composição corporal dos camundongos (umidade, lipídios, proteína e cinzas) foi determinada por meio de análise química da carcaça. O conteúdo de água foi determinado por meio da secagem da carcaça em uma estufa ventilada (aproximadamente 70 °C) durante sete dias, sendo a 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 umidade e lipídios — foi completamente moído (IKA M20 grinder, Labortechnik) e, posteriormente, peneirado para a remoção de pêlos, os quais podem reduzir a homogeneidade da amostra. Esse processo resultou em um pó altamente homogêneo, que foi utilizado para a determinação do conteúdo de proteína da carcaça pelo método de micro-Kjeldahl (ALBANESE; ORTO, 1963). A partir desse 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 ºC 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. Umidade, lipídios, proteína e cinzas foram expressos em valores absolutos, bem como em valores percentuais em relação à massa total da carcaça.

5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO

Cada espécime de cada grupo foi submetido à necroscopia 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.

A seguir, fragmentos do lobo hepático superior direito e esquerdo foram imediatamente submetidos à fixação em formalina a 10%. Após um período de pelo menos 48 horas, fragmentos representativos de cada amostra fixada foram submetidos à inclusão em parafina e cortes com 8 µm de espessura foram corados pela hematoxilina-eosina (MICHALANY, 1979).

O tecido fixado permaneceu nos frascos para ser, posteriormente, utilizado em método histoquímico de *Sudan Black,* visando à identificação de gordura no citoplasma dos hepatócitos (na hipótese de haver quadro de esteatose).

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.

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HEPÁTICAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA

Para a realização do processo de extração das proteínas do fígado, foram adicionados 80 uL do tampão de extração (**tabela 2**) a cada 10 mg de tecido dissecado, sendo homogeneizado em gelo com o auxílio de um *polytron* de mão em velocidade máxima por no máximo 3 *burst* de 10 segundos. Entre a homogeneização de amostras diferentes, o *polytron* foi lavado em álcool 70%, seguido de lavagem em água deionizada. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos, a 4°C e a 12.000 rpm para a remoção do material insolúvel (VICHAIWONG et al., 2009). O sobrenadante foi retirado e, deste, alíquotas de 20 µL e de 100 µL foram armazenadas em freezer -80 ºC para determinação posterior da concentração das proteínas da amostra e para utilização no método de WB, respectivamente.

Tabela 2 – Reagentes do tampão de extração de proteínas totais do fígado.

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		

5.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DO LISADO HEPÁTICO

A concentração de proteínas da amostra do lisado hepático foi determinada por meio de ensaio colorimétrico com o auxílio do *kit Pierce® BCA Protein Assay* (*Pierce Biotechnology*, Rockford, IL, EUA). Esse método utiliza uma formulação detergente baseada no ácido bicinconínico (BCA) para a detecção calorimétrica e quantificação das proteínas totais. De forma resumida, combina a redução do Cu^{+2} para Cu^{+1} pela proteína em meio alcalino usando um único reagente que contém BCA. O produto de coloração roxa é formado pela ligação de duas moléculas do BCA com um íon de cobre. Este complexo hidrossolúvel apresenta uma forte absorbância a 562 nm que é quase linear com o aumento da concentração de proteína em uma ampla curva de trabalho (20 – 2.000 µg/mL).

5.8 *WESTERN BLOTTING*

5.8.1 Preparo do Gel de Poliacrilamida

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

5.8.2 Preparo de Lisado de Proteínas para o Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

O lisado de proteína hepática utilizado de cada amostra foi de 20 µg e, a este, foi adicionado tampão *Laemmli* (1 X concentrado, 240 mM Tris-HCL, 200 mM mercaptoetanol, 0,8 % SDS, 40 % glicerol, 0,02 % azul de bromofenol) na proporção de 1:1. Posteriormente, a mistura de sobrenadante e tampão foi fervida por 5 minutos e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 70 V até o empilhamento das amostras e, posteriormente, a 120 V até o final da corrida. Como padrão, foi utilizado o marcador de peso molecular Full Range Rainbow^{TM} *Molecular Weight Markers* (*GE Healthcare Life Sciences*, Munique, Alemanha).

5.8.3 Transferência de Proteínas do Gel para a Membrana de Nitrocelulose

Inicialmente, a membrana de nitrocelulose foi incubada 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) por 10 minutos. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel de 3 mm, gel, membrana, 2 folhas papel filtro (Whatman) de 3 mm e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de do mesmo tampão de transferência citado acima, sob corrente de 25 V e 400 mA por 90 minutos. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5-10 min com

corante Ponceau (0,1% Ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com tampão PBS (8% NaCl, 0,2% g KCl, 0,2% g KH_2HPO_4 e 1,15%3 g Na_2HPO_4,).

5.8.4 Sondagens das Proteínas com Anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados por 60-90 minutos sob agitação com proteínas de leite em pó desnatado Molico®, a 5 %, em tampão PBS com 0,05% de Tween 20 (PBST). Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com PBST. Os anticorpos primários (*Cell Signaling*, MA, EUA) utilizados foram o IKK-β, phospho – IKK α/β (Ser 176/180), JNK, phospho – JNK (Thr 183), phospho – NFκB p65 (Ser 536), AKT, phospho – AKT (Ser 473), IRS-1 e phospho – IRS-1 (Ser 307), os quais foram diluídos na proporção de 1:250, 1:250, 1:1000, 1:500, 1:1000, 1:1000, 1:500, 1:250 e 1:250, respectivamente, em uma solução contendo leite em pó desnatado Molico®, a 3 %, em tampão PBST. Os anticorpors foram utilizados para a incubação *overnight* com as membranas, sob agitação e sob temperatude de 2-8 ° C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 minutos, com PBST. As proteínas foram então marcadas com anticorpo anti-IgG de coelho , conjugado com peroxidase de raiz forte (*Cell Signaling*, MA, EUA), diluído 1:2.000 em tampão PBST com leite em pó desnatado Molico®, a 3 %, por 1 hora, sob agitação e temperatura de 2-8 º C. A membrana foi lavada com PBST 3 vezes, por 5 minutos, com agitação.

5.8.5 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 B para 1 parte da solução A). 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), utilizando o software ImageQuant™ Capture Software.

5.8.6 Normalização da Quantidade de Proteína da Amostra Pipetada pela β-actina

Cabe destacar que, com o objetivo de controlar a quantidade real de proteína pipetada a partir de cada amostra, foi também determinada a expressão da proteína β-actina, que é expressa constitutivamente na célula e, portanto, indica a quantidade de proteína total pipetada (KAWAMOTO et al., 2008).

Para tanto, em seguida à revelação por quimioluminescência, a membrana foi lavada com PBST 3 vezes, por 5 minutos, com agitação e incubada com anticorpo diluído 1:50.000 de β-actina (*Sigma-Aldrich® Co*., Saint Loius, MO, EUA) por 1 hora sob agitação e temperatura de 2 – 8 º C. Novamente, a membrana foi lavada com PBST 3 vezes, por 5 minutos e submetida ao mesmo processo de revelação por quimioluminescência descrito acima.

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. Para avaliação da variância dos resultados referentes ao efeito da ingestão de ração HL, ou seja, dos animais dos grupos *baseline* (CONBL vs HLBL), utilizou-se o teste F, seguido do teste t de *Student* para comparação das médias dos resultado. No entanto, em situações em que os resultados não apresentaram distribuição gaussiana, aplicou-se o teste de Mann-Whitney. Em relação ao efeito da ingestão do EAEM, os resultados foram inicialmente avaliados quanto à homogeneidade da variância pelo testes de Cochran C, Hartley, Bartlett, submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para identificação dos contrastes significantes. Foi adotado para todas as análises um valor de alfa < 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS REFERENTES À 1ª SEMANA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Na primeira semana do protocolo experimental, os animais foram distribuídos nos respectivos grupos experimentais, de acordo com o seu peso corporal, sendo que as médias de peso corporal entre os grupos não diferiram significativamente (**figura 2**). Além disso, todos os animais foram submetidos ao oGTT (**figura 3A**) e ao ipITT (**figura 3B**), sendo que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos em relação aos valores obtidos em ambos os testes.

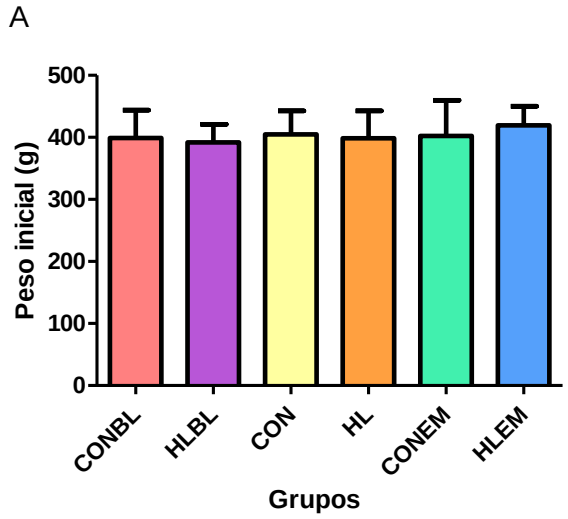

Figura 2. Distribuição dos animais nos grupos experimentais na primeira semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/ grupo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
CONBL: grupo *baseline* que ingeriu ração CON até a 12ª do protocolo experimental.
HLBL: grupo *baseline* que ingeriu ração HL até a 12ª semana do protocolo experimental.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

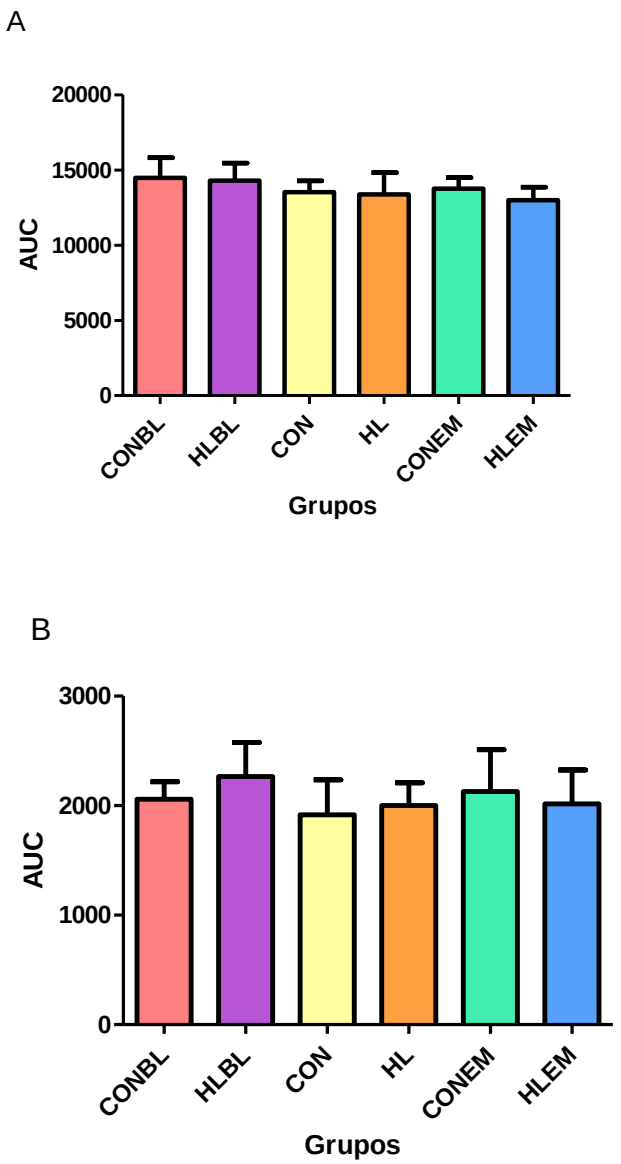

Figura 3. Teste de tolerância oral a glicose (A) e teste de tolerância intraperitoneal a insulina (B) de ratos *Wistar* no início do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
CONBL: grupo *baseline* que ingeriu ração CON até a 12ª do protocolo experimental.
HLBL: grupo *baseline* que ingeriu ração HL até a 12ª semana do protocolo experimental.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL 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 – EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA

Quanto ao consumo de ração em gramas (**figura 4A**), nota-se que os animais do grupo *baseline* que receberam a ração HL consumiram uma quantidade da ração significativamente menor quando comparada àquela do grupo controle no decorrer de todo o protocolo experimental — exceto na décima segunda semana —, o que resultou em redução de 27% da quantidade de ração consumida ao longo de 12 semanas, conforme mostra a **figura 4B**.

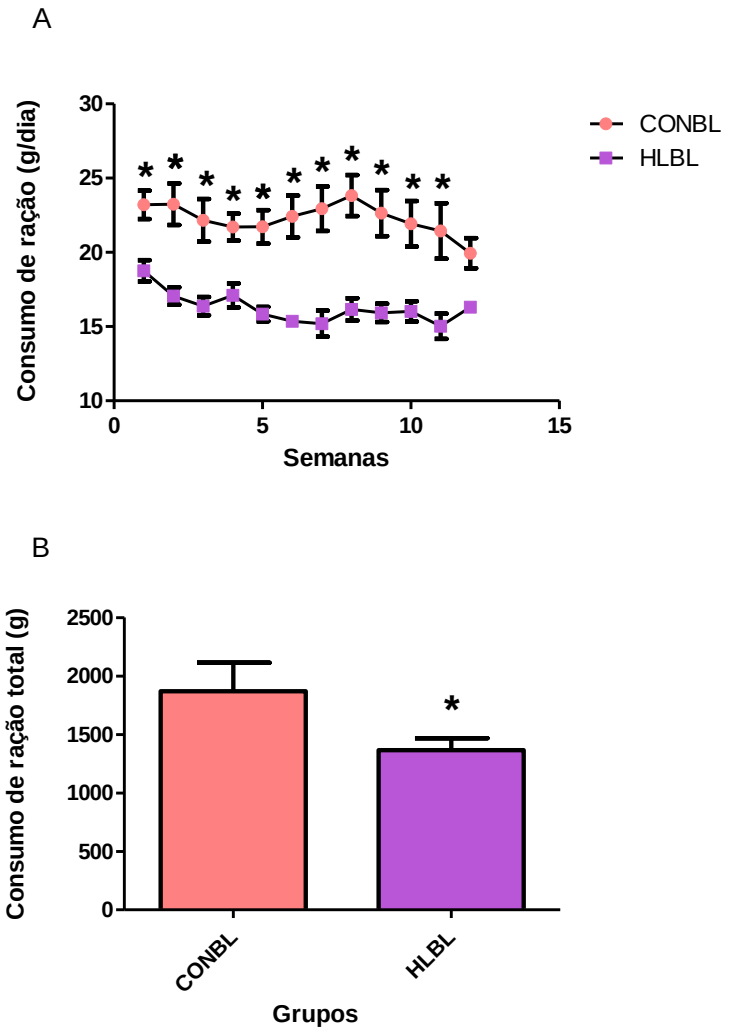

Figura 4. Consumo médio (A) e consumo total de ração (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

Com exceção da 12ª semana, a ingestão energética média semanal não diferiu significativamente entre os grupos CONBL e HLBL (**figura 5A**). Aliado a este fato, verificou-se que os grupos CONBL e HLBL não diferiram significativamente no que concerne à ingestão energética total de ração ao final do protocolo experimental (**figura 5B**).

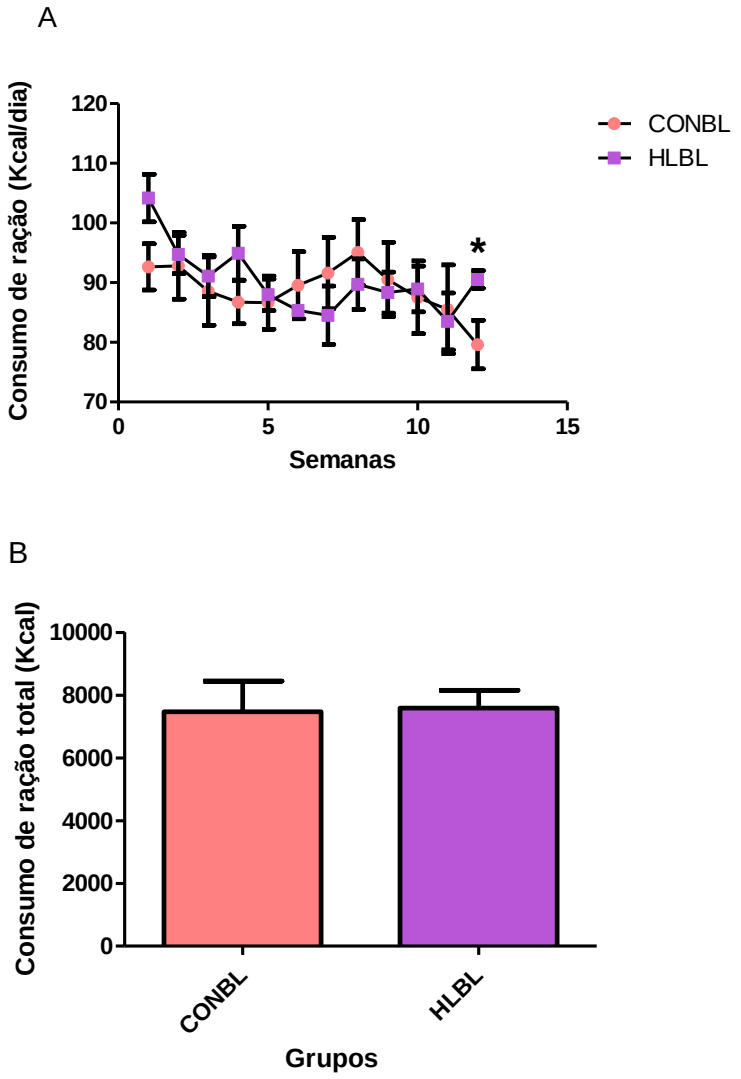

Figura 5. Consumo energético médio (A) e consumo energético total (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

Na **figura 6A**, pode-se observar que os animais que ingeriram a ração HL não apresentaram peso corporal significantemente maior quando comparados ao grupo controle durante todo o protocolo experimental. No que se refere ao ganho de peso total dos animais *baseline* (**figura 6B**), pode-se dizer que este não foi estatisticamente significante no grupo HLBL.

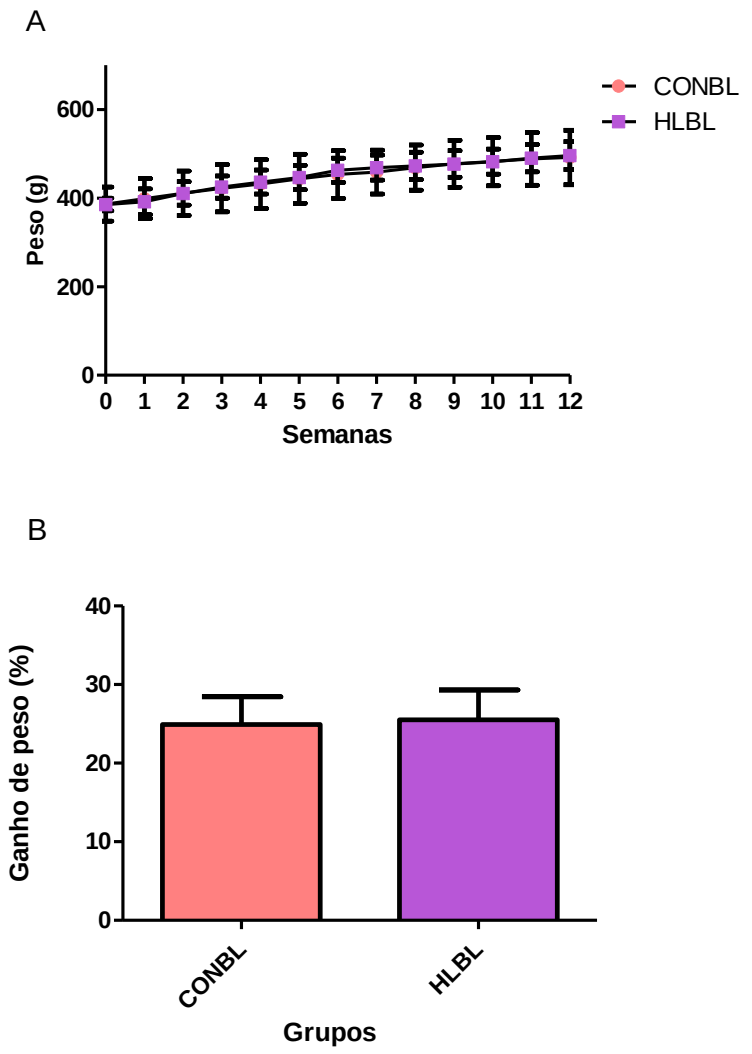

Figura 6. Curva de peso (A) e ganho de peso corporal (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos.

A partir das **figuras 7 e 8**, verifica-se que os grupos CONBL e HLBL, ao final das 12 semanas do protocolo experimental, não diferiram em relação

à composição química da carcaça. No entanto, o consumo da ração HL acarretou em aumento significante do coxim adiposo retroperitoneal (**figura 9A**), bem como a uma tendência de aumento do coxim epididimal (p = 0,09) (**figura 9B**). Aliado a este resultados, observou-se que a ração HL promoveu tendência de aumento da soma dos coxins (p = 0,06) (**figura 9C**).

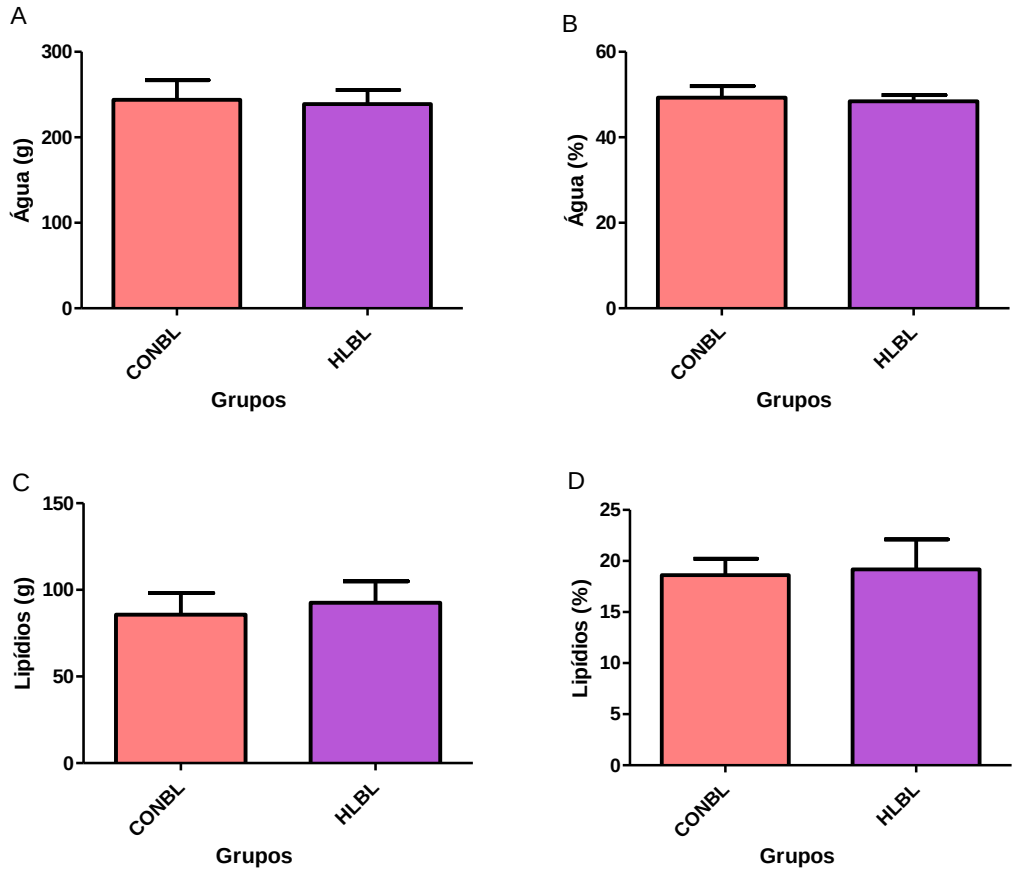

Figura 7. Conteúdo de água da carcaça (A), água relativa ao peso (B), conteúdo de lipídeos da carcaça total (C), lipídeos relativos ao peso (D) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL). Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). Não houve resultados estatisticamente significantes entre os grupos.

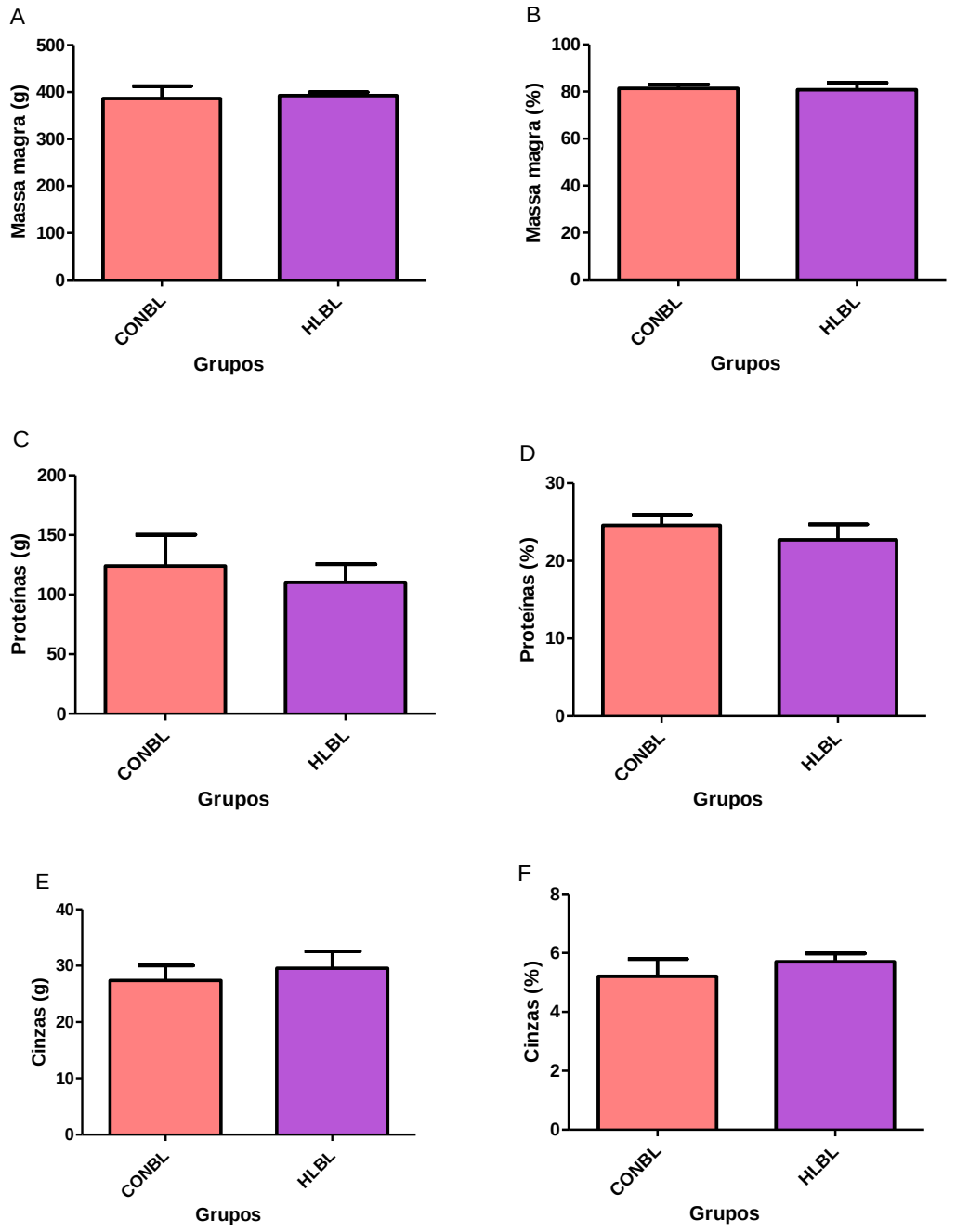

Figura 8. Massa magra da carcaça total (A), massa magra relativa ao peso (B), conteúdo de proteínas da carcaça total (C), proteínas relativas ao peso (D), conteúdo de cinzas (E) e cinzas relativa ao peso (F) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL). Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). Não houve resultados estatisticamente significantes entre os grupos.

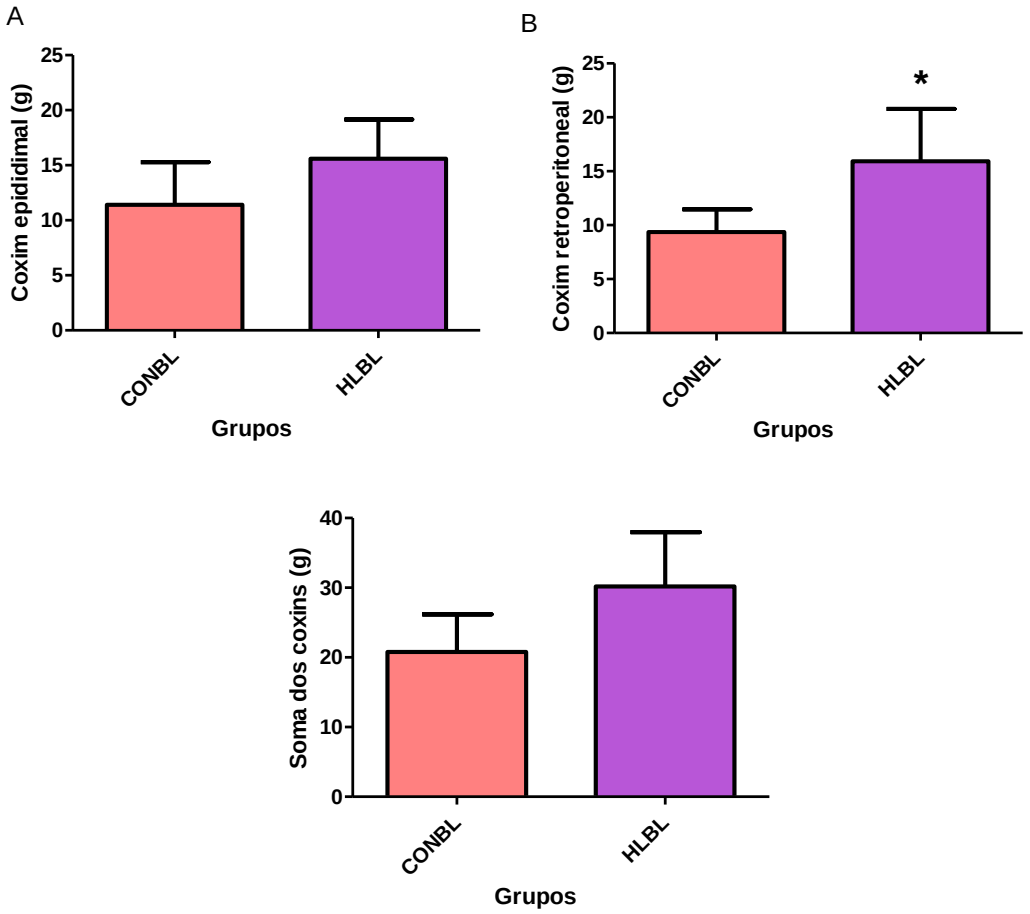

Figura 9. Peso dos coxins adiposos periepididimal (A), peso dos coxins adiposos retroperitoneal (B), soma dos pesos dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal (C) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL). Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

Na **figura 10B**, nota-se que o consumo da ração HL acarretou em aumento significante no peso do fígado, no entanto, a ingestão dessa ração não alterou estatisticamente o peso do coração (**figura 10A**).

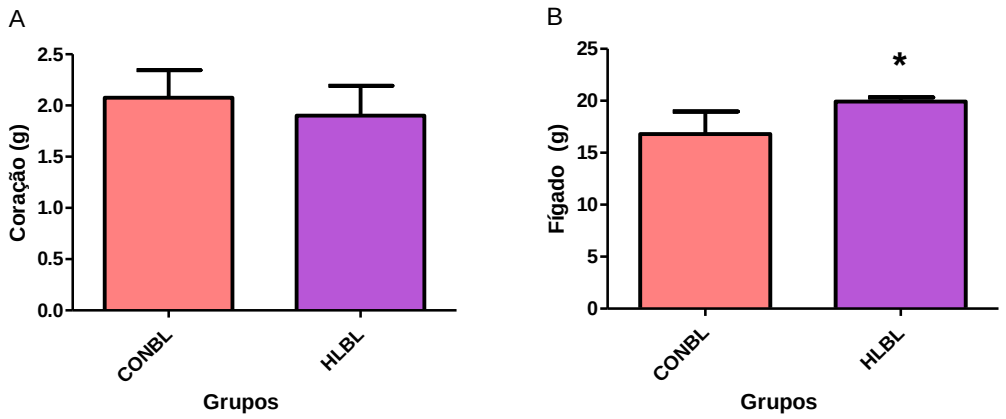

Figura 10. Peso do coração (A) e do fígado (B) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL). Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

Em relação aos testes para avaliação da intolerância à glicose nos animais, nota-se que o grupo HLBL apresentou valores da área sob a curva referentes à glicemia significantemente maiores do que o grupo CONBL (**figura 11A**). Em adendo, a glicemia dos animais do grupo HLBL foi estatisticamente superior em todos os pontos da curva glicêmica durante o teste (**figura 11B**). Um dado importante a ser destacado é que os animais do grupo HLBL iniciaram o oGTT com valores glicêmicos significantemente superiores àqueles do grupo CONBL (tempo 0).

Os dados do ipITT indicam resistência à ação da insulina nos animais que consumiram a ração HL (**figura 12A**), uma vez que a área sob a curva destes foi significantemente maior em relação ao grupo que consumiu a ração CON. Assim como no oGTT, os animais do grupo HLBL iniciaram o oGTT com valores glicêmicos significantemente superiores àqueles do grupo CONBL (tempo 0). Interessantemente, tais animais apresentaram um retardo à resposta da carga insulínica aplicada (tempo 5 min) e, ao final do teste, posteriormente à ação do hormônio, voltaram ao mesmo quadro de resistência à ação da insulina (**figura 12 B**).

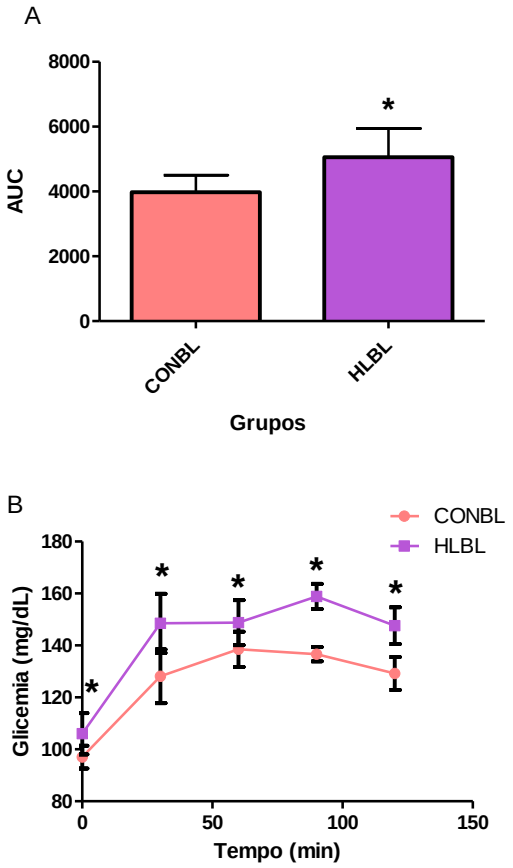

Figura 11. AUC (A) e curva de glicemia nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (B) referentes ao oGTT de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) e submetidos ao teste de tolerância oral a glicose. Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL. AUC: área sob a curva.

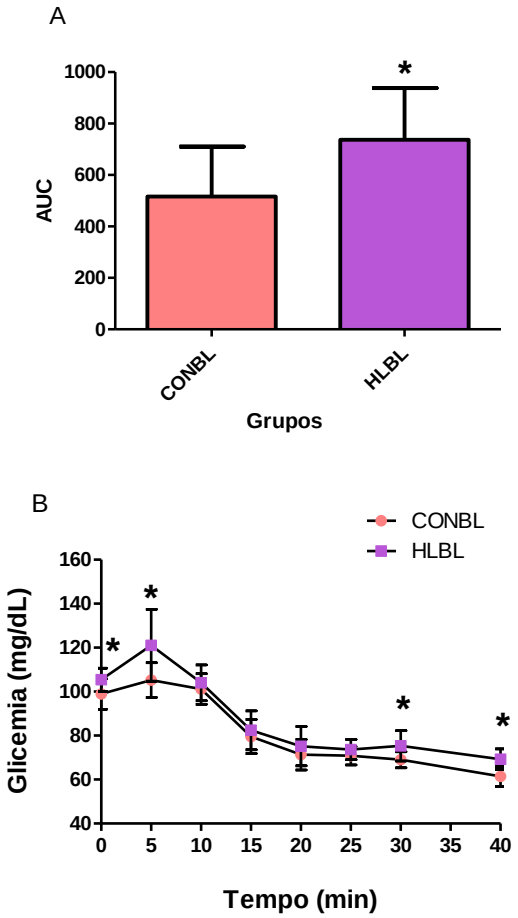

Figura 12. AUC (A) e curva glicêmica nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos (B) referentes ao ipITT de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) e submetidos ao intraperitoneal de tolerância à insulina. Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL. AUC: área sob a curva.

Corroborando os resultados acima descritos, a **figura 13A** mostra que os animais do grupo HLBL apresentaram glicemia de jejum significantemente maior em relação aos animais do grupo CONBL, entretanto, não foi observado aumento da concentração de insulina sérica (**figura 13B**) e no índice HOMA-IR (**figura 13C**).

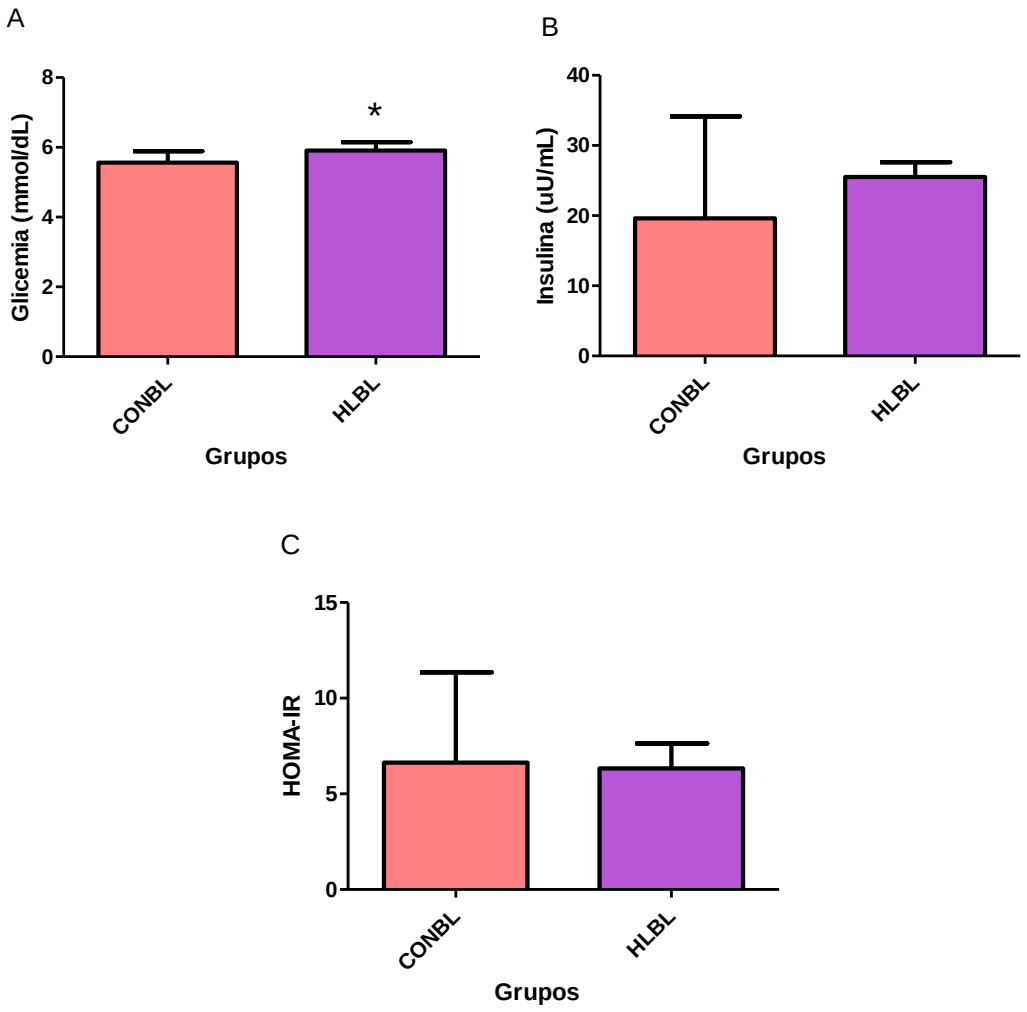

Figura 13. Dextro (A), insulina (B) e índice HOMA-IR (C) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL). Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

Em relação ao perfil lipídico, o consumo da ração HL acarretou em aumento estatisticamente significante da concentração sérica de colesterol total (**figura 14A**), bem como de LDL-colesterol (**figura 14B**) em relação à ingestão da ração CON. Os grupos CONBL e HLBL não diferiram significantemente em relação às concentrações de HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triacilglicerol (**figura 14C, D e E**).

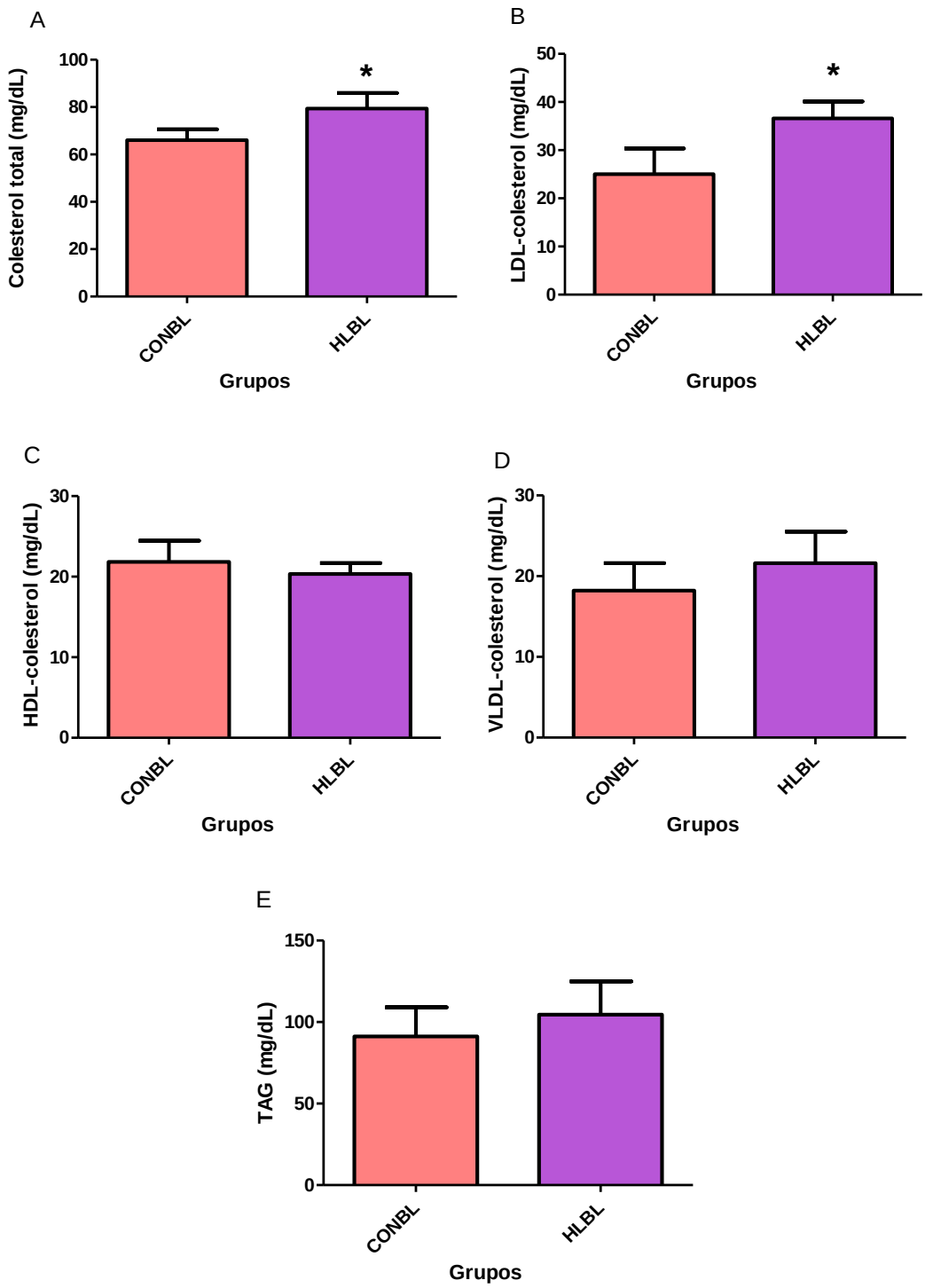

Figura 14. Perfil lipídico de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental. Concentrações séricas (mg/dL) de colesterol total (A), LDL-c (B), HDL-c (C), VLDL (D) e TAG (E).
Os valores são expressos com média ± desvio padrão (n = 5-6/ grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

A atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase não foi alterada após o consumo da ração HL, conforme pode ser verificado na **figura 15**.

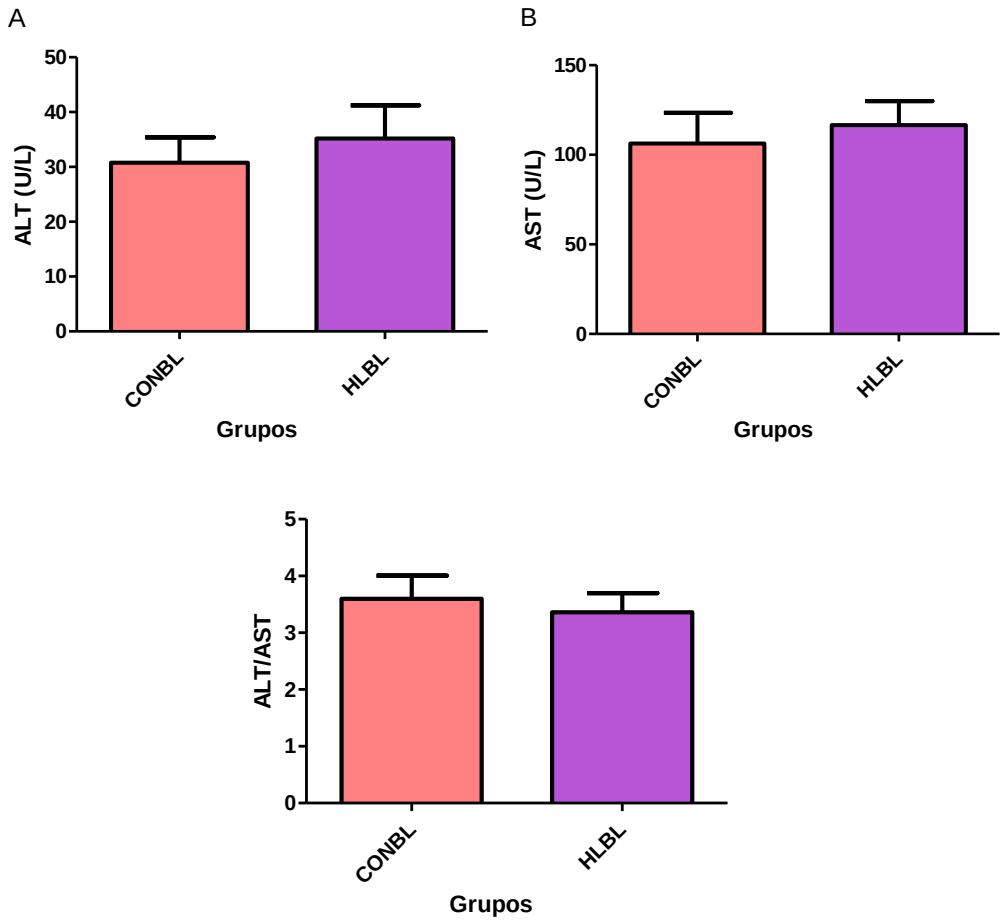

Figura 15. Atividade da enzima alanina aminotransferase (A), atividade da enzima aspartato aminatransferase (B) e razão ALT/AST (C) de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL. ALT: alanina aminotransferase. AST: aspartato aminotransferase.

As concentrações séricas de MCP-1, leptina, IL-6 e TNF-α (**tabela 3**) não variaram estatisticamente quando os animais foram submetidos ao consumo de ração HL em relação ao grupo que ingeriu a ração CON. Entretanto, os parâmetros inflamatórios PAI-1 e PCR (**figura 16A e C**) apresentaram-se significantemente aumentados no grupo HLBL em

comparação ao grupo CONBL. Confirmando o quadro inflamatório dos animais que ingeriram a ração HL, os níveis de adiponectina mostraram tendência à redução em comparação aos animais que consumiram a ração CON (p = 0,09) (**figura 16B**).

Tabela 3 – Parâmetros séricos referentes à resposta inflamatória na 12ª semana do protocolo experimental.

Parâmetros	CONBL	HLBL
	pg/mL	
MCP-1	213,10 ± 10,33	210,80 ± 38,45
Leptina	3060,00 ± 1307,00	3083,198 ± 364,00
IL-6	15,77 ± 2,75	11,93 ± 6,33
TNF-α	3,94 ± 0,82	3,62 ± 1,33

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 5-6/grupo.
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
CONBL= grupo alimentado com ração CON até a 12ª semana do protocolo experimental.
HLBL= grupo alimentado com ração HL até 12ª semana do protocolo experimental.

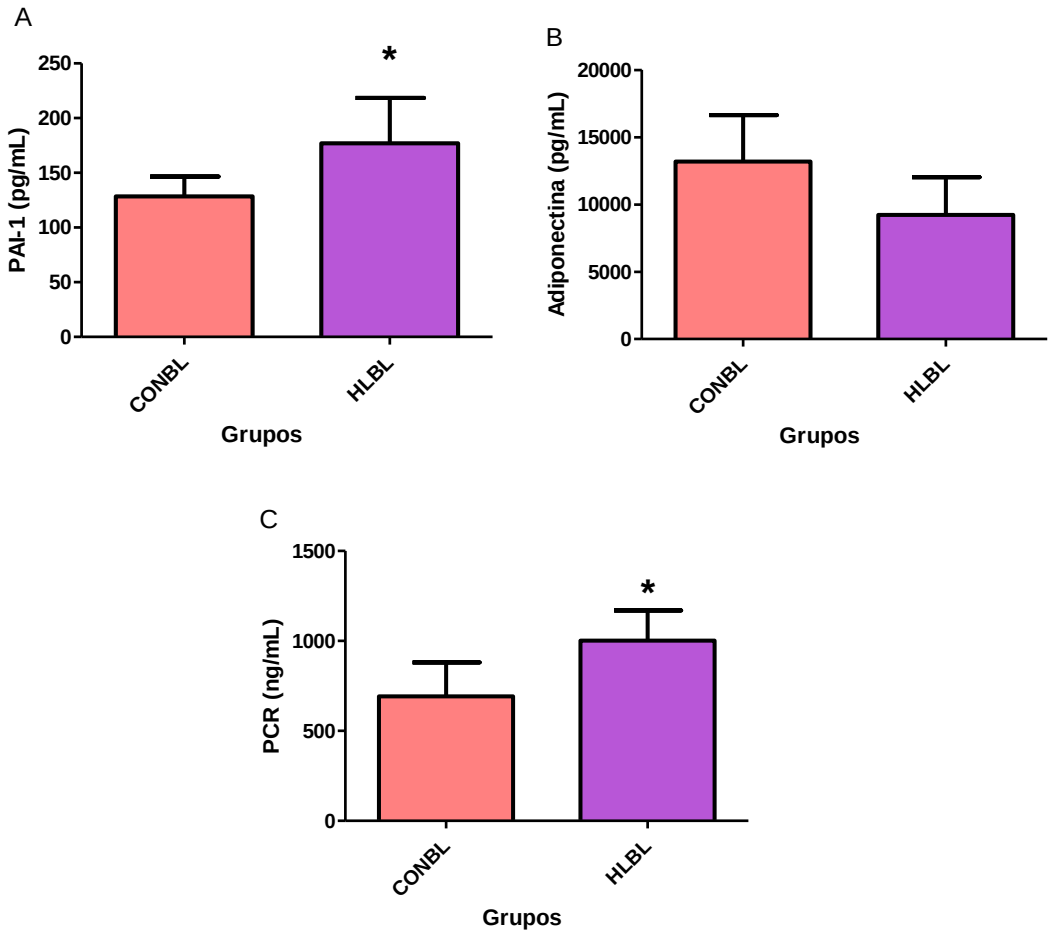

Figura 16. PAI-1 (A), adiponectina (B) e PCR (C) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL). Os animais foram eutanasiados na 12ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

Todos os fragmentos de fígado de ratos do grupo CONBL foram representativos e mostraram lobulação hepática preservada, com hepatócitos em disposição radial, em placas duplas de entremeio aos sinusóides e veia hepática terminal. O citoplasma dos hepatócitos apresentou-se com aspecto homogêneo e acidofílico, núcleos em posição central, com cromatina frouxa e nucléolo evidente. Os espaços-porta apresentaram-se preservados (**figuras 17, 18 e 19**).

Ao se comparar os referidos achados com os fragmentos de fígado do grupo HLBL, alterações foram observadas e se caracterizaram apenas pela presença de degeneração vacuolar microgoticular discreta em dois dos

animais do grupo, ou seja, apenas um terço dos fígados (**figuras 20, 21 e 22**).

No método histoquímico Sudan Black houve positividade para lipídios — gordura neutra, atualmente TAG — nos animais do grupo HLBL que apresentaram a degeneração vacuolar microgoticular, confirmando, portanto, o quadro de EHNA.

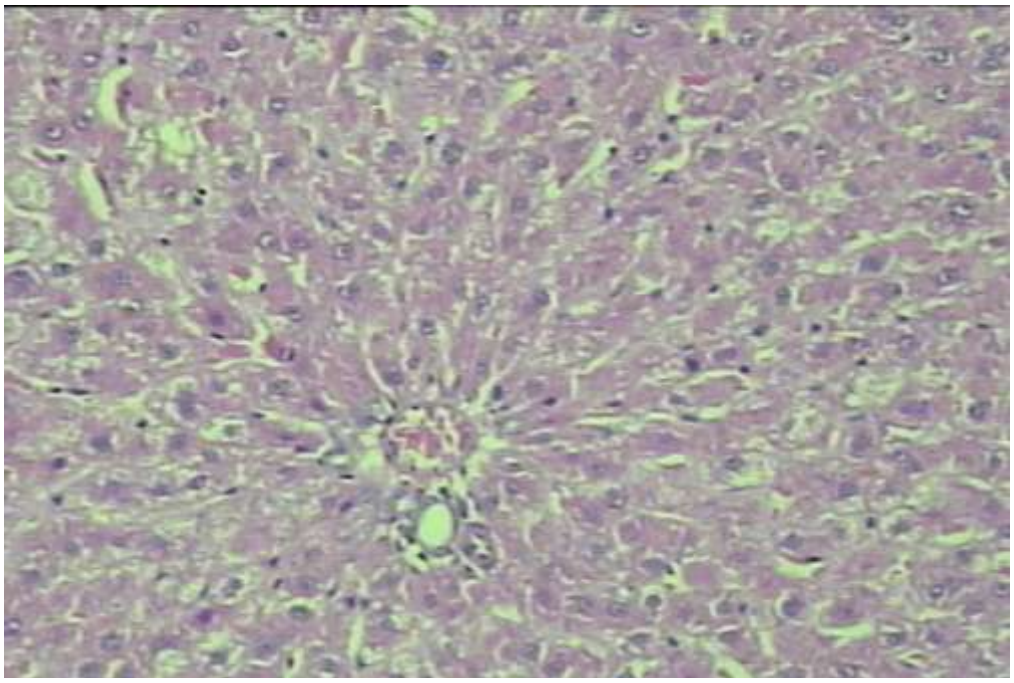

Figura 17. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal pertencente ao grupo CONBL, mostrando espaço-porta com hepatócitos dispostos radialmente e arquitetura lobular preservada. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 10 vezes.

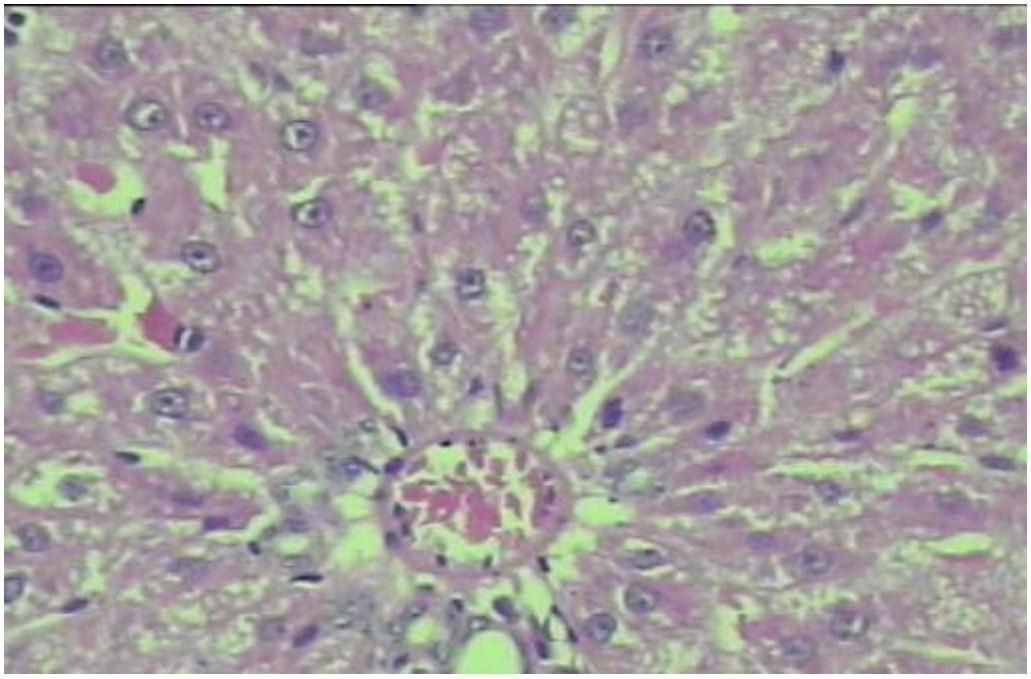

Figura 18. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de animal pertencente ao grupo experimental designado CONBL, mostrando componente do espaço-porta, com alguns hepatócitos da região periportal exibindo citoplasma com degeneração vacuolar microgoticular. Coloracão: Hematoxilina-eosina. Aumento: 20 vezes.

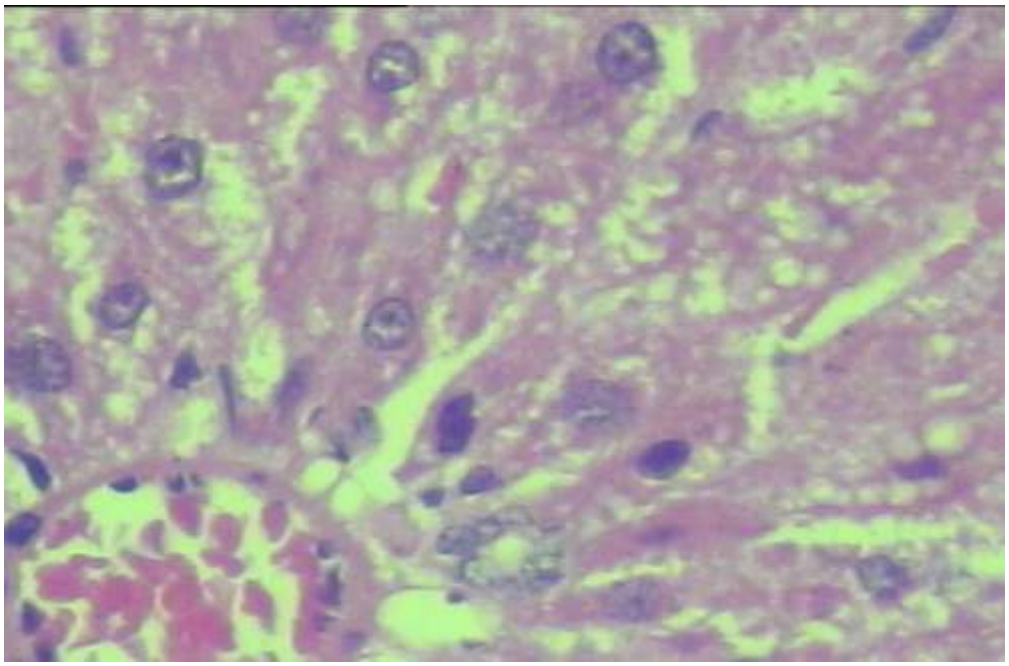

Figura 19. Fotomicrografia de corte histológico de animal pertencente ao grupo CONBL, mostrando apenas alguns hepatócitos vizinhos ao espaço-porta, com degeneração vacuolar microgoticular discreta. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 40 vezes.

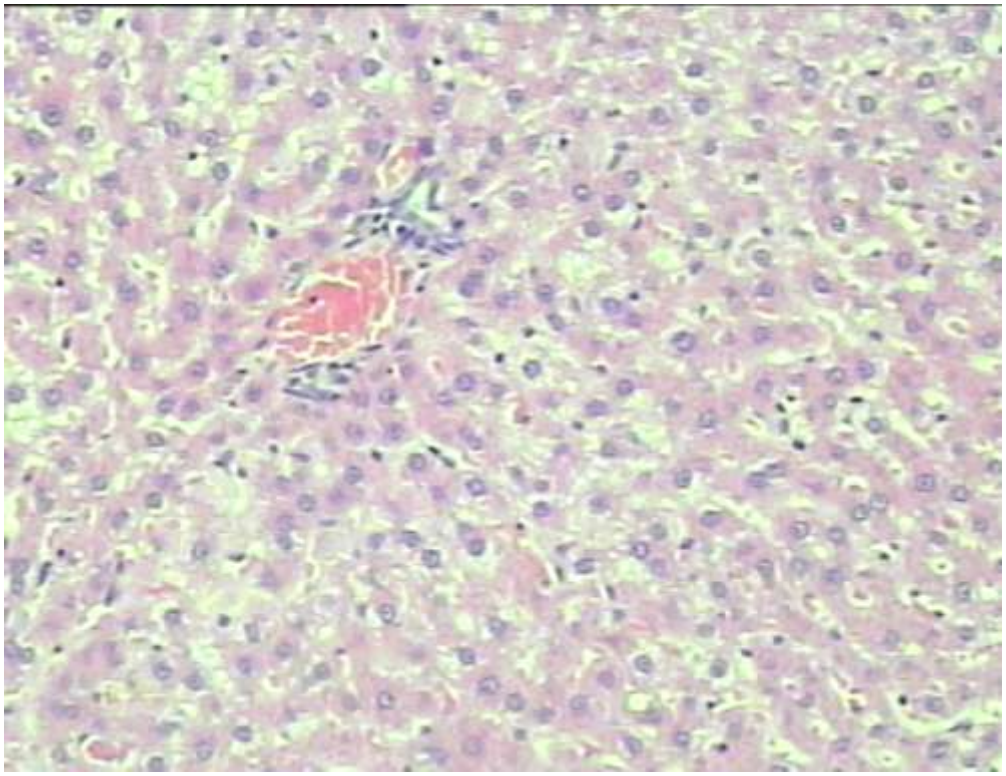

Figura 20. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato pertencente ao grupo HLBL, mostrando região periportal e mediozonal do lóbulo hepático com hepatócitos com degeneração microgoticular discreta a moderada e sinunusóides preservados. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 10 vezes.

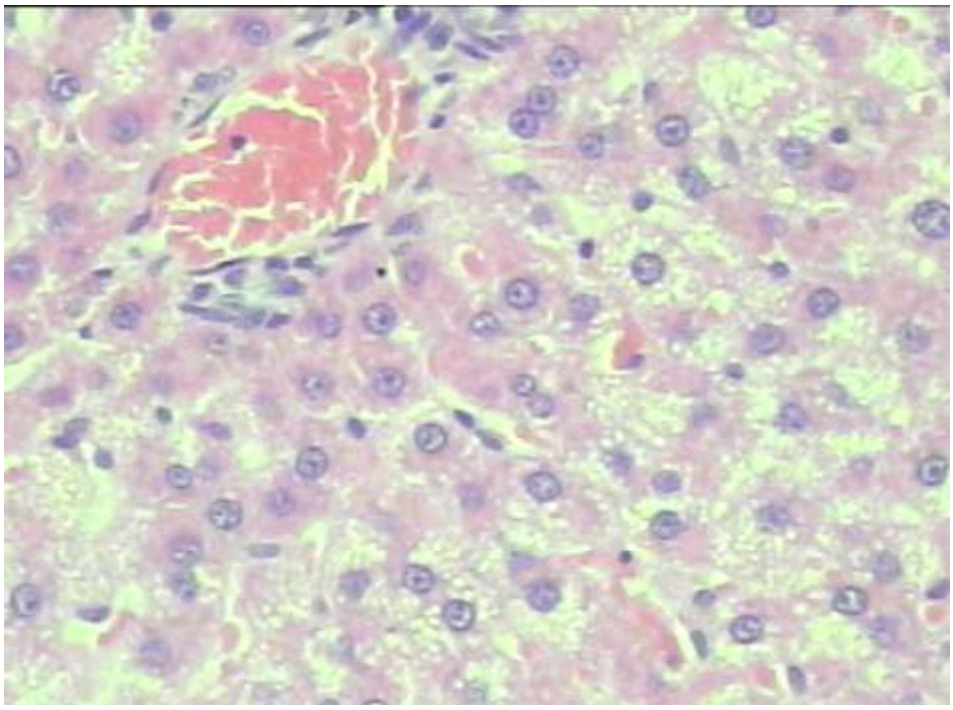

Figura 21. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato pertencente ao grupo experimental designado HLBL, mostrando citoplasma de hepatócitos com degeneração vacuolar microgoticular. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 20 vezes.

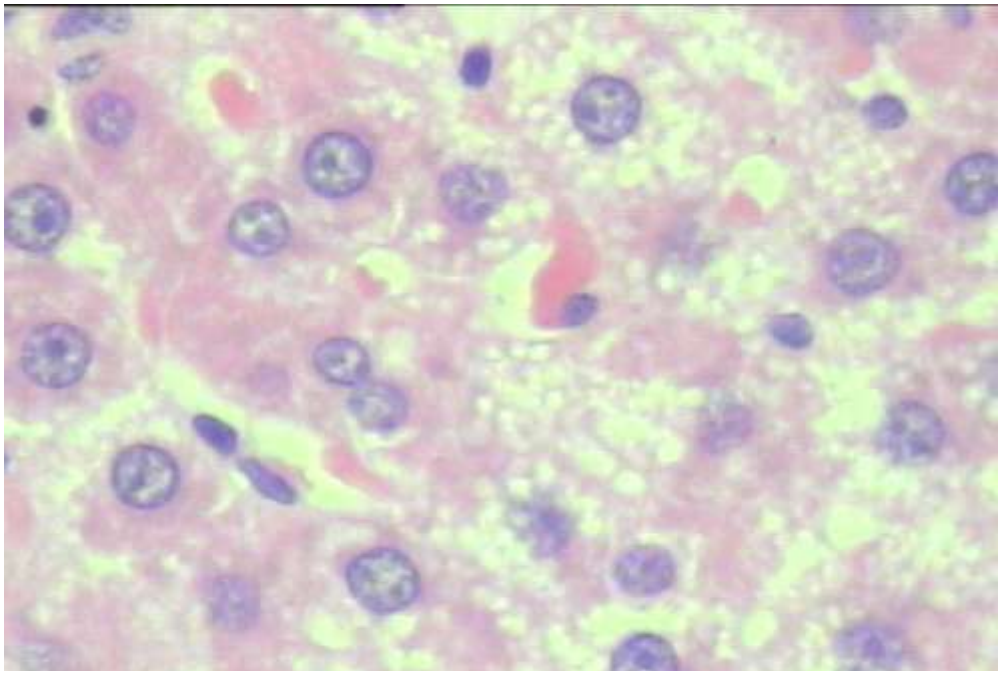

Figura 22. Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando quadro de degeneração vacuolar microgoticular no citoplasma de hepatócitos. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 40 vezes.

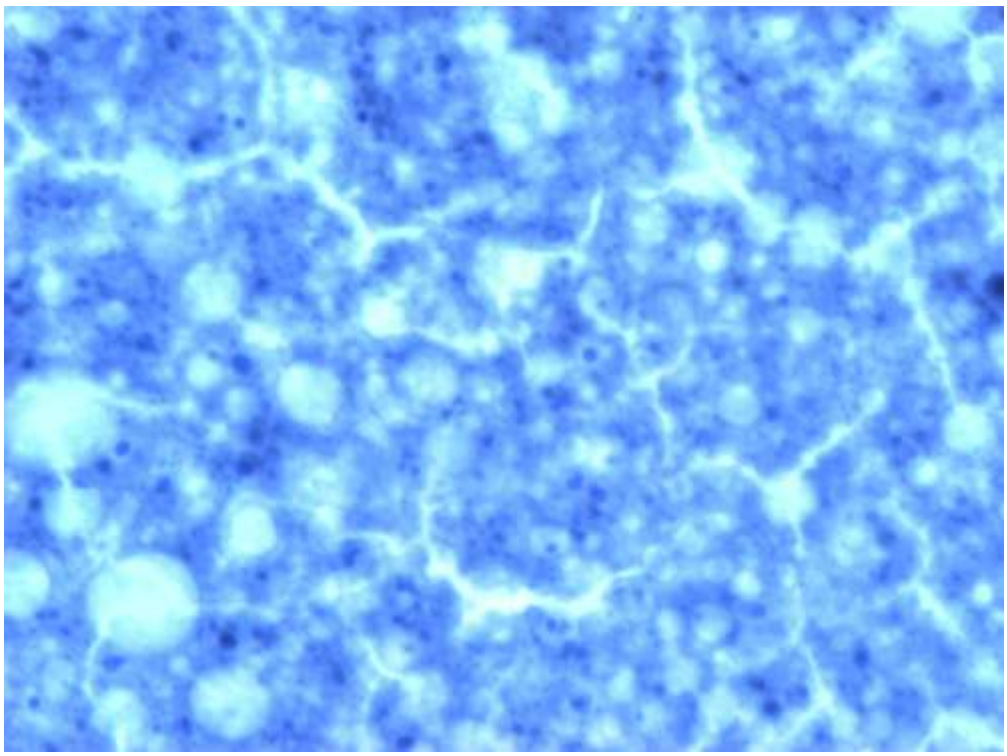

Figura 23. Fotomicrografia de corte histológico de congelação de fígado de rato pertencente ao grupo HLBL, corado pelo Sudan Black, exibindo positividade para a natureza do conteúdo vacuolar. Coloração: *Sudan Black*. Aumento: 40 vezes.

No que concerne à expressão das proteínas inflamatórias IKK-β e JNK, tanto nas suas formas totais, quanto fosforiladas, não se observou resultados estatisticamente significantes entre os grupos CONBL e HLBL (**figura 24 e 25**).

A **figura 26** mostra que a dieta HL não exerceu efeito significante em relação à fosforilação do NF-κB .

Verificou-se aumento significante da expressão do IRS-1 total no grupo HLBL em relação ao do grupo CONBL quando estimulados com insulina (**figura 27A**). Entretanto, não há diferença estatística de expressão dessa proteína na sua forma fosforilada no resíduo de serina 307 (**figura 27B**), nem quando calculada a razão desta pela total (**figura 27C**).

Na **figura 28B**, nota-se diminuição significante da expressão da AKT fosforilada no fígado dos animais que consumiram a ração HL e foram submetidos ao estímulo de insulina quando comparados aos seus respectivos controles.

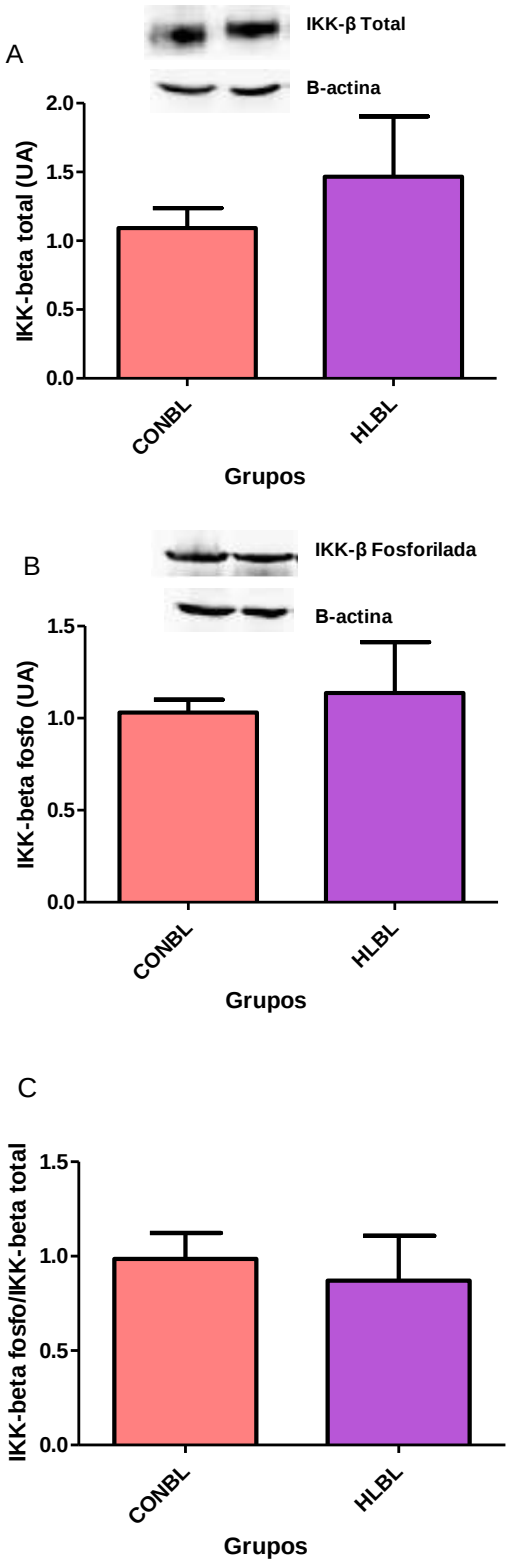

Figura 24. Expressão da IKK-β total (A), IKK- β fosforilada (Ser 180) (B) e razão da IKK-β fosforilada pela IKK-β total (C) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média (n = 5-6/grupo). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. *UA = Unidades arbitrárias.

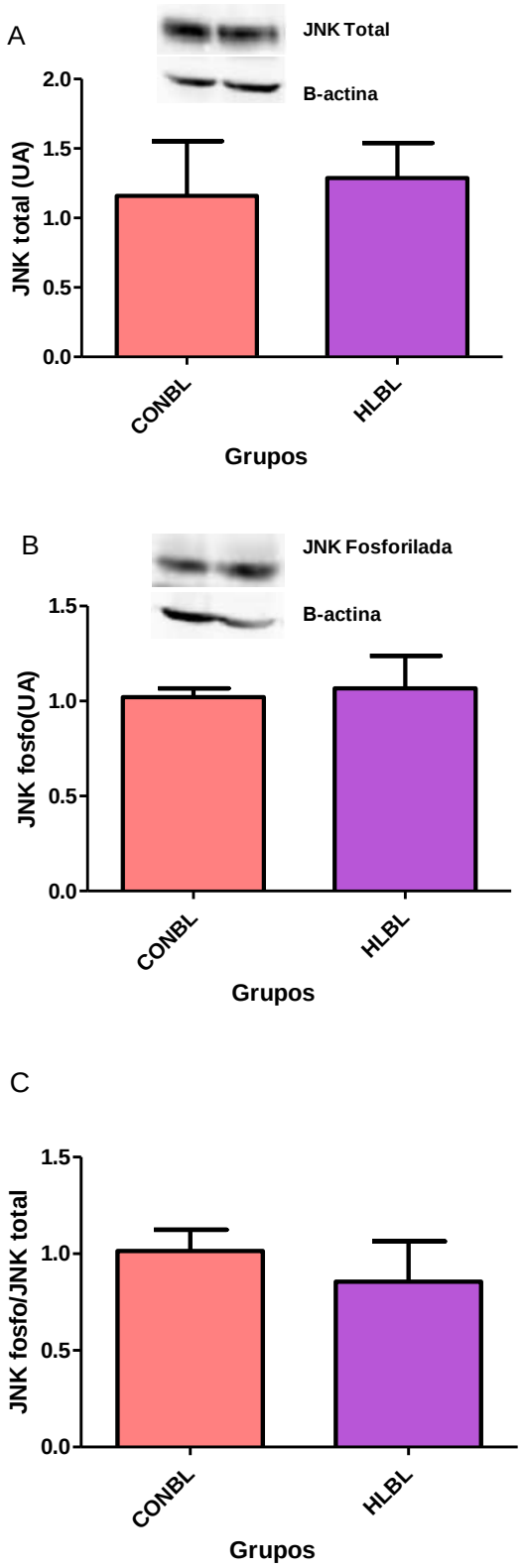

Figura 25. Expressão da JNK total (A), JNK fosforilada (Tyr 185) (B) e razão da JNK fosforilada pela JNK total (C) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média (n = 5-6/grupo). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. *UA = Unidades arbitrárias.

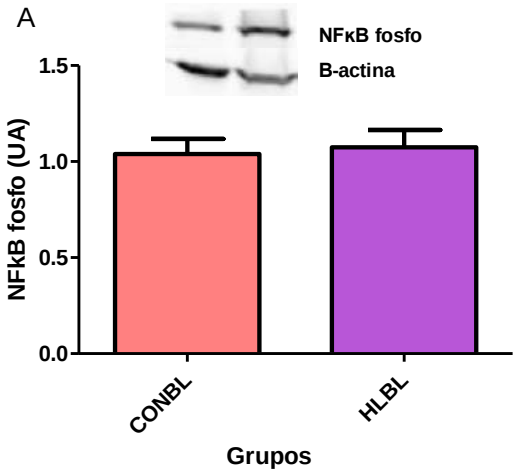

Figura 26. Expressão do NF-κB fosforilado (A) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média (n = 5-6/grupo). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. *UA = Unidades arbitrárias.

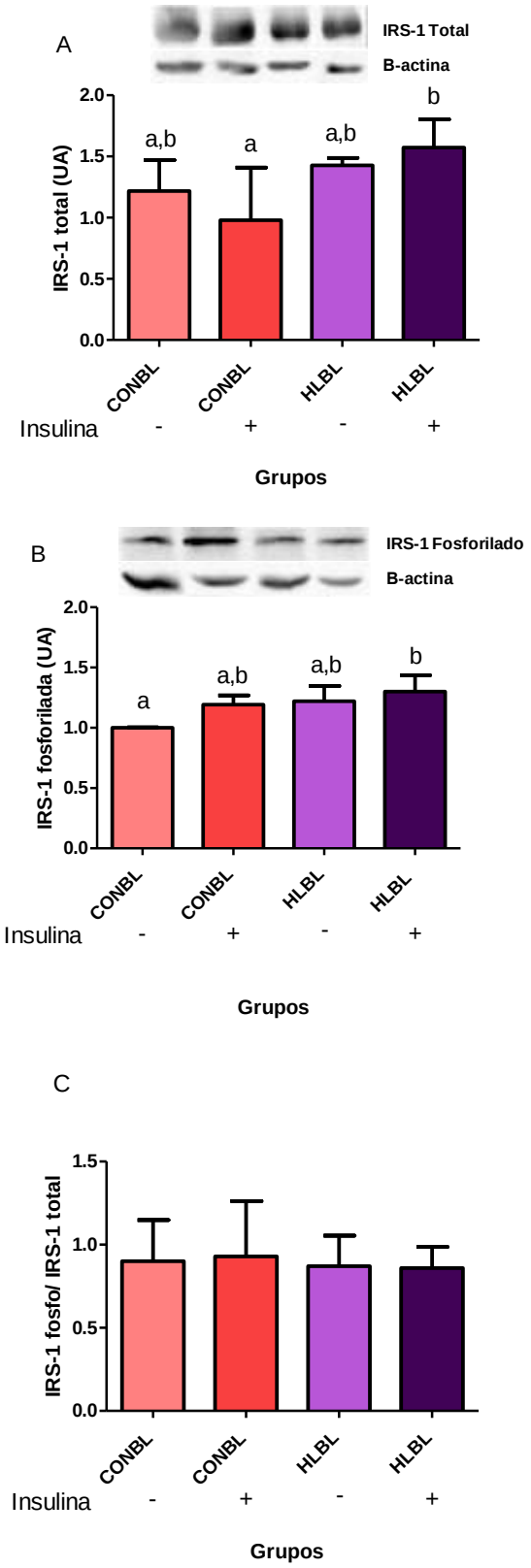

Figura 27. Expressão da IRS-1 total (A), IRS-1 fosforilada (Ser 307) (B) e razão da IRS-1 fosforilada pela IRS-1 total (C) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$). *UA = Unidades arbitrárias. *** Estímulo com 10 U de insulina via veia porta.

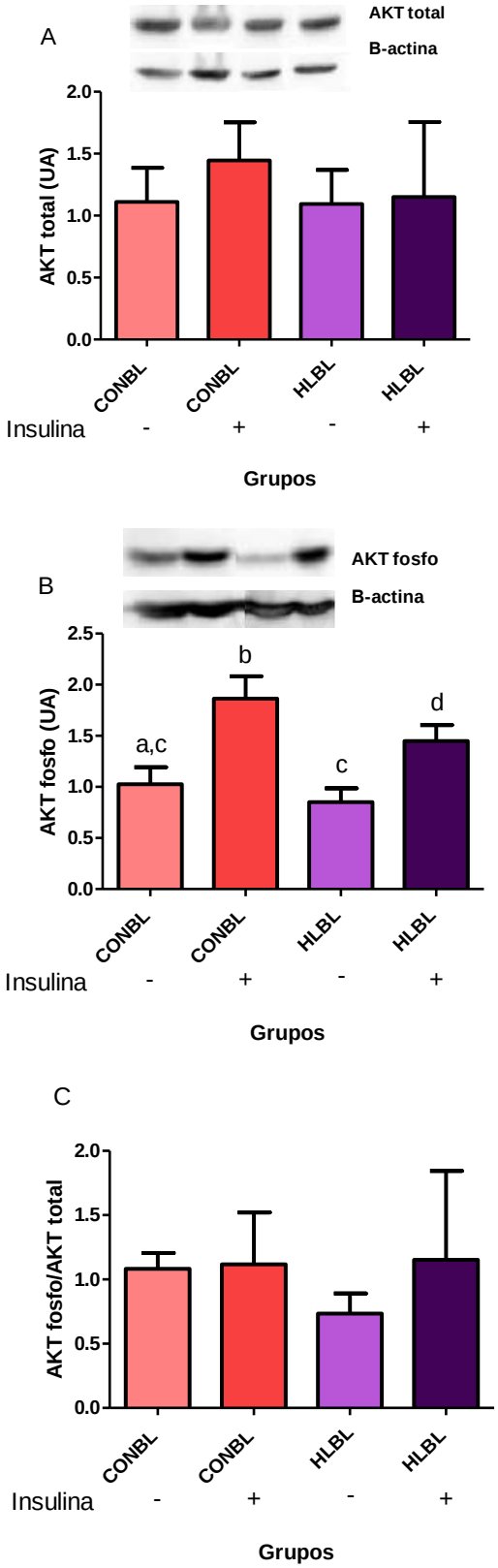

Figura 28. Expressão da AKT total (A), AKT fosforilada (Ser 473) (B) e razão da AKT fosforilada pela AKT total (C) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$). *UA = Unidades arbitrárias. *** Estímulo com 10 U de insulina via veia porta.

6.3 RESULTADOS REFERENTES À 16ª SEMANA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL – EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DA ERVA-MATE

6.3.1 Caracterização dos Compostos Bioativos do Extrato Aquoso da Erva-mate

Com base nos espectros de absorção UV e espectro de massas, foram identificados onze 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 caféico, ferúlico e *p*-cumárico nas formas livres. A identificação dos compostos está descrita no cromatograma (**figura 29**) e tabela abaixo (**tabela 4**).

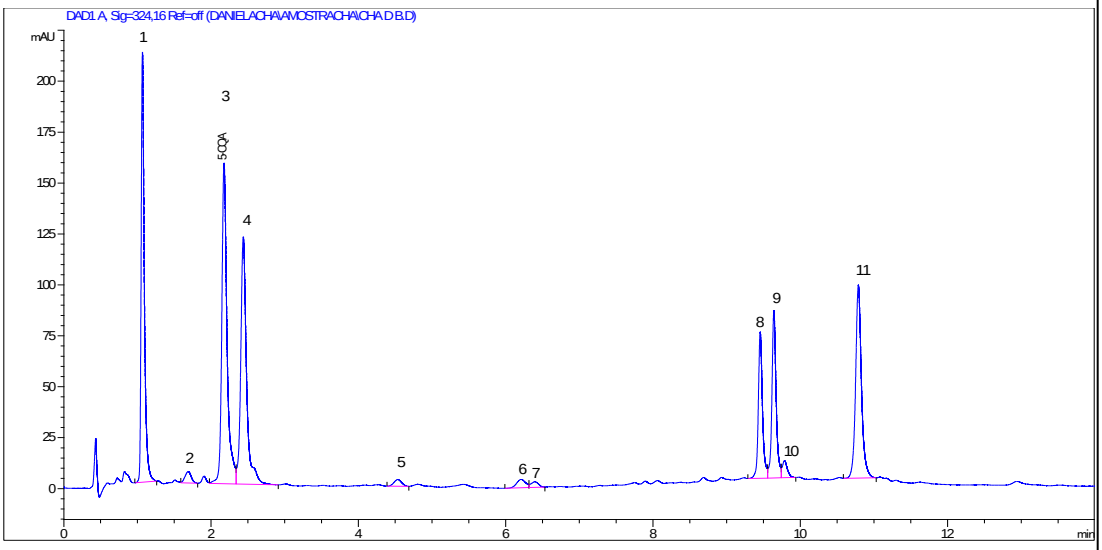

Figura 29. Cromatograma CLUE-DAD (λ = 324 nm) com compostos fenólicos presentes no chá mate.

Tabela 4 – Identificação dos compostos fenólicos do chá mate por CLUE-ESI/MS no modo de ionização negativo.

Pico	Íon molecular (*m/z*)	Íon(s) produto (*m/z*)	Composto
1	353	191, 179	Ácido cafeoilquínico
2	353	191, 179	Ácido cafeoilquínico
3	353	191	Ácido 5-cafeoilquinico
4	353	179	Ácido cafeoilquínico
5	335	160	Ácido cafeoilshiquimico
6	367	173	Ácido feruloilquinico
7	335	161	Ácido cafeoilshiquimico
8	515	353	Ácido di-cafeoilquinico
9	515	353	Ácido di-cafeoilquinico
10	609	301	Rutina
11	515	353	Ácido di-cafeoilquinico

O cromatograma com a identificação da cafeína é apresentado na **figura 30**. A confirmação da identidade do composto no detector de massas foi realizada utilizando os íons com *m/z* 195 (molecular) e 138 (produto), no modo de ionização positivo.

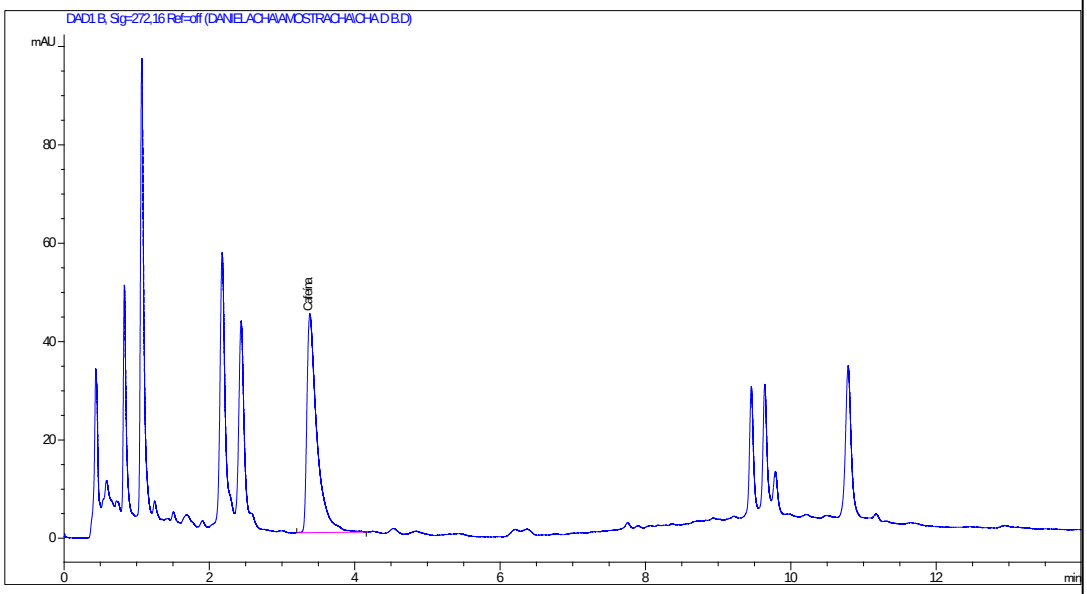

Figura 30. Cromatograma CLUE-DAD (λ = 272 nm) com identificação da cafeína presente no chá mate.

Tabela 5 – Parâmetros de validação do método analítico (CLUE-DAD) para caracterização do chá mate solúvel: precisão intra e inter-dia para tempo de retenção (TR) e área dos picos (resultados expressos como coeficiente de variação – CV%), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

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

* Resultados expressos como coeficiente de variação – CV%

Na **tabela 6** é possível visualizar as quantidades de 5-CQA, cafeína e compostos fenólicos totais presentes no extrato solúvel da erva-mate.

Tabela 6 – Quantificação dos compostos presentes no extrato solúvel da erva-mate

	5-CQA	Cafeína	Outros fenólicos	Fenólicos totais
Média (mg/g)	27,26	14,53	75,98	103,24
DP (mg/g)	0,07	0,05	0,20	0,26
CV (%)	0,25	0,33	0,26	0,26

5 - CQA: ácido 5-cafeoilquínico; DP: desvio - padrão; CV: coeficiente de variação

6.3.2 Avaliação do Efeito do Extrato Aquoso da Erva-mate

A mesma diferença observada na 12ª semana do protocolo experimental pode ser verificada entre a 13ª e 16ª semana no que se refere

ao consumo de ração em gramas, sendo que o grupo HL consumiu menor quantidade da mesma em relação ao grupo CON. Do mesmo modo, o grupo que consumiu a ração HL e recebeu o EAEM também ingeriu significantemente menor quantidade de ração em gramas quando comparado ao grupo que ingeriu a ração CON e recebeu o EAEM. No entanto, a administração do EAEM não acarretou em diminuição do consumo da ração em ambos os grupos (**figura 31A**).

Em contrapartida, quando se observa o consumo de ração em quilocalorias, nota-se que não houve diferença estatística entre os grupos em questão, evidenciando mais uma vez o consumo isocalórico do grupo HL em relação ao grupo CON, mesmo com a intervenção do EAEM (**figura 32A e B**).

Não se observou diferença estatística em relação ao peso corporal (**figura 33A**) dos quatro grupos experimentais no período correspondente entre a 12ª e a 16ª semana do protocolo experimental. No entanto, a **figura 33B** indica que a administração do EAEM ao grupo que consumiu a ração HL reverteu o quadro de ganho de peso em comparação ao grupo que apenas ingeriu a ração HL.

No que concerne à composição química da carcaça, não foram verificados resultados significantes em relação à quantidade e percentual de umidade corpórea dos animais (**figura 34A e B**). No entanto, constatou-se que a ingestão da ração HL no grupo que recebeu a intervenção com o EAEM acarretou em aumento significante do percentual lipídico corporal em relação ao seu respectivo grupo controle. . Ainda, verificou-se que a administração do EAEM diminuiu estatisticamente o percentual lipídico corporal no grupo que ingeriu a ração CON em relação ao grupo CON (**figura 34C e D**).

Apesar de não haver diferença estatística na quantidade e no percentual de proteína da carcaça dos animais com e sem intervenção com o EAEM (**figura 35C e D**), uma alteração no percentual de massa magra foi observada. Primeiramente, nota-se que a ração HL induziu diminuição do percentual de massa magra nos animais do grupo HLEM em relação

àqueles do grupo CONEM. Todavia, a administração do EAEM induziu aumento desse compartimento corpóreo no grupo com ração CON quando comparado com o grupo que consumia a mesma ração sem a intervenção (**figura 35B**).

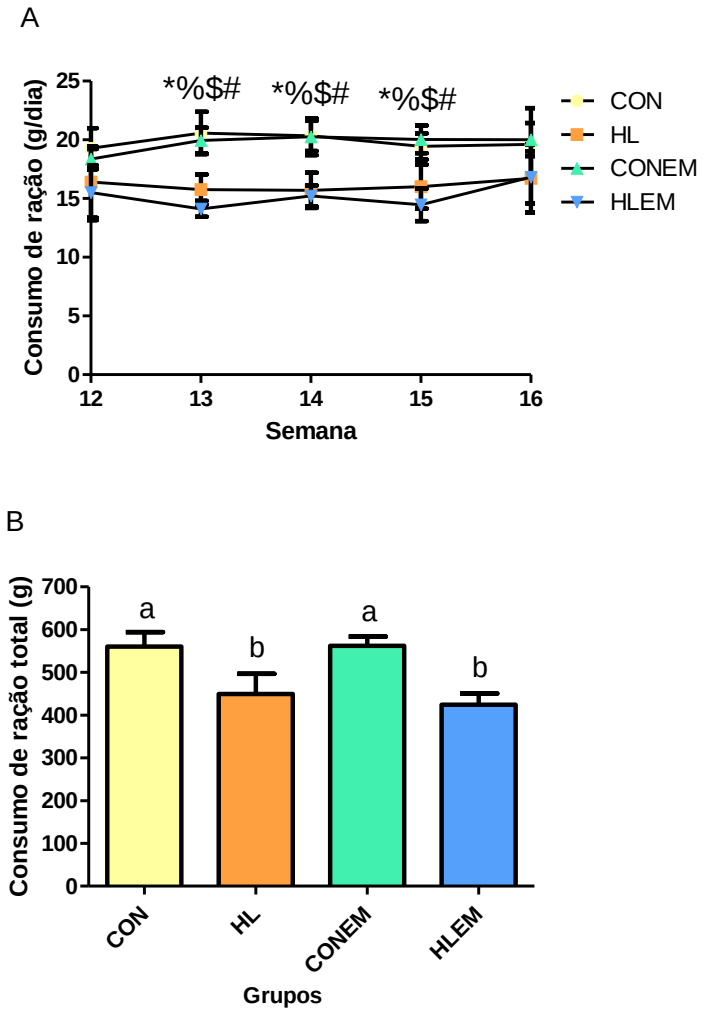

Figura 31. Consumo médio (A) e total de ração em gramas (B) de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). Símbolos distintos diferem significativamente ($p < 0,05$), onde: * CON X HLEM, # CONEM X HLEM, $ CON X HL e % HL X CONEM. Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

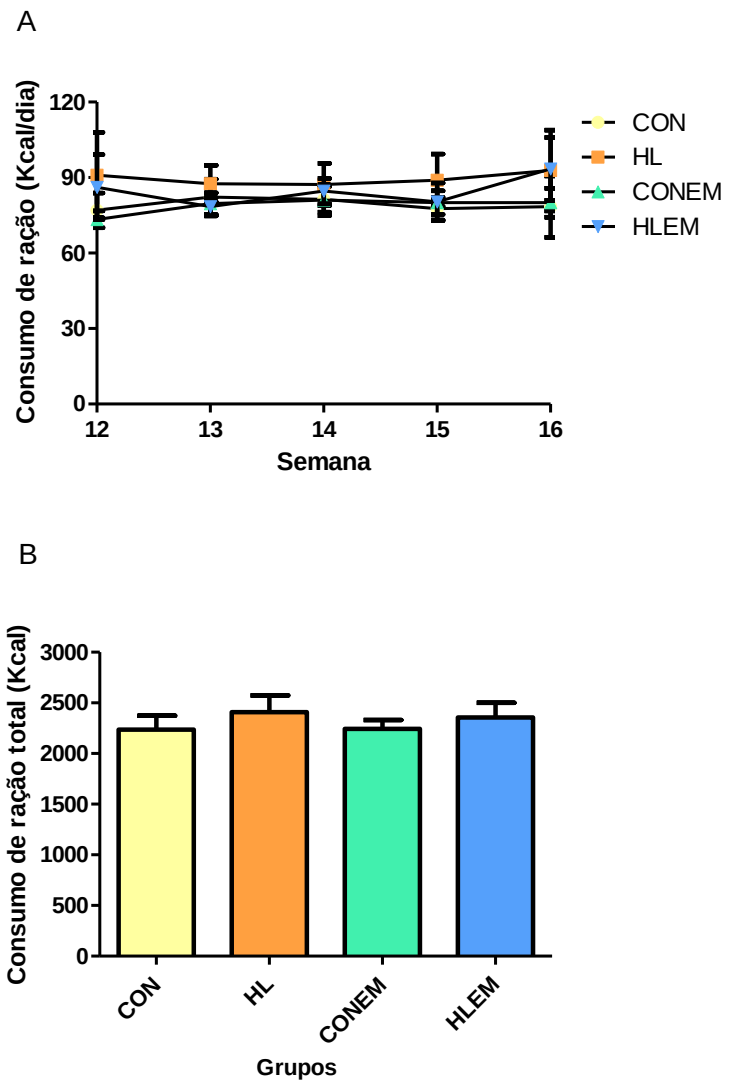

Figura 32. Consumo energético médio (A) e consumo energético total (B) de ração de ratos *Wistar* entre a 13ª. e a 16a. semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

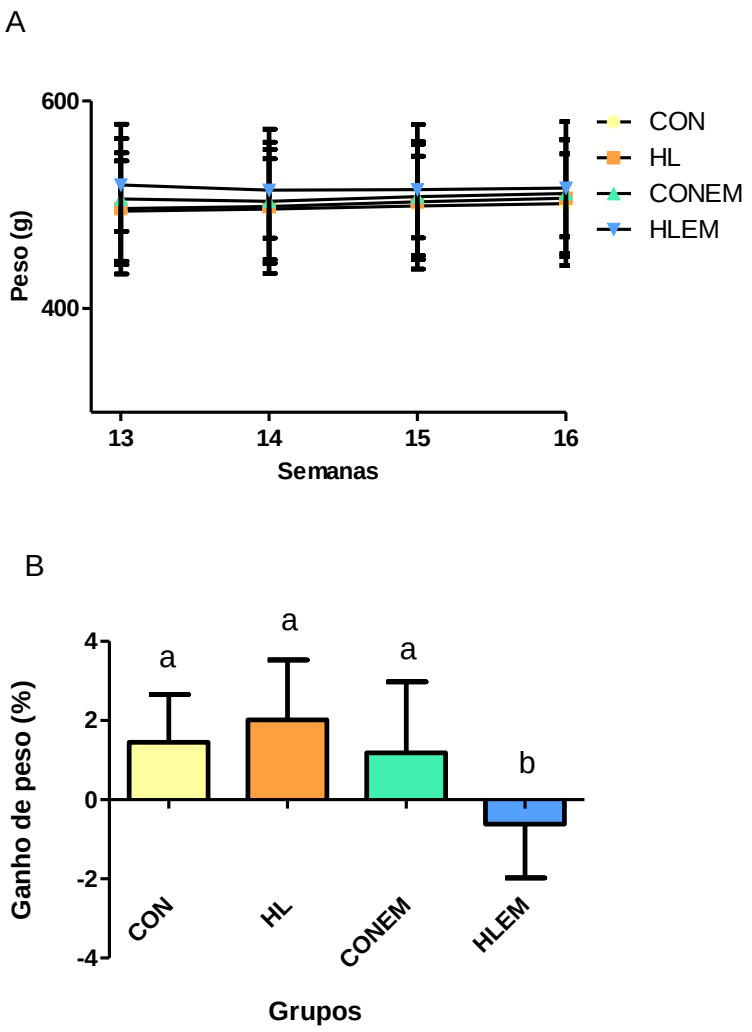

Figura 33. Curva de peso (A) e percentual de ganho de peso (B) de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

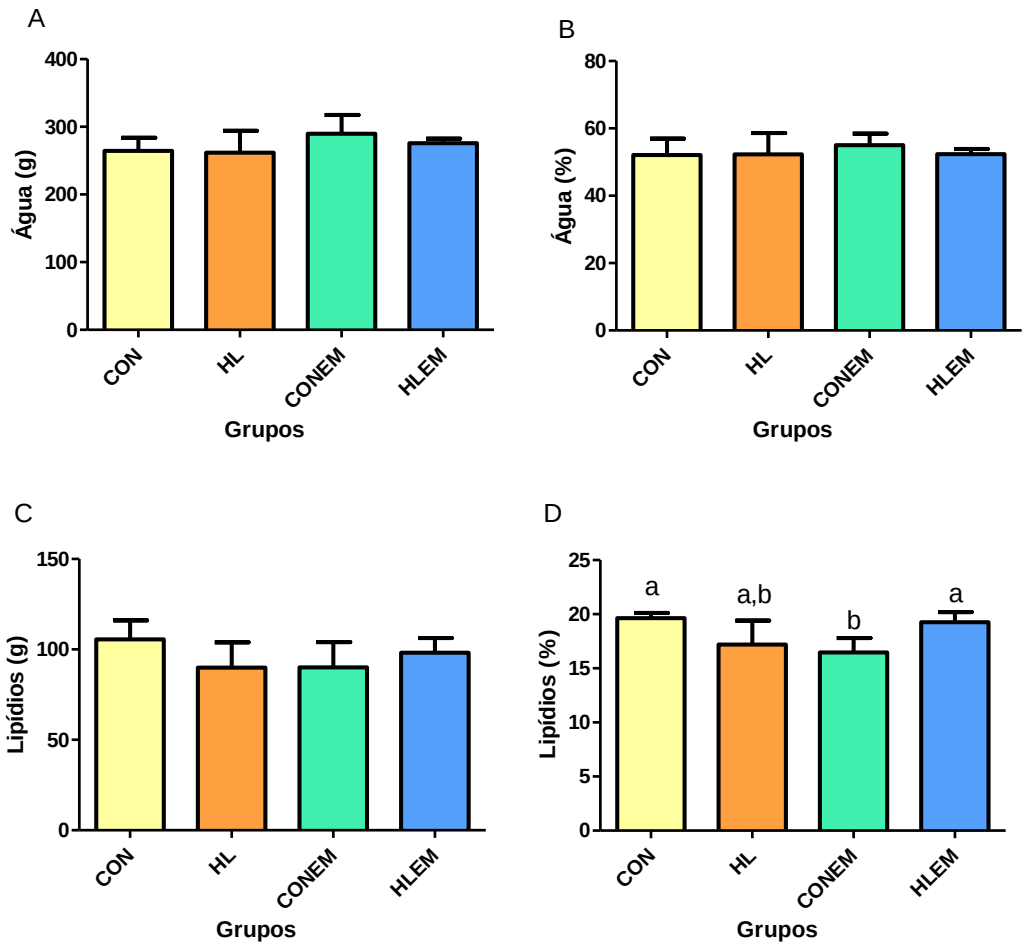

Figura 34. Conteúdo de água da carcaça total (A), água relativa ao peso (B), conteúdo de lipídeos da carcaça total (C) e lipídeos relativos ao peso (D) de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

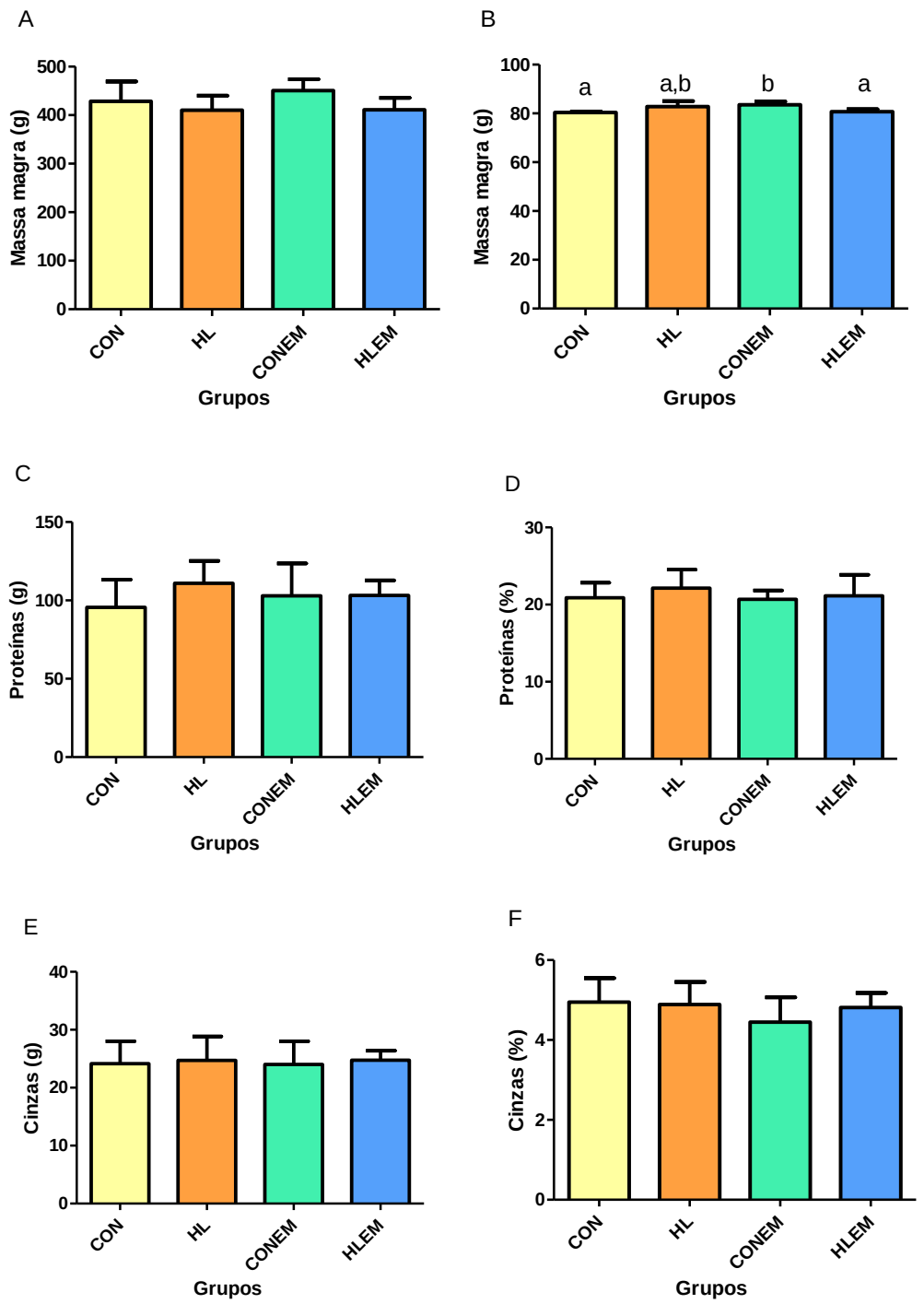

Figura 35. Massa magra (A), massa magra relativa ao peso (B), conteúdo de proteínas da carcaça total (C), proteínas relativos ao peso (D), conteúdo de cinzas (E) e cinzas relativas ao peso (F) de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Os grupos estudados não diferiram significantemente em relação ao peso dos coxins periepididimal e retroperitoneal ao final do protocolo experimental de 16 semanas. Contudo, observou-se que o coxim periepididimal (**figura 36A**) e a somas dos coxins (**figura 36C**) apresentaram forte tendência estatística (p = 0,06 e 0,09, respectivamente).

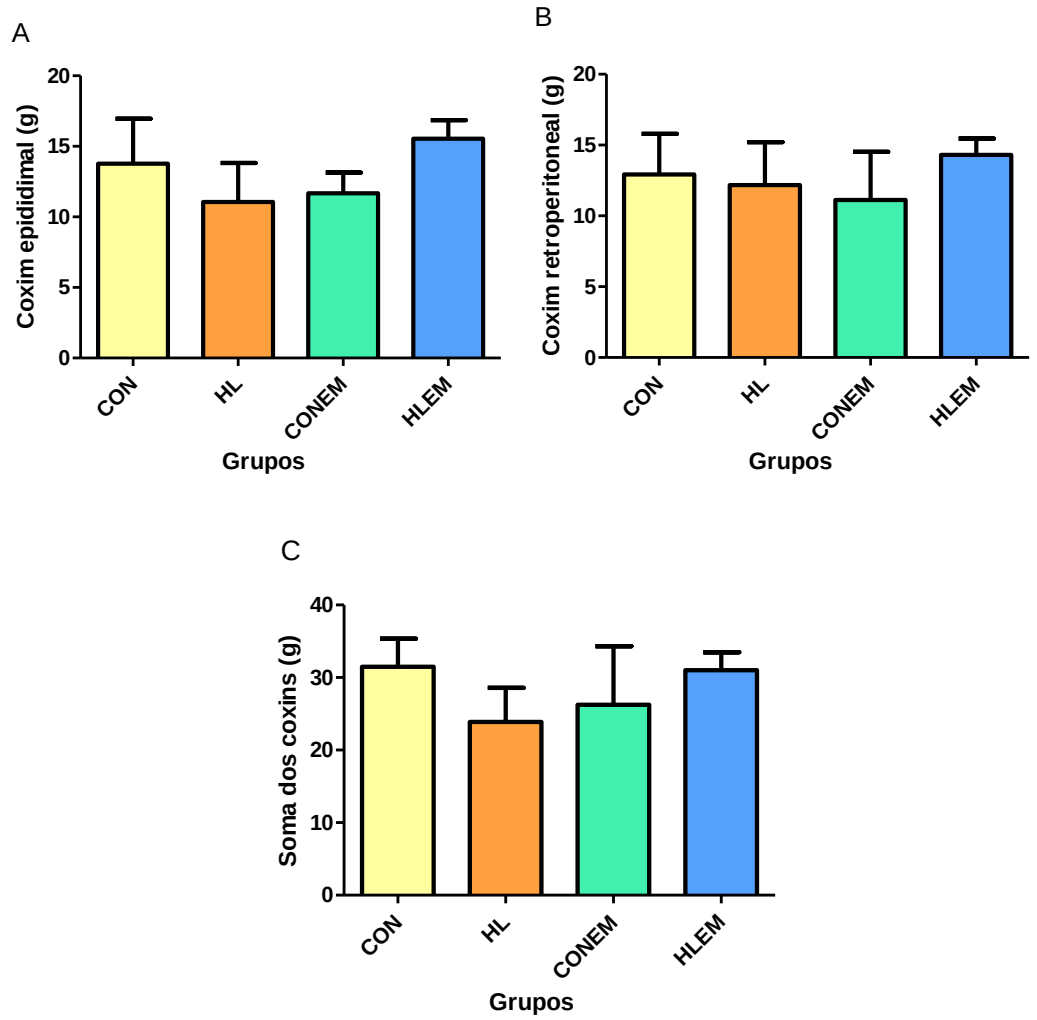

Figura 36. Peso dos coxins adiposos periepididimal (A), peso dos coxins adiposos retroperitoneal (B) e soma dos pesos dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal (C) de ratos *Wistar* eutanasiados na 16ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo).
Não houve resultados estatisticamente significantes entre os grupos.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Após 16 semanas de protocolo experimental, constatou-se novamente que o consumo da ração HL induziu aumento significante do peso do fígado em relação ao grupo que ingeriu a ração CON, contudo o EAEM não foi capaz de reverter esse quadro (**figura 37B**).

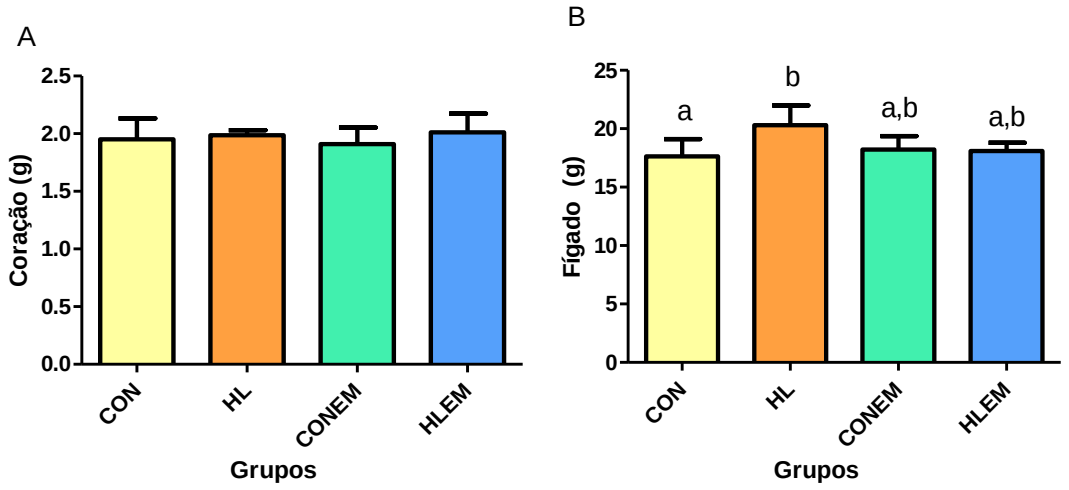

Figura 37. Peso do coração (A) e do fígado (B) de ratos *Wistar* eutanasiados na 16ª semana do protocolo experimental.
Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo).
Barras com letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Não houve resultados significantes no que diz respeito à área sob a curva calculada a partir dos valores de glicemia resultantes do oGTT (**figura 38A**). Entretanto, nota-se que aos 30 minutos após a carga de glicose, o grupo HLEM apresentou maior glicemia em relação ao grupo CONEM. Em adendo, após 60 minutos de teste, o grupo que ingeriu a ração HL apresentou valor significantemente maior de glicemia quando comparado ao grupo que consumiu a ração CON (**figura 38B**). Tais fatos corroboram para a afirmação de que o consumo de ração HL acarreta em um quadro de intolerância à glicose. A administração do EAEM não alterou estatisticamente a resposta glicêmica dos animais durante o oGTT.

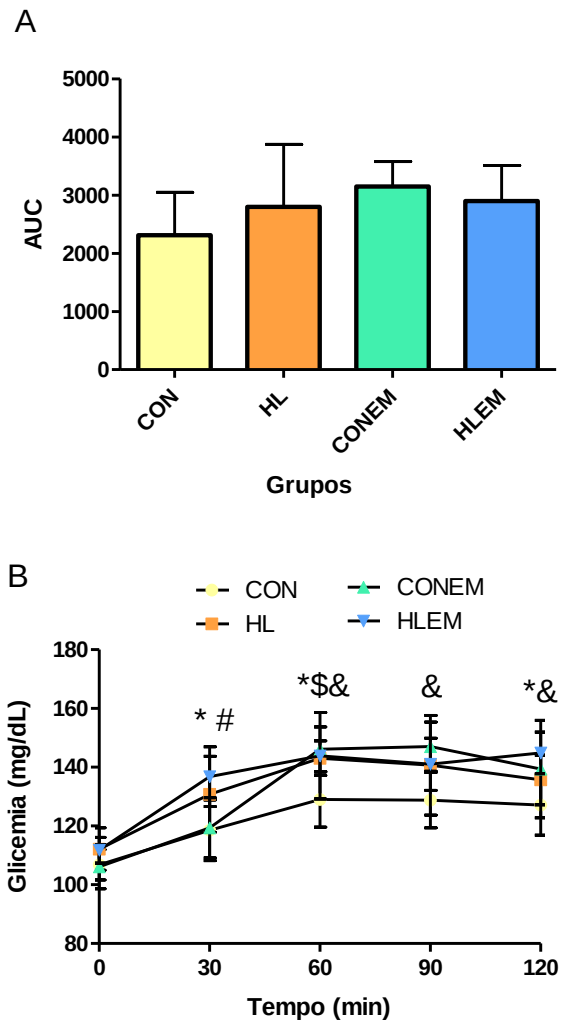

Figura 38. AUC (A) e curva de glicemia nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos (B) referentes ao oGTT de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental e submetidos ao teste de tolerância oral a glicose. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). Símbolos distintos diferem significativamente ($p < 0,05$), onde:* CON X HLEM, # CONEM X HLEM, $ CON X HL e & CON X CONEM. AUC: área sob a curva.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Em relação ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina, os resultados demonstrados na **figura 39A** evidenciam que a administração do EAEM propiciou aumento da sensibilidade à ação deste hormônio nos animais que consumiram a ração CON. Apesar de não ser verificado esse

mesmo efeito nos animais que ingeriram a ração HL no cálculo da área sob a curva, quando se observa a curva glicêmica no decorrer do teste (**figura 39B**), constata-se que, após 5 e 10 minutos da carga insulínica, a intervenção com o EAEM melhorou a resposta à insulina tanto nos animais que consumiram a ração CON, quanto naqueles com a ração HL.

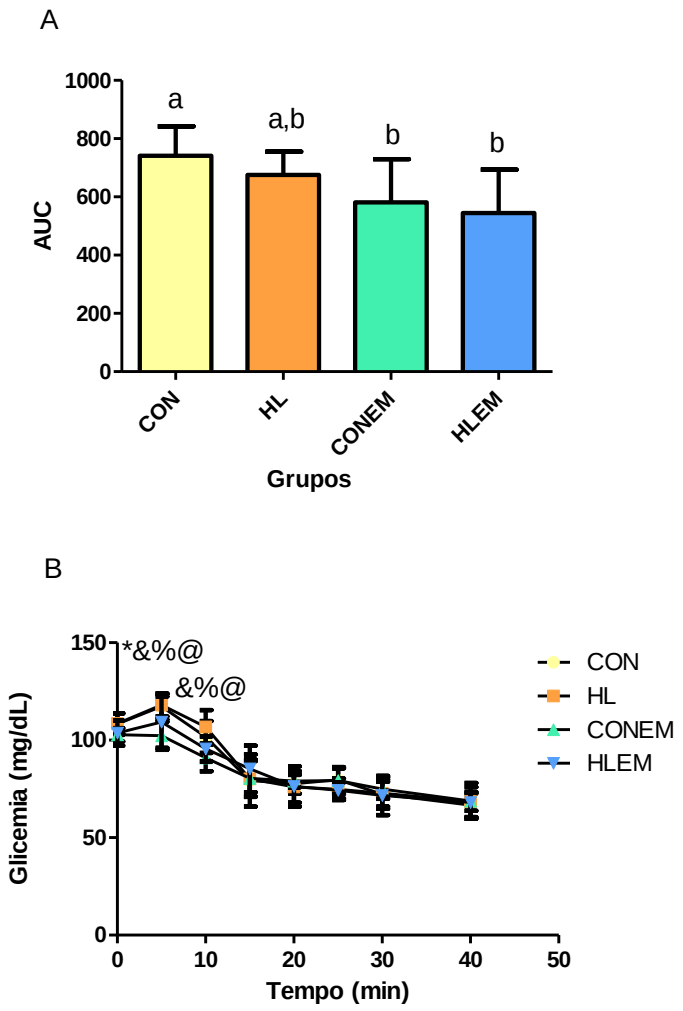

Figura 39. AUC (A) e curva de glicemia nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos (B) referentes ao ipITT de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental e submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal a insulina. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 10-12/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$). Símbolos distintos diferem significativamente, onde: * CON X HLEM, & CON X CONEM, % HL X CONEM e @ HL X HLEM. AUC: área sob a curva.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

A administração do EAEM não atuou reduzindo a glicemia, a insulina e o cálculo do índice HOMA-IR, como pode se observar na **figura 40**.

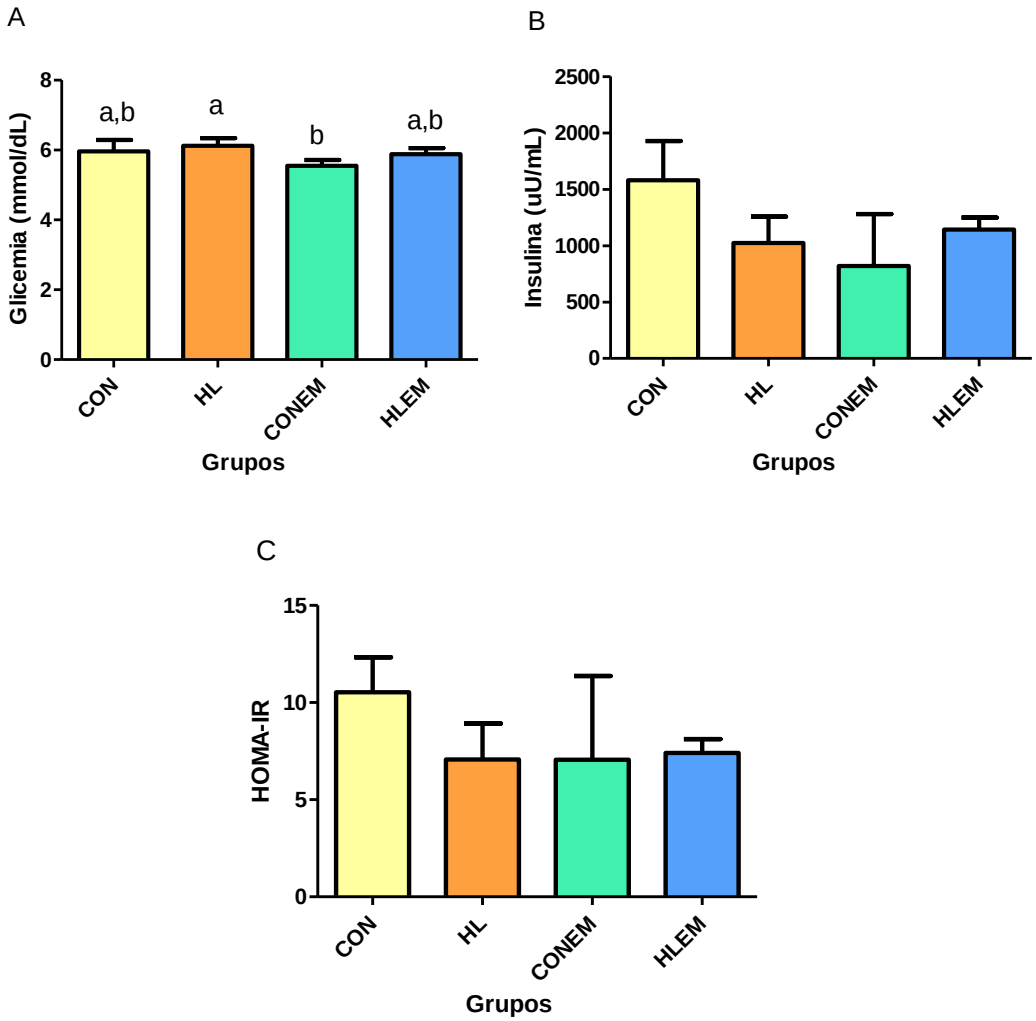

Figura 40. Glicemia (A), Insulina (B) e índice HOMA-IR (C) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

Na **figura 41** estão demonstrados os resultados referentes ao perfil lipídico. Nota-se que os animais que consumiram a ração HL

apresentaram concentrações séricas de LDL-colesterol, VLDL-colesterol e TAG estatisticamente maiores quando comparados aos animais que consumiram a ração CON (**figura 41B, D e F**). Outro dado a ser destacado é que os animais do grupo HLEM apresentaram a concentração sérica de HDL-colesterol significantemente menor em relação aos animais do grupo CONEM (**figura 41C**), indicando possivelmente um efeito negativo da ração HL. Por fim, a **figura 41A** mostra que a administração do EAEM tem a capacidade de alterar a concentração sérica de colesterol total nos animais que consumiram a ração HL.

O grupo HL apresentou atividade sérica da enzima AST significantemente maior em comparação ao grupo CON, entretanto, a intervenção com o EAEM não foi capaz de reverter esse quadro (**figura 42B**). A atividade serica da enzima ALT e a razão desta em relação à AST não foram alteradas pelo consumo da ração HL, nem pela administração do EAEM (**figura 42A e C**).

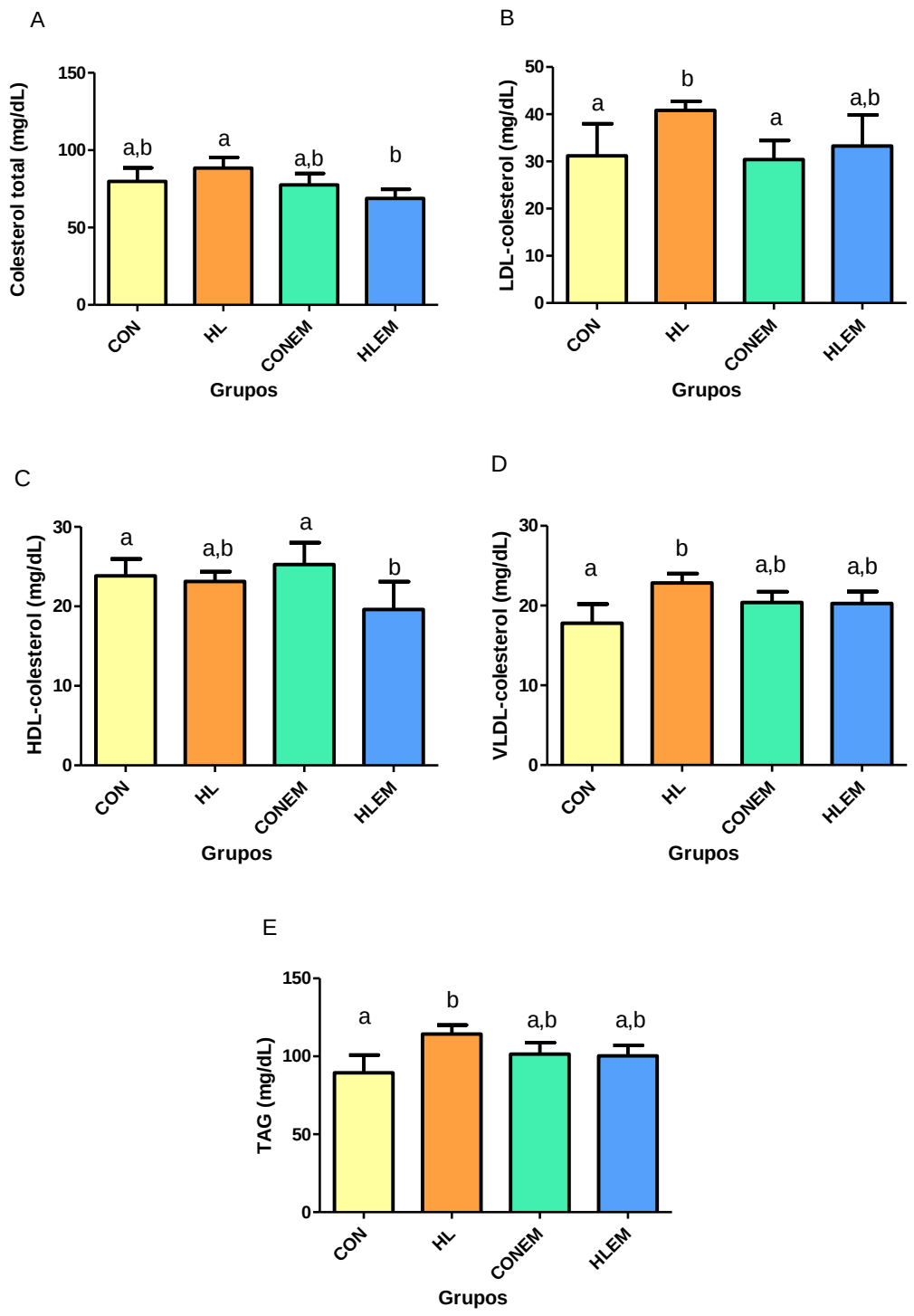

Figura 41. Perfil lipídico de ratos *Wistar* entre a 13ª e a 16ª semana do protocolo experimental. Concentrações séricas (mg/dL) de colesterol total (A), LDL-c (B), HDL-c (C), VLDL (D) e TAG (E).Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

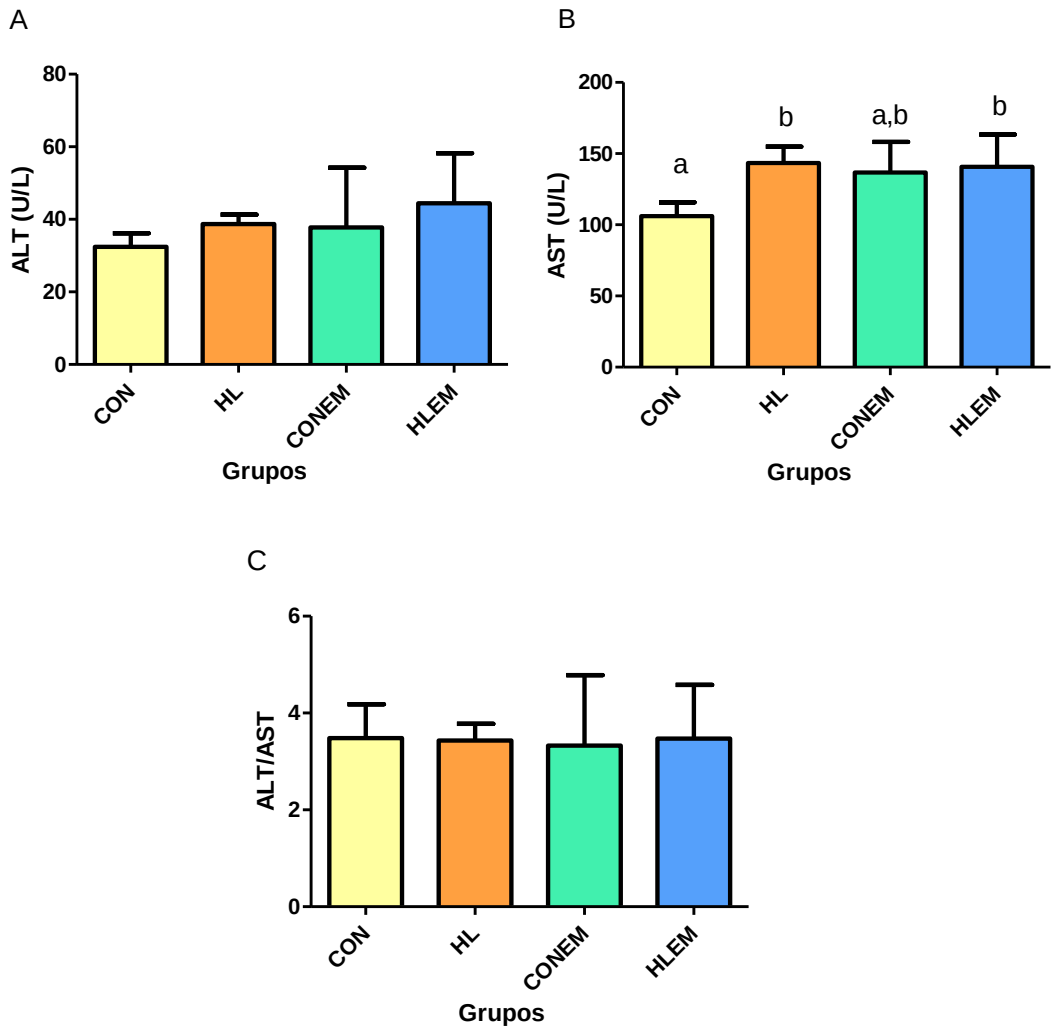

Figura 42. Atividade da enzima alanina aminotransferase (A), atividade da enzima aspartato aminatransferase (B) e razão ALT/AST (C) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 6-8/grupo). Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente (p<0,05).
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

A **tabela 7** mostra os resultados relativos a alguns parâmetros inflamatórios como a MCP-1, a leptina, a IL-6 e o TNF-α, sendo que não foram observados resultados significantes para tais variáveis na 16ª semana de protocolo experimental. Da mesma maneira, a concentração sérica de

PAI-1 e de adiponectina não foram alteradas estatisticamente pela ingestão da ração HL e pela administração do EAEM (**figura 43A e B**). Em contrapartida, a PCR circulante aumentou cerca de 1,5 vezes nos animais que consumiram a ração HL quando comparada à concentração dos animais que ingeriram a ração CON (**figura 43C**).

Tabela 7 - Parâmetros séricos referentes à resposta inflamatória

Parâmetros	**CON**	**HL**	**CONEM**	**HLEM**
	pg/mL			
MCP-1	147,00 ± 31,87	133,90 ± 22,12	163,40 ± 48,18	120,30 ± 31,06
Leptina	5461,00 ± 2499,00	3661,00 ± 1238,00	3965,00 ± 1692,00	5611,00 ± 1295,00
IL-6	10,03 ± 2,93	19,99 ± 11,37	31,16 ± 9,00	34,39 ± 14,69
TNF-α	2,01 ± 0,47	1,84 ± 0,36	2,45 ± 0,97	1,75 ± 1,01

Resultados expressos em média ± desvio-padrão com n = 5-6/grupo.
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

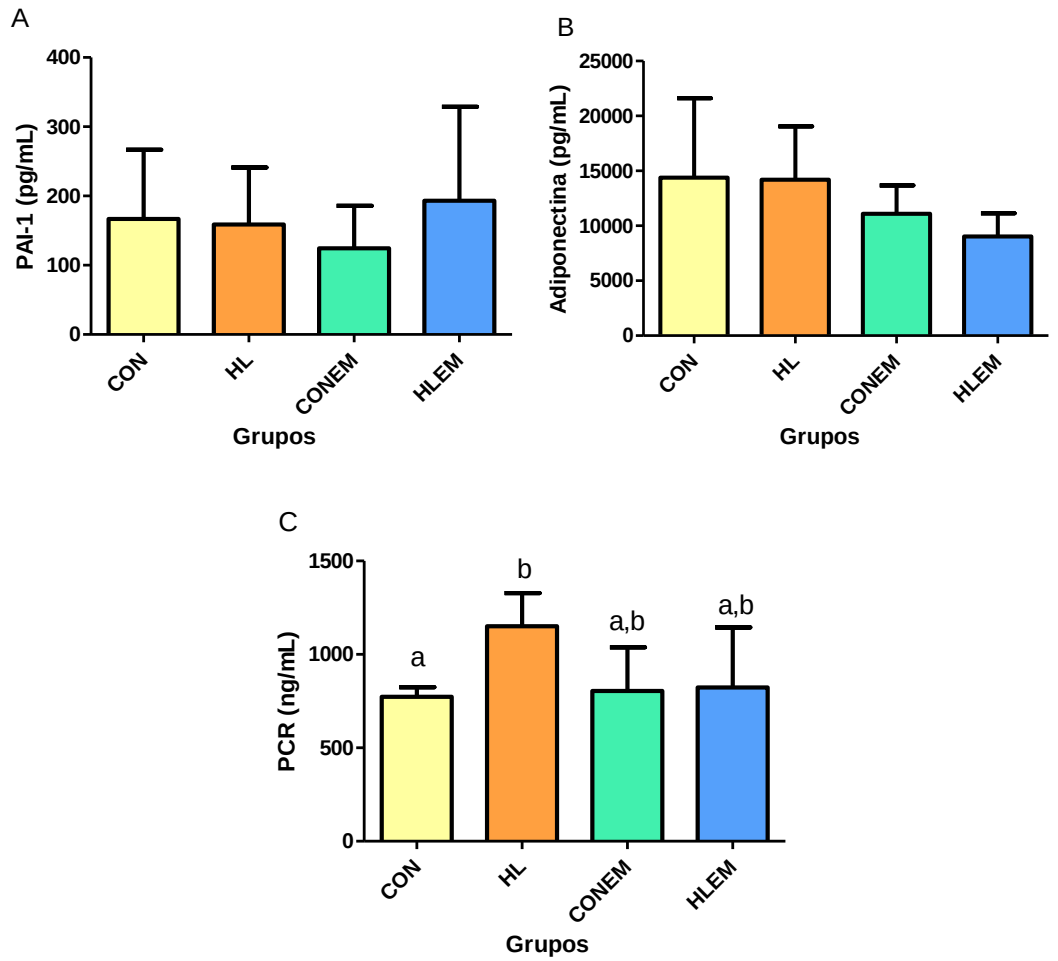

Figura 43. PAI-1 (A), adiponectina (B) e PCR (C) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 4-6/grupo). Os valores são expressos como média ± desvio-padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$).
CON= grupo com dieta CON alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo com dieta HL alimentado até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM= grupo com dieta CON alimentado até a 16ª semana e com intervenção com extrato aquoso de erva-mate a partir da 12ª semana do protocolo experimental.
HLEM= grupo com dieta HL alimentado até a 16ª semana e com intervenção com extrato aquoso de erva-mate a partir da 12ª semana do protocolo experimental.

Todos os fragmentos corados pela hematoxilina-eosina submetidos à análise histológica exibiram lobulação hepática preservada, bem como a angioarquitetura dos capilares sinusóides e dos espaços-porta. Da comparação dos achados histopatológicos, nota-se em apenas dois dos animais do grupo CON (**figura 45**), em um do grupo HL (**figura 48**) e em um do grupo CONEM (**figura 50**), quadro caracterizado por degeneração

vacuolar macro e microgoticular, de discreto a moderado. Não se observou alteração digna de nota em todos os representantes do grupo HLEM (**figura 50**).

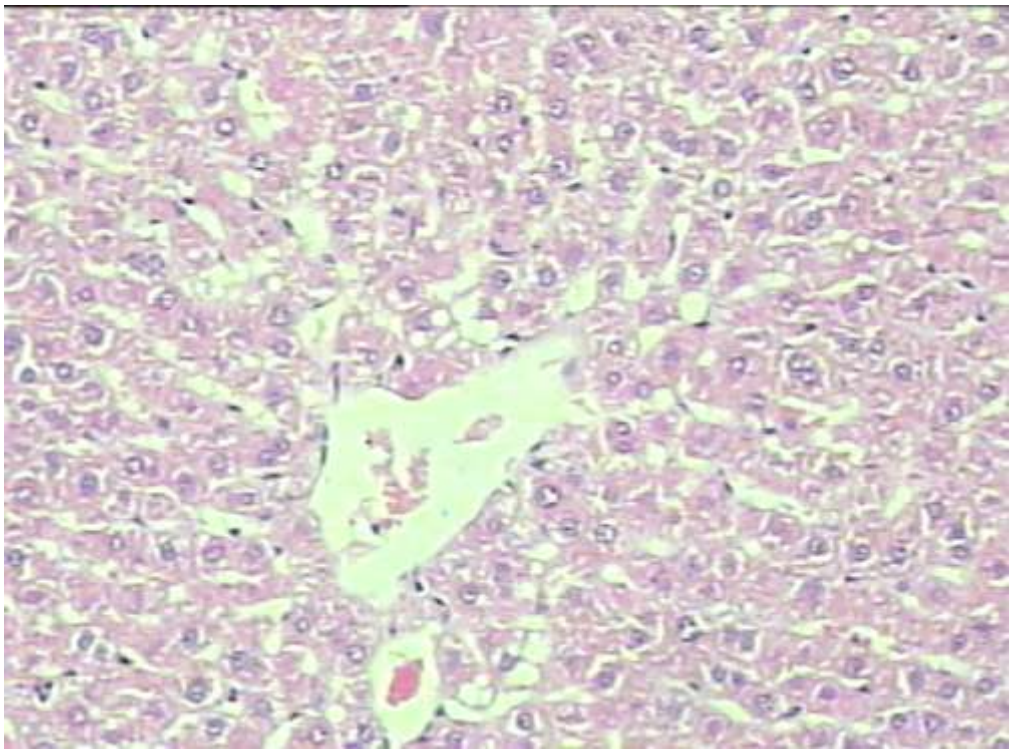

Figura 44. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato do grupo CON, mostrando veia hepática terminal, com hepatócitos da região centrolobular, em disposição radial, com rarefação citoplasmática. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 10 vezes.

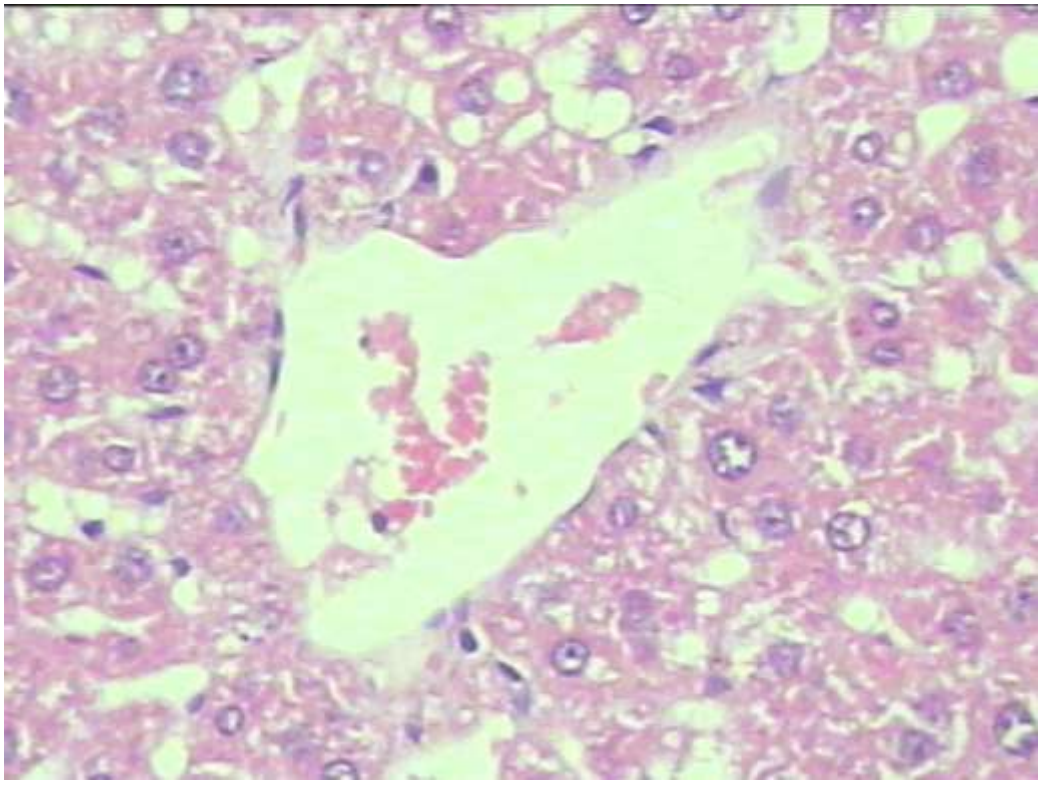

Figura 45. Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando quadro de degeneração vacuolar macro e microvacuolar, no citoplasma de hepátócitos da região centrolobular. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 20 vezes.

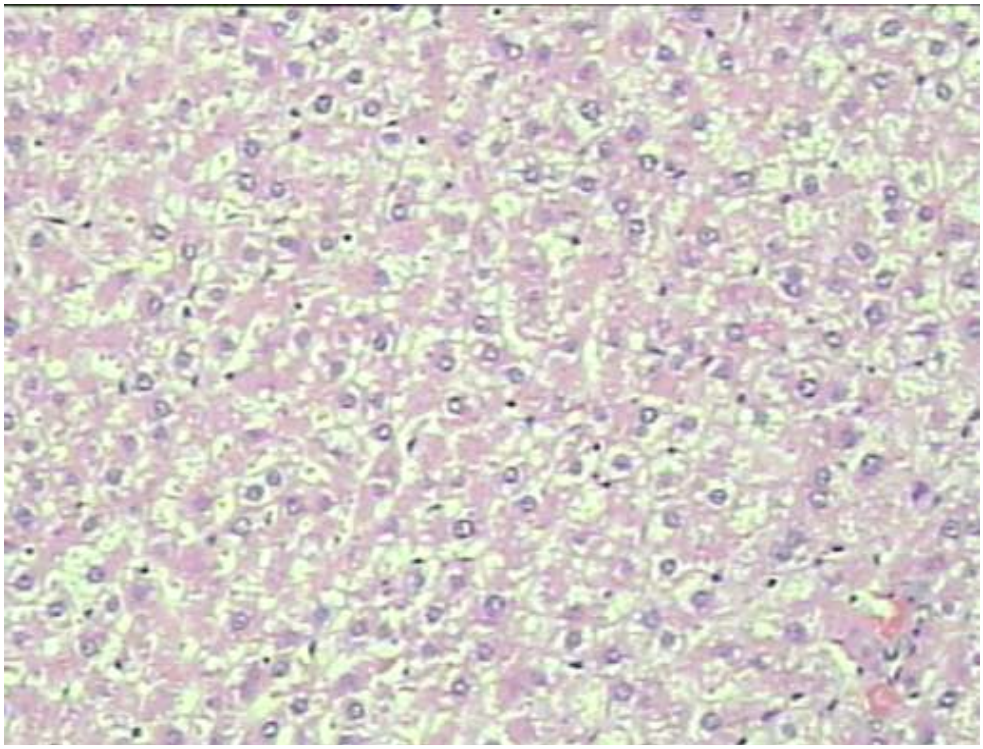

Figura 46. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato pertencente ao grupo HL, mostrando hepatócitos com degeneração vacuolar microgoticular generalizada por toda. A extensão do lóbulo hepático. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 10 vezes

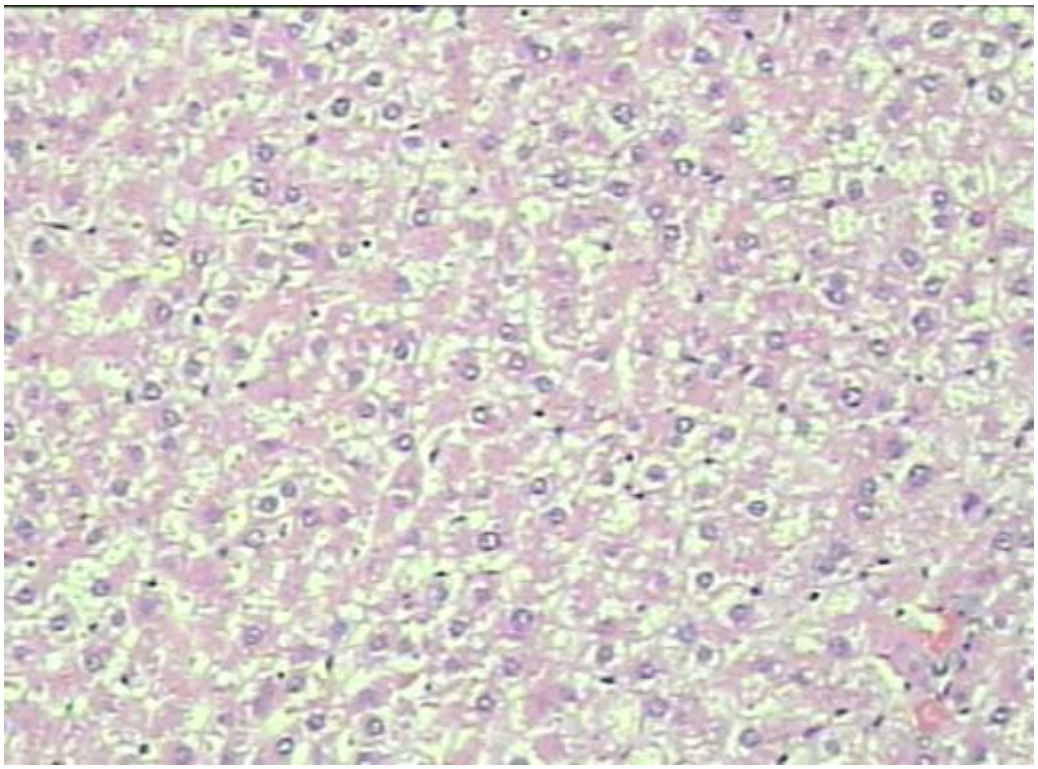

Figura 47. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato pertencente ao grupo experimental designado por HL, mostrando degeneração vacuolar microgoticular no citoplasma dos hepatócitos. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 20 vezes.

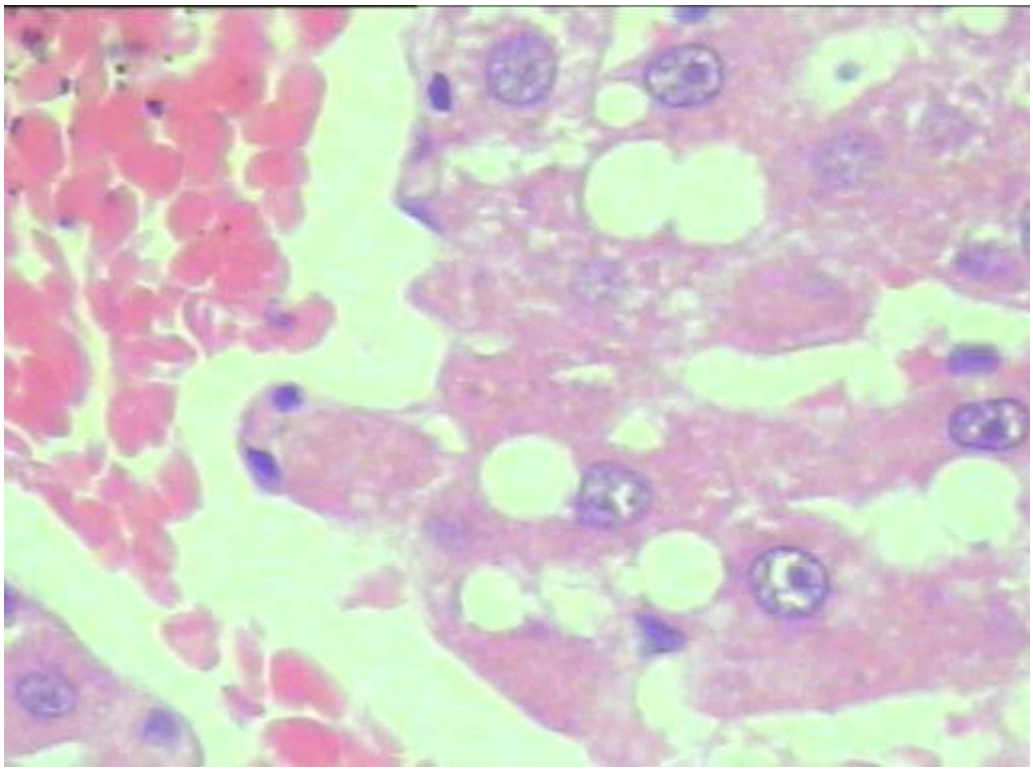

Figura 48. Detalhe em maior aumento da fotomicrografia anterior, evidenciando macro e microvacúolos no citoplasma dos hepatócitos e sinusóide dilatado com eritrócitos no espaço luminal. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 40 vezes.

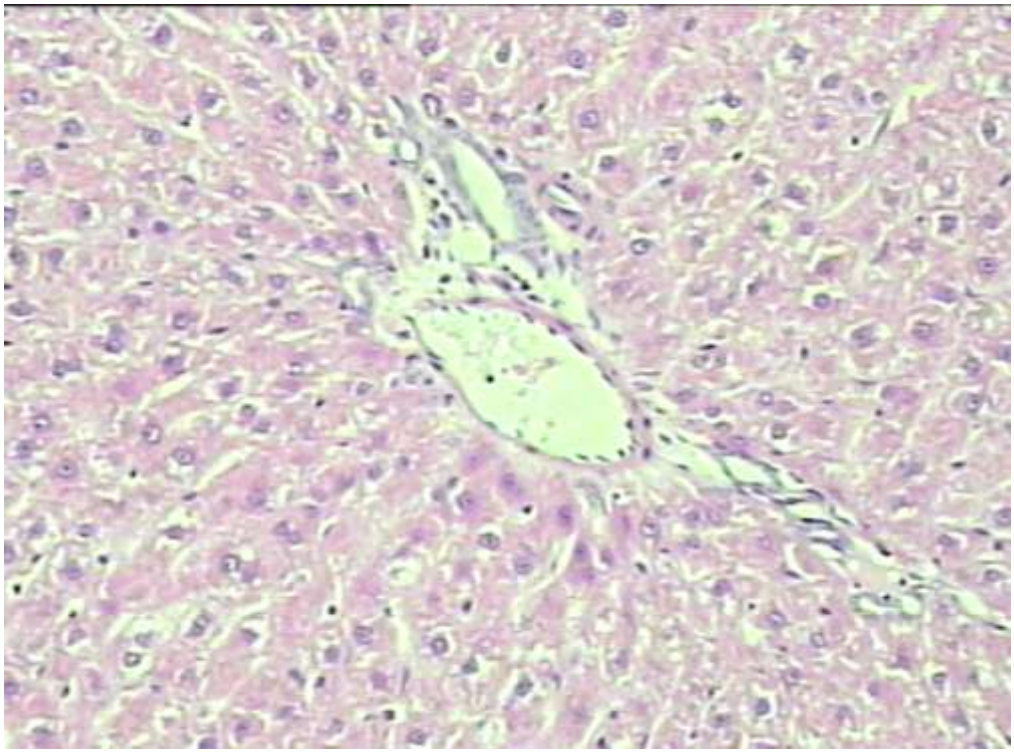

Figura 49. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato do grupo CONEM, mostrando espaço-porta, com hepatócitos dispostos radialmente e com sinusóides acompanhando-os, com degeneração vacuolar discreta. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 10 vezes.

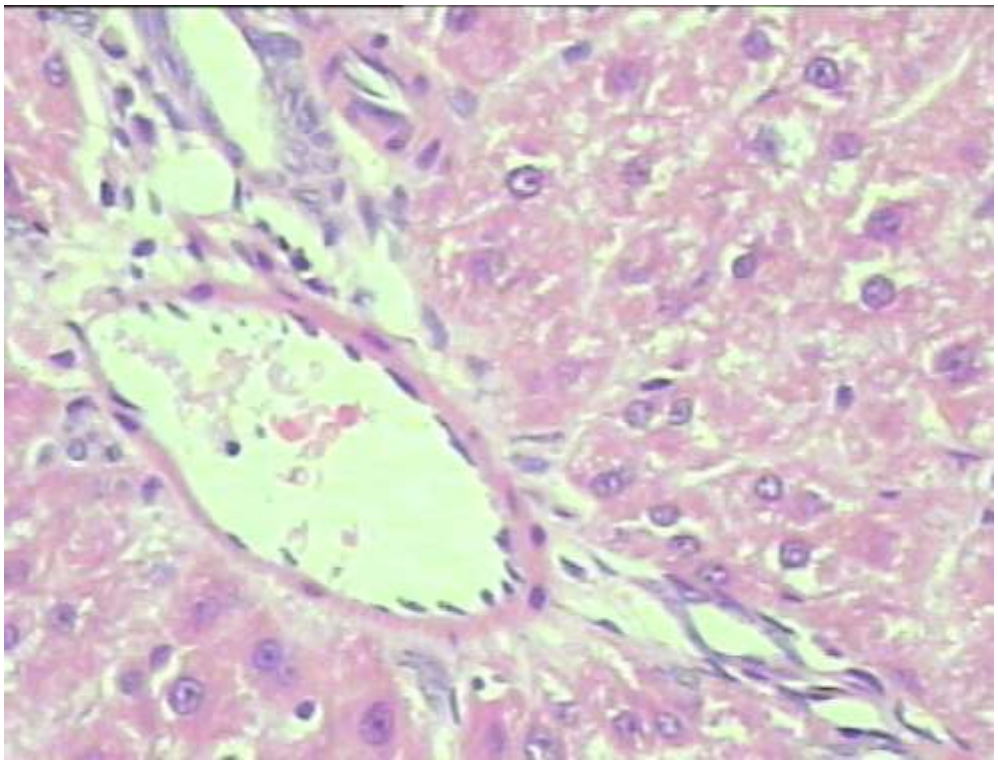

Figura 50. Corte histológico de fígado de rato do grupo CONEM, mostrando espaço-porta e hepatócitos vizinhos à área periportal com degeneração vacuolar discreta. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 20 vezes.

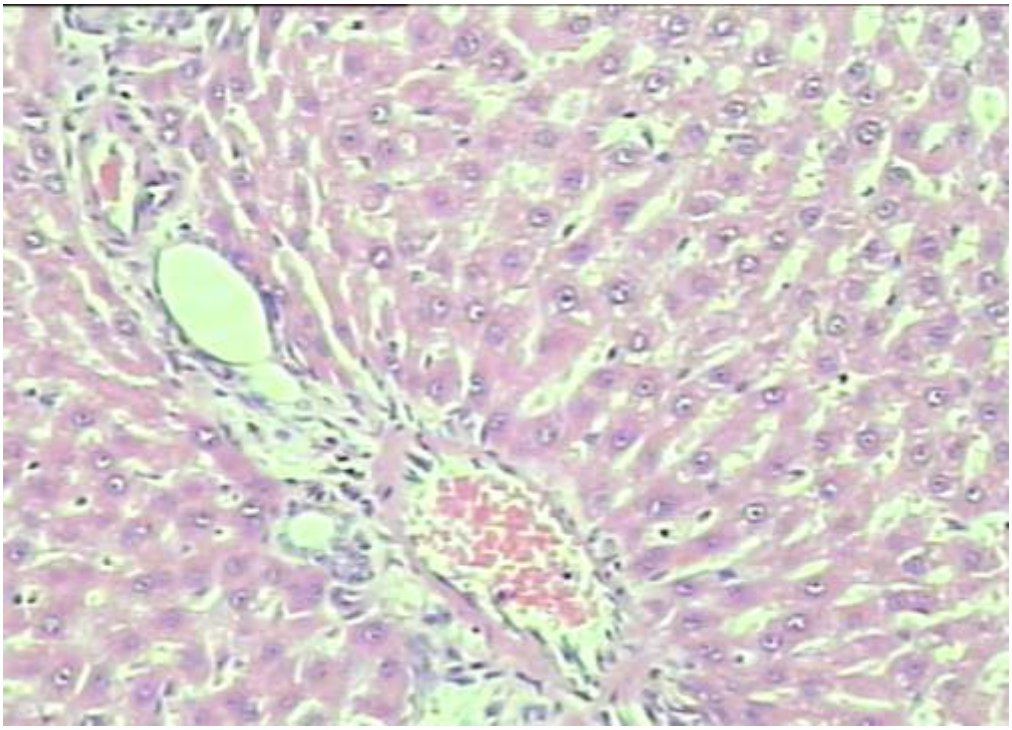

Figura 51. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de rato pertencente ao grupo experimental designado por HLEM, mostrando espaço-porta e hepatócitos circunvizinhos dispostos radialmente e preservados. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 10 vezes.

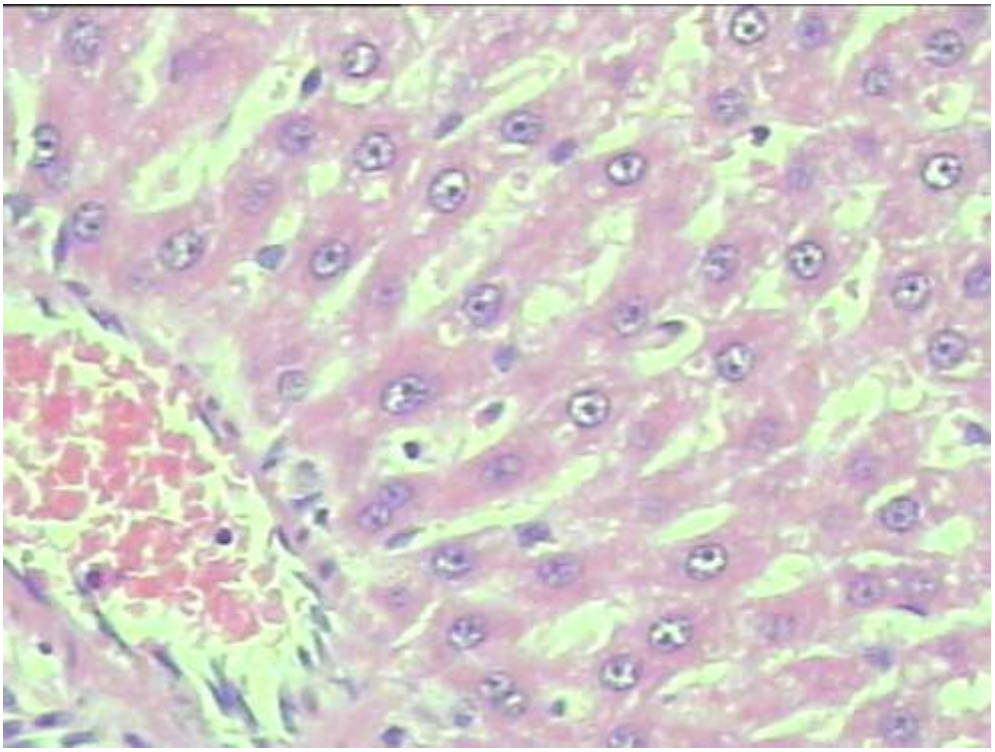

Figura 52. Fotomicrografia de fígado de rato pertencente ao grupo experimental designado por HLEM, mostrando hepatócitos da região periportal e seus sinusóides, assim como seus respectivos núcleos, preservados. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 20 vezes.

Ao atentar para a expressão das proteínas inflamatórias, constata-se que, apesar de não haver resultados significantes na expressão da IKK-α na sua forma total e fosforilada (**figura 53A e B**), houve redução da razão das mesmas quando os animais foram suplementados com o EAEM e alimentados com a dieta HL (**figura 53C**) em comparação ao seu respetivo grupo controle. Em relação à expressão da JNK, não foram observados resultados estatisticamente significantes, contudo, uma forte tendência foi detectada na análise da sua forma total, bem como na fosforilada ($p = 0,06$) (**figura 54A e B**).

Na **figura 55,** verifica-se que a administração do EAEM foi capaz de diminuir significantemente a expressão do NF-κB fosforilado nos animais que consumiram a ração HL quando comparados àqueles que consumiram a mesma ração sem a intervenção.

No que se refere ao IRS-1, pode-se dizer que a ingestão da ração HL, bem como a intervenção com o EAEM não alteraram significativamente a sua expressão, tanto na sua forma total quanto fosforilada (**figura 56**). Todavia, uma relevante tendênca foi constatada na expressão da razão do IRS-1 fosforilado pelo total ($p = 0,06$).

Em relação à expressão da AKT total, verificou-se um resultado significante estisticamente ($p= 0,01$), no entanto, o teste aplicado para verificação de constrastes significantes não indica entre quais grupos ocorreu a diferença (**figura 57A**). A expressão da razão da AKT fosforilada pela total, por sua vez, aumentou significantemente nos animais não estimulados com insulina do grupo HLEM em relação ao grupo HL (**figura 57C**).

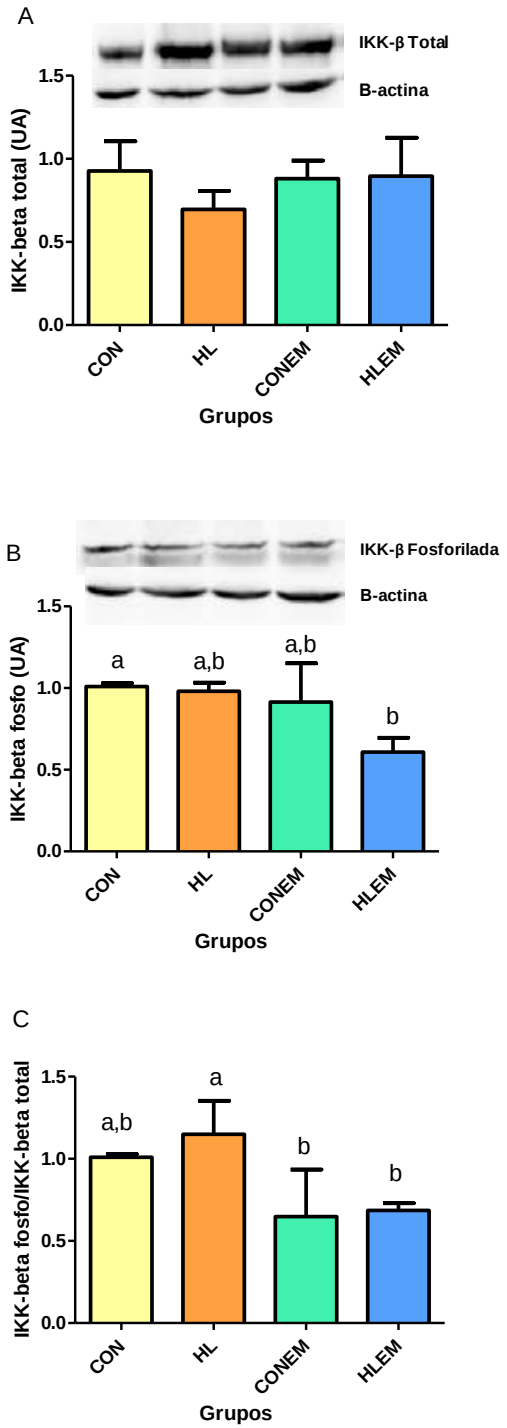

Figura 53. Expressão da IKK-β total (A), IKK- β fosforilada (Ser 180) (B) e razão da IKK- β fosforilada pela IKK-β total (C) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$). *UA = Unidades arbitrárias.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

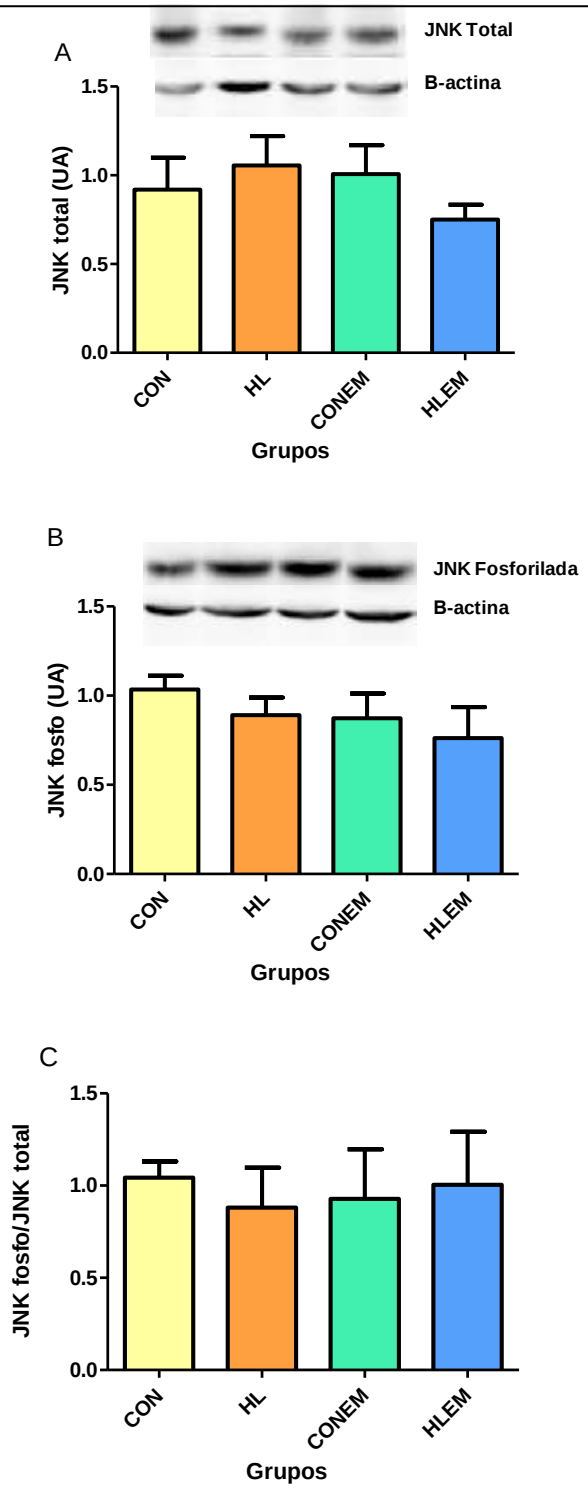

Figura 54. Expressão da JNK total (A), JNK fosforilada (Tyr 185) (B) e razão da JNK fosforilada pela JNK total (C) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$). *UA = Unidades arbitrárias.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

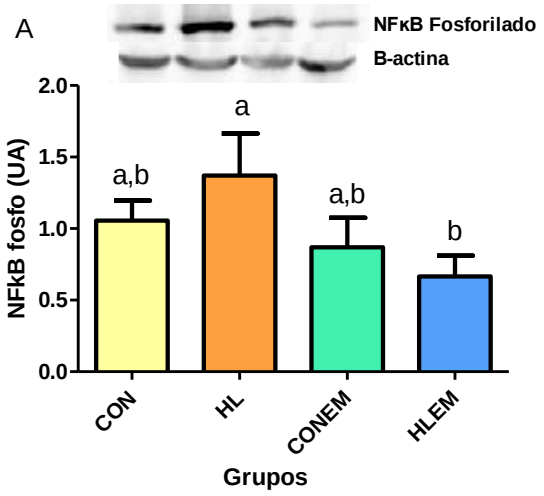

Figura 55. Expressão do NF-κB fosforilado (A) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$). *UA = Unidades arbitrárias.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

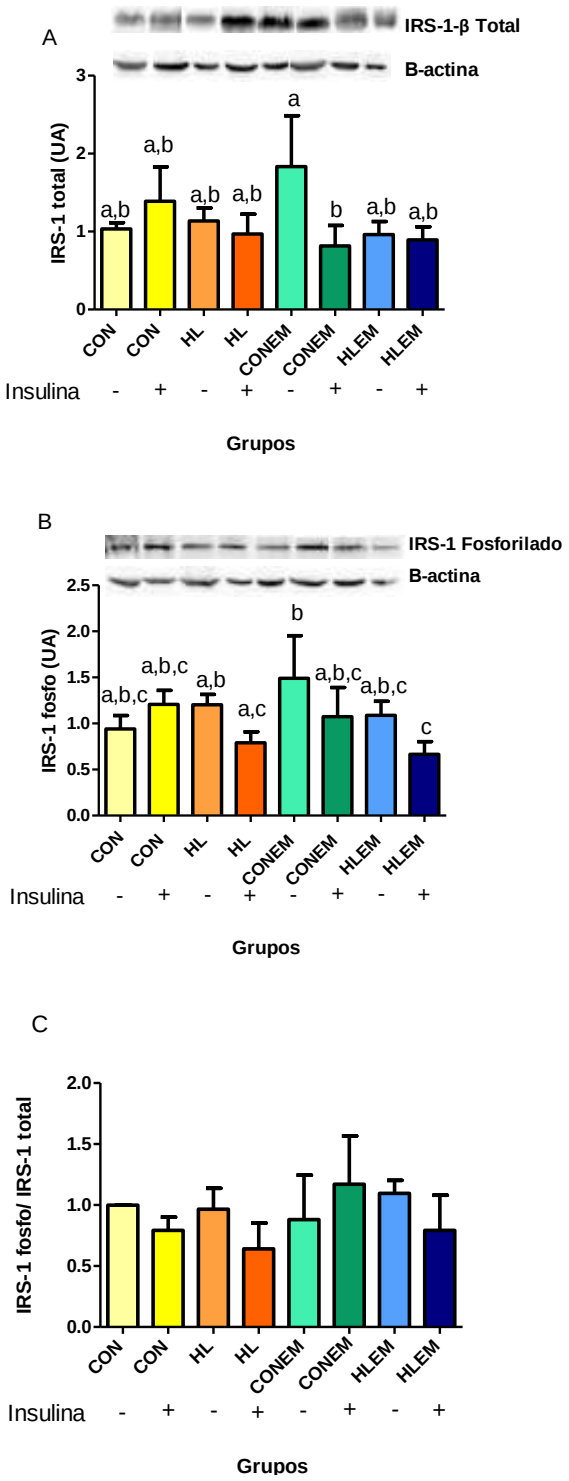

Figura 56. Expressão da IRS-1total (A), IRS-1 fosforilada (Ser 307) (B) e razão da IRS-1 fosforilada pela IRS-1 total (C) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 5-6/grupo). Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$). *UA = Unidades arbitrárias.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

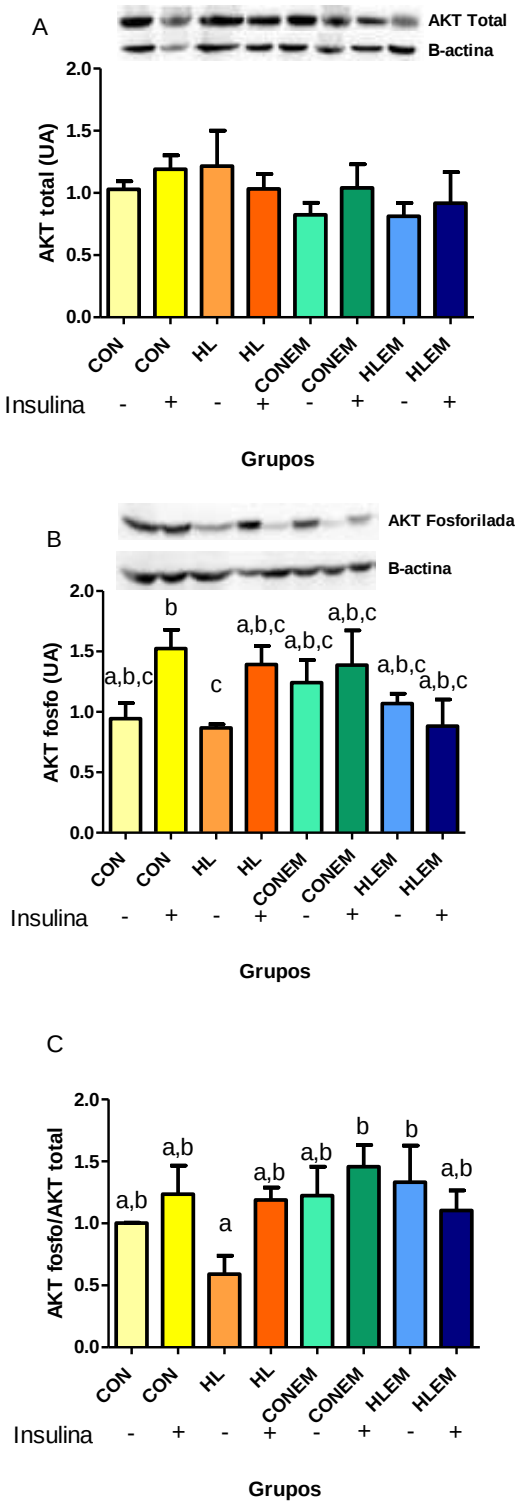

Figura 57. Expressão da AKT total (A), AKT fosforilada (Ser 473) (B) e razão da AKT fosforilada pela AKT total (C) no tecido hepático de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (n = 5-6/grupo). *Barras com letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$). **UA = Unidades arbitrárias. *** Estímulo com 10 U de insulina.
CON = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental.
HL= grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental.
CONEM = grupo que ingeriu ração CON até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo. .
HLEM = grupo que ingeriu ração HL até a 16ª semana do protocolo experimental e recebeu o EAEM, por gavagem, entre a 13ª e a 16ª semanas de protocolo.

7 DISCUSSÃO

7.1 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS REFERENTES À 12ª SEMANA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O objetivo central desse trabalho, após 12 semanas de protocolo experimental, se resume em avaliar o efeito da ingestão de ração hiperlipídica sobre a expressão de proteínas hepáticas envolvidas nos mecanismos de resistência à ação da insulina. Para tal finalidade, optou-se pela utilização de um modelo denominado “obesidade induzida pela dieta” (DIO). Neste modelo, o estado nutricional dos animais pode ser alterado pela oferta *ad libitum* tanto de uma ração hiperglicídica, rica em frutose (JAROSLAWSKA et al. 2011), quanto de uma ração hiperlipídica, rica em ácidos graxos do tipo saturado (ZHANG et al., 2010; JOBGEN et al., 2009; HSIEH et al., 2009), ou até mesmo das duas em conjunto (POUDYAL et al., 2010). No presente estudo, foi escolhida a oferta de uma ração rica em ácidos graxos do tipo saturado para verificação de alterações do metabolismo, da composição corporal e do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.

Primeiramente, cabe destacar que a ração HL foi ajustada pelo valor energético em relação à ração CON. Esse ajuste é de extrema importância, uma vez que ratos apresentam um consumo da ração HL convencional inferior ao da ração CON, o que acarreta em deficiências de micronutrientes e, consequentemente, em alterações das respostas imune e inflamatória (COHEN-LAHAV et al., 2006; WINTERGERST et al., 2007). Desta forma, o ajuste pelo valor energético propiciou um consumo isocalórico entre os grupos estudados, o qual, como já era esperado, não ocasionou aumento de peso significante, porém, acarretou em relevantes alterações metabólicas. Safwat e colaboradores (2009) utilizaram o mesmo tipo de ajuste para a elaboração da ração HL e os resultados, ao final do protocolo experimental de 10 semanas, foram similares ao observado no presente estudo. Não foi

observada diferença significante entre os grupos CONBL e HLBL em relação à quantidade de ração ingerida em gramas e ao peso corporal dos animais, no entanto, diferentemente do presente trabalho, o consumo energético do grupo HL foi 20% maior quando comparado ao grupo CON.

Apesar de não terem sido observados resultados significantes no que se refere à composição química da carcaça, os animais que consumiram a ração HL apresentaram maior depósito de gordura retroperitoneal, tendência a aumento do depósito de gordura periepididimal e da soma desses coxins, bem como maior peso do fígado quando comparados àqueles que ingeriram à ração CON. Meijer e colaboradores (2010) testaram a hipótese de que diversas alterações metabólicas, inclusive o aumento dos coxins adiposos e do fígado, são decorrentes do conteúdo lipídico ingerido e não do excesso energético. Para tanto, agruparam os animais em CON, HL e aqueles que seriam alimentados com ração HL, no entanto, restritos a mesma quantidade energética daqueles alimentados com a ração CON. Os autores observaram que mesmo após consumo isoenergético, os animais desse último grupo apresentaram significantemente maior peso dos coxins inguinal, mesentérico, retroperitoneal e periepididimal, além de possuírem aumento do peso do fígado em 27% e desenvolverem EHNA.

O aumento do peso do tecido hepático nos animais que consumiram a ração HL é indicativo de um quadro de EHNA. Diversos autores têm demonstrado o desenvolvimento de EHNA pelo consumo de dietas HL (KATHIRVEL et al., 2010), visto que estas possuem alto teor de ácidos graxos saturados, sendo similar ao padrão de dieta consumido por pacientes obesos e com acúmulo de lipídios no fígado (MUSSO et al., 2003).

Desta forma, um dado importante a ser destacado é a avaliação histológica do tecido hepático na qual foram observadas apenas alterações morfológicas discretas e que se caracterizaram pela presença mínima de degeneração vacuolar microgoticular em um terço dos fígados examinados (33,33%). Um recente estudo delineado por Longato e colaboradores (2011) constatou que os animais alimentados por oito semanas com uma dieta HL (60% do valor energético total) apresentaram visivelmente maior esteatose

macro e micro-vesicular com leve disfunção hepática, entretanto não foi detectado sinais de apoptose e fibrose celular.

A patogênese da EHNA ainda não está totalmente esclarecida, mas, dentre as explicações mais plausíveis para esta doença, pode-se citar a teoria denominada “two-hit”, na qual primeiramente há um armazenamento ou acúmulo ectópico inapropriado de lipídios no fígado. Em consequência, um quadro de resistência à ação da insulina é estabelecido e, seguidamente, há um acúmulo de TAG entre os hepatócitos. Diante desses fatos, o estresse oxidativo é desencadeado, tendo como principais consequências a injúria do hepatócito e a inflamação (MARCHESINI, et al., 1999; MARCHESINI, et al. 2001).

Mais especificamente, a EHNA ocorre quando há um desequilíbrio no influxo de lipídios no fígado. Alguns dos fatores que contribuem para o acúmulo de lipídios no tecido hepático são: o elevado fornecimento de lipídios pelo aumento da lipólise ou do consumo alimentar; a diminuição da oxidação lipídica; o aumento da síntese de lipídios pela lipogênese *de novo* e a diminuição da secreção de VLDL-colesterol hepático (TILG; MOSCHEN, 2010).

O aumento dos ácidos graxos livres circulantes, bem como das citocinas pró-inflamatórias, ativam diversas vias que culminam para o desenvolvimento da resistência à ação da insulina. Esta, por sua vez, propicia um aumento da lipólise a qual eleva ainda mais a concentração sérica e hepática de ácidos graxos livres. O influxo destes no fígado promove aumento da síntese de TAG hepático. A hiperinsulinemia e hiperglicemia regulam diversos fatores de transcrição que promovem a lipogênese *de novo*, como o *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP)-1 e o *Carbohydrate Responsive Element-binding Protein (ChREBP)* (ADAMS et al., 2005a; BROWNING; HORTON, 2004b). A ativação da SREBP-1 acarreta em aumento da concentração de malonil-CoA o qual, por sua vez, inibe a oxidação de ácidos graxos e, desta forma, favorece o acúmulo de lipídios no tecido hepático (BROWNING; HORTON, 2004b).

Outro possível destino para os lipídios hepáticos é a exportação na forma de lipoproteínas. A apolipoproteína (apo) B facilita esse efluxo lipídico do fígado pela incorporação do TAG antes de ser secretada. Alguns estudos que têm apontado que esse processo está diminuído em quadros de EHNA (ASON et al., 2011; CROOKE et al., 2005; CHARLTON et al., 2002).

Todavia, a literatura científica afirma que o acúmulo de TAG no fígado, em resposta ao aumento do consumo de lipídios dietéticos, na realidade, teria um papel fisiológico protetor e não nocivo (UNGER; SCHERER, 2010). Ratos que possuem expressão aumentada da diacilglicerol-acil-transferase, uma enzima que catalisa a síntese hepática de TAG, desenvolvem a EHNA, no entanto, estão protegidos da resistência à ação da insulina (KOLIWAD et al., 2010; MONETTI et al., 2007). Em contrapartida, o acúmulo de ácidos graxos saturados livres no tecido hepático parece ser muito mais danoso por apresentar efeitos tóxicos ao organismo, resultando em apoptose hepatocelular, dano hepático e fibrose (LI et al., 2009).

Em adendo, o aumento da massa de gordura visceral, conforme foi observado no presente estudo, também contribui para o desenvolvimento da EHNA. Os depósitos de gordura abdominal apresentam altas taxas lipolíticas, liberando ácidos graxos livres, os quais têm acesso direto ao fígado pela veia porta e, desta maneira, iniciam o processo supracitado (FELDSTEIN et al., 2004).

A despeito do aumento do peso do tecido hepático, não foram observadas alterações na atividade das enzimas hepáticas AST, ALT e na razão das mesmas. Contrariando os resultados aqui descritos, um recente estudo delineado por Longato e colaboradores (2011) constatou que os animais alimentados por oito semanas com uma ração HL (60% do VET) apresentaram ao final do protocolo experimental, aumento significante de aproximadamente 57% da atividade sérica da enzima ALT, porém não foi avaliada a atividade da AST e nem a razão dessas transaminases.

Zhang et al. (2010) observaram que ratos Sprague-Dawley alimentados com ração HL por 4, 12 e 24 semanas apresentaram a atividade

das enzimas ALT e AST significantemente superiores aos dos animais alimentados com ração CON em todos os tempos do protocolo experimental.

A EHNA é usualmente diagnosticada após alterações em parâmetros indicativos da lesão hepática no soro sanguíneo, como é o caso da ALT e da AST. Em observações clínicas, pacientes que apresentam essa doença possuem elevações discretas na atividade dessas enzimas, as quais raramente estão três vezes maiores do que o limite estabelecido (HARRISON; NEUSCHWANDER, 2004; ADAMS et al., 2005b). Pelo fato do presente trabalho utilizar um modelo animal, tal critério envolvendo pontos de corte não pôde ser utilizado. No entanto, cabe destacar que, mesmo em estudos envolvendo seres humanos, os pontos de corte não podem ser utilizados como critérios finais para se realizar o diagnóstico, uma vez que aproximadamente 78% dos pacientes não apresentam alteração alguma na atividade das enzimas hepáticas (TORRES; HARRISON, 2008).

De um modo geral, a atividade das transaminases tende a ser maior em quadros de necro-inflamação ou também denominada esteato-hepatite não alcoólica, mas essa observação não é universal (MILNER et al., 2009). Sendo assim, a razão AST/ALT é um parâmetro mais fidedigno a ser utilizado para diagnóstico da EHNA em seres humanos, sendo que valores menores que 1 indicam ausência ou presença mínima de fibrose, enquanto que valores maiores que 1 são indicativos de fibrose intensa e cirrose (MCPHERSON et al., 2010).

O quadro de dislipidemia foi constatado após 12 semanas de protocolo experimental pelo aumento do colesterol total e do LDL-colesterol nos animais do grupo HLBL. Diversos autores têm citado que a dieta HL acarreta em alterações bioquímicas importantes. Safwat e colaboradores (2009) demonstraram em seu estudo que a dieta rica em lipídios aumentou significantemente a concentração plasmática de TAG e VLDL-colesterol.

As alterações lipídicas observadas provavelmente são decorrentes do aumento da ingestão de colesterol e de ácidos graxos do tipo saturado provenientes da ração HL, os quais chegam ao fígado pela circulação portal e são metabolizados a TAG. O transporte hepático destes para a circulação

ocorre por meio das VLDL, das lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e das LDL. Os TAG das VLDL, assim como os dos quilomícrons, são hidrolisados pela lipase de lipoproteína (LLP) e, como produto, os ácidos graxos são liberados para os tecidos e metabolizados. Por ação da LLP, os quilomícrons e as VLDL são progressivamente depletados de TAG e transformados em partículas remanescentes, que são removidas pelo fígado por meio de receptores específicos. Desta forma, uma parte das VLDL dá origem às IDL, que são convertidas em LDL. a qual tem um conteúdo apenas residual de TAG e é composta, principalmente, de colesterol e, uma única apolipoproteína, a apo B100. Assim como as VLDL e as IDL, as LDL são removidas pelo fígado também por meio de receptores específicos, sendo que a expressão dos mesmos tem papel crucial no que se refere à concentração de colesterol no sangue (SBC, 2007).

No presente estudo, o quadro de intolerância à glicose e resistência à ação da insulina ficou fortemente evidente na 12ª semana do protocolo experimental pelos resultados obtidos no oGTT e no ipITT, respectivamente. A área sob a curva dos animais submetidos ao consumo da ração HL foi maior em ambos os testes. No oGTT, este resultado é indicativo de uma menor resposta hepática no sentido de inibir a neoglicogênese, bem como de uma redução da captação de glicose pelos músculos esqueléticos e da secreção pancreática de insulina. Por outro lado, no ipITT, esse resultado evidencia principalmente uma resistência à ação da insulina no músculos esqueléticos e no tecido adiposo. Em adendo, verificou-se que a glicemia de jejum desses animais também estava aumentada.

Diversos são os estudos que associam o modelo de obesidade induzida pela dieta à resistência à ação da insulina. Visando estudar os efeitos farmacológicos da diacerina, Tobar e colaboradores (2011) submeteram os animais a uma dieta HL por 12 semanas. Estes animais apresentaram maior glicemia de jejum e concentração de insulina sérica, bem como maior AUC no oGTT, quando comparados aos animais que ingeriram a ração CON. Nesse estudo, outras análises foram realizadas para verificar o quadro de intolerância à glicose e de resistência à ação da

insulina, como a técnica do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, considerado padrão-ouro. Nos animais que ingeriram a ração HL, a infusão de glicose foi menor quando comparada a do grupo CON.

Outro trabalho publicado recentemente estudou a influência da inflamação para o estabelecimento da resistência à ação da insulina em ratos submetidos à ingestão de ração HL em curto e em longo prazo (LEE et al., 2011). Interessantemente, após três dias de consumo de ração HL, os animais já apresentavam um quadro de intolerância à glicose em relação aos animais do grupo controle, cujo quadro foi novamente observado após 10 semanas de ingestão da ração HL. Tais autores também utilizaram a técnica de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico e observaram que a glicemia basal, bem como a produção hepática de glicose, estavam aumentadas após três dias de protocolo experimental nos animais que ingeriram a ração HL. Estes resultados são consistentes com o fato de que a produção hepática de glicose é a chave-determinante da hiperglicemia basal. Em adendo, tais resultados foram novamente comparáveis aos dos animais que consumiram a ração HL em longo prazo (10 semanas). A taxa de infusão de glicose (TIG) foi menor nos animais alimentados em curto prazo (três dias) com ração HL em relação àqueles do grupo CON. A TIG foi progressivamente diminuindo, chegando ao seu decréscimo máximo nos animais alimentados com ração HL por 10 semanas, indicando o agravo do quadro de resistência à ação da insulina.

Com relação ao ipITT, Wada e colaboradores (2010) encontraram resultados semelhantes ao presente estudo, verificando uma indução da resistência à ação da insulina em animais submetidos à ração HL por oito semanas e, posteriormente, rica em frutose (HF), por mais oito semanas. Nesse estudo, constatou-se que os animais que consumiram a ração HL e HF apresentaram a AUC e o índice HOMA-IR superiores em relação àqueles que consumiram a ração CON.

No presente trabalho, não foi possível a realização da técnica de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, no entanto a avaliação em conjunto do

oGTT e do ipITT após 12 semanas de protocolo experimental possibilitaram análise fidedigna dos resultados referentes a homeostase da glicose.

Já está bem estabelecido na literatura que o consumo de uma ração rica em ácidos graxos saturados está relacionado ao estabelecimento da obesidade a qual, por sua vez, se associa diretamente ao aumento da prevalência das doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas, o DM tipo 2 (STEIN; COLDITZ, 2004; FREIRE et al., 2005). Primeiramente, cabe destacar que, em indivíduos obesos, a resposta inflamatória é diferente daqueles considerados eutróficos (HOTAMISLIGIL, 2006), tendo em vista o consequente aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias, principalmente oriundas do tecido adiposo. A inflamação induzida pela obesidade atualmente pode ser conceituada como meta-inflamação, conceito este relacionado ao estudo dos efeitos desse estado no metabolismo (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011).

De maneira geral, além do aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias, no tecido adiposo há também a infiltração de macrófagos, os quais elevam ainda mais a concentração de citocinas circulantes, diminuindo a sensibilidade à insulina e a captação de glicose pelo adipócito e pelo músculo esquelético (WEISBERG et al., 2003; CAI et al., 2005; GUILHERME et al., 2008).

O fígado é considerado um dos órgãos principais no que se refere ao metabolismo de nutrientes, não apenas em relação ao controle da neoglicogênese, mas também da lipogênese (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011). Neste tecido, em situações em que há ativação da resposta inflamatória, não há infiltração de macrófagos, mas ocorre a ativação de macrófagos residentes, os quais são designados células de Kupffer. Estas também têm a capacidade de elevar a síntese de citocinas pró-inflamatórias, agravando o quadro inflamatório (BAFFY, 2009). Em adendo, há a perda da regulação da neoglicogênese, cujo fato, consequentemente, eleva a produção hepática de glicose (ARKAN et al., 2005).

Um mecanismo bastante atual relacionado à resistência à ação da insulina é a endotoxemia, na qual a microbiota intestinal tem papel crucial.

Sob este aspecto, o consumo de ração HL e a obesidade alterariam o perfil da microbiota intestinal e a permeabilidade intestinal, o que acarretaria em aumento da concentração sérica de lipopolissacarídeos (LPS), os quais têm a capacidade de ativar vias pró-inflamatórias que culminam na resistência à ação da insulina e na intolerância à glicose (CARICILLI et al., 2011).

No presente trabalho, foram avaliadas as concentrações séricas de alguns parâmetros inflamatórios, como a IL-6, o TNF-α, a adiponectina, a MCP-1, o PAI-1, a leptina e a PCR. O consumo da ração HL, com concomitante aumento do depósito visceral de gordura, induziu aumento das concentrações séricas de PAI-1 e PCR, bem como promoveu uma tendência à diminuição da concentração sérica de adiponectina.

O aumento concentração sérica do PAI-1 indica inibição da fibrinólise, processo este diretamente relacionado às doenças cardiovasculares (KOHLER; GRANT, 2000). Há evidências de que o tecido adiposo visceral está diretamente relacionado à síntese e à expressão de PAI-1. A síntese desse inibidor tem relação proporcional com a concentração sérica de insulina (MAVRI et al., 2001), de glicocorticóides (HALLEUX et al., 1999), de angiotensina II, de AGNE (UCHIDA et al., 2003) e, principalmente, do TNF-α (NELS et al., 2012).

O aumento da concentração sérica de PCR pode ser explicado pela síntese elevada de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo branco, as quais migram para o vaso e, chegando ao fígado, interagem com os hepatócitos. Estes, por sua vez, identificam as citocinas, interpretando como um quadro inflamatório, que culmina na síntese de proteínas de fase aguda positiva, como a PCR (BLACK et al., 2004). Um forte indutor da síntese da PCR é a IL-6, no entanto, não foram observados resultados significantes para essa citocina no presente trabalho (VOLETI; AGRAWAL, 2005). Um dado relativamente interessante é que o estado de resistência à insulina e a disfunção endotelial estão proporcionalmente relacionados à concentração sérica da PCR (STEHOUWER et al., 2002) e, ainda, que essa proteína de fase aguda tem se mostrado como um preditor para o DM tipo 2 (PRADHAN et al., 2001).

A adiponectina possui papel-chave no que diz respeito à sensibilidade à ação da insulina e a concentração sérica dessa adipocitocina com ação anti-inflamatória está reduzida em pacientes com aumento da massa visceral de gordura (ARITA et al., 1999). A hipoadiponectinemia está associada com o índice de massa corporal aumentado, a resistência à insulina, a dislipidemia, a disfunção endotelial e o risco aumentado para DCV (TILG; MOSCHEN, 2008). A adiponectina aumenta a sensibilidade à ação da insulina por inibir a neoglicogênese hepática e por promover oxidação dos ácidos graxos no músculo (STUMVOLL et al., 2002).

Sob o ponto de vista molecular, a perda da regulação hepática da neoglicogênese está relacionada à ativação de algumas proteínas da via do NF-κB e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Sendo assim, ao chegar ao hepatócito, por exemplo, o TNF-α (sintetizados pelos adipócitos e macrófagos) se liga ao seu receptor de membrana, o TNFR. Da mesma forma, os AGNE (provenientes do metabolismo da dieta HL ou da lipólise) e o LPS (provenientes da microbiota intestinal) se ligam ao seu receptor de membrana, o TLR4 (TACKE et al., 2009). Essas ligações ativam a proteína quinase (TAK)-1 que, por sua vez, pode ativar a IKK-β e as MAPK (MEK 1/2, MKK 3/6 e MEK 4/6) (NAKATANI et al., 2004; SOLINAS; KARIN, 2010).

A ativação da IKK-β, de forma resumida, pode fosforilar o IRS-1 no resíduo de serina 307, inibindo a ativação da PI3-K e a atividade da PKB/AKT. Essa sequência de fatos reduz a capacidade de síntese de glicogênio e de inibição da produção endógena de glicose pelo fígado, uma vez que a AKT influencia na supressão da gliconeogênese hepática por meio da fosforilação de fatores de transcrição designados FOXO, reduzindo a expressão de genes que codificam as enzimas envolvidas na neoglicogênese, como a PEPCK e G6Pase. Por outro lado, a ativação das MAPK induz a fosforilação de proteínas como a JNK, a qual também apresenta a capacidade de fosforilar o IRS-1 no resíduo de serina 307, o que, novamente, interrompe a via de sinalização da insulina. Todos esses

fatos, em conjunto, acarretam em um quadro de hiperglicemia (SOLINAS; KARIN, 2010).

Ainda, a ativação da IKK-β e da JNK culmina na translocação do NF-κB do citoplasma para o núcleo, local onde se liga à região promotora presente no DNA e promove a ativação da transcrição diversos genes que codificam proteínas com ação pró-iflamatória, como o TNF-α e a IL-6, agravando ainda mais o quadro inflamatório e a resistência à ação da insulina (HAYDEN; GHOSH, 2008). Sendo assim, no presente trabalho, optou-se por avaliar a expressão de proteínas-chaves envolvidas na resposta inflamatória — IKK-β, JNK e NFκB — e na via de sinalização da insulina — IRS-1 e AKT.

Não foram observados diferenças significantes entre os grupos estudados, todavia, esses dados contrariam a literatura científica. Tobar e colaboradores (2011) verificaram que, após o consumo de ração HL, por 12 semanas, os animais apresentaram expressão hepática aumentada da JNK, da IKK-β e do IRS-1 (Ser 307), e diminuída da AKT (Ser 473), nas suas formas fosforiladas, em relação aos animais que foram submetidos à ração controle.

Outro estudo recente publicado (SHAO et al., 2012) verificou que, após 28 semanas de ingestão de ração HL, ratos C57BL/6J apresentaram diminuição significante da expressão hepática da AKT fosforilada (Ser 473). Os autores mostraram também que a ingestão da ração HL acarretou em aumento da expressão hepática da proteína ribossomal S6K, porém sem alterar a expressão do NF-κB fosforilado.

No presente trabalho, também foi constatada diminuição da expressão da AKT fosforilada quando os animais foram submetidos à ração HL, entretanto, não foi observada alteração da expressão do NF-κB fosforilado. Pelo fato de não ter sido verificado aumento da via inflamatória no fígado que acarretasse no quadro de resistência à ação da insulina, sugere-se que tal fato possa ser decorrente da ativação de outras vias de sinalização intracelular. Dentro deste contexto, a proteína quinase R (PKR),

a proteína ribossomal S6K, a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e a proteína quinase denominada alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) também possuem a capacidade de inibir a fosforilação do resíduo de tirosina 1222 do IRS-1, o que implica na possível ativação de outras vias celulares que antagonizam a via de sinalização da insulina (BOURA-HALFON, ZICK, 2009).

7.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS REFERENTES À 16ª SEMANA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

No que concerne à caracterização da erva-mate liofilizada utilizada para suplementação, foram identificados 11 compostos fenólicos, dentre esses, destaca-se a presença do 5-CQA (27,3 mg/g do extrato). Dentre as metilxantinas, a cafeína foi o principal composto detectado (14,5 mg/g do extrato). Os compostos fenólicos totais representaram 103,2 mg/g do extrato puro.

Arçari e colaboradores (2009), visando analisar os efeitos da erva-mate no que concerne à perda de peso, verificaram que o composto presente em maior quantidade também foi o 4,5-CQA (32,3 mg/g de extrato), seguido da cafeína (5,8 mg/g de extrato). Os composto fenólicos totais representaram 348,8 mg/g de extrato puro.

A intervenção com o EAEM não alterou o consumo alimentar dos animais quantitativamente e energeticamente quando submetidos à ração CON e HL, mas promoveu diminuição no ganho de peso dos animais quando estes ingeriram a ração HL. A literatura sugere que a erva-mate tem a capacidade de diminuir o esvaziamento gástrico, o consumo alimentar e o peso corporal. Hussein e colaboradores (2011) constataram que a administração crônica do EAEM (50 ou 100 mg/Kg de peso corporal/dia),

durante três semanas, reduziu significantemente a quantidade de ração ingerida e o peso corporal. Segundo este estudo, os efeitos observados são decorrentes principalmente do aumento do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP)-1 sérico, o qual sinaliza a saciedade após uma refeição. Torna-se importante destacar que o ácido dicafeoilquínico, o ácido clorogênico e a cafeína foram os principais componentes responsáveis por diminuir o consumo alimentar, enquanto que o ácido dicafeoilquínico e as metasaponinas, por aumentar a concentração sérica de GLP-1.

Apesar de não ser constatado no presente estudo diminuição dos coxins adiposos devida à administração do EAEM, verificou-se redução no percentual de lipídios e aumento no percentual de massa magra na carcaça dos animais do grupo CONEM em relação ao grupo CON. Arçari e colaboradores (2009) observaram em seu estudo que a administração de 1,0 g/Kg de peso corporal/dia em animais submetidos à ração HL diminuiu significantemente o peso corpóreo dos animais, a adiposidade e o depósito visceral periepididimal. Segundo os autores, a ração HL diminuiu a expressão de proteínas relacionadas à termogênese no tecido adiposo marrom, como o co-ativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas (PGC-1) e as proteínas desacopladoras (UCPs), dessa forma reduzindo a biogênese mitocondrial e a respiração muscular, o que favorece o desenvolvimento da obesidade. Interessantemente, a administração do EAEM foi capaz de reverter esse quadro, aumentando a expressão das proteínas supracitadas e, consequentemente, promovendo a perda de peso e a diminuição do depósito periepididimal. Outros autores sugerem que o efeito do EAEM em promover a perda de peso é decorrente das metilxantinas presentes no extrato (PANG et al., 2008).

Dentre outros efeitos citados na literatura, destaca-se a capacidade do EAEM de melhorar o perfil glicêmico e lipídico em estudos *in vivo*. No presente trabalho, verificou-se que os animais que foram suplementados com o EAEM apresentaram maior sensibilidade à ação da insulina, quando submetidos ao ipITT, e menor concentração sérica de colesterol total.

Em um estudo realizado em 2011, visando analisar qual a melhor intervenção, indivíduos diabéticos tipo 2 e pré-diabéticos foram divididos em três grupos, sendo que um destes recebeu apenas o EAEM (cerca de um litro por dia), o outro foi submetido à uma intervenção nutricional, enquanto o último grupo recebeu ambas as intervenções. Verificou-se que no primeiro grupo houve uma redução da glicemia, após 60 dias de protocolo experimental, e do valor de hemoglobina glicada, após 20 dias. Nos outros grupos não foram observados resultados significantes (KLEIN et al., 2011). Dentre as hipóteses aventadas para explicar estes resultados, cita-se que o ácido clorogênico presente na erva-mate pode inibir a atividade da enzima glicose-6-fosfato translocase, diminuindo a produção hepática de glicose e, consequentemente, a glicemia (HEMMERLE et al., 1997). Em adendo, o ácido clorogênico, o ácido gálico e o ácido cafeico, também presentes no EAEM, parecem promover a captação de glicose pelos hepatóticos e por células 3T3-L1 (PRASAD et al., 2010; HUANG et al., 2009). A cafeína, por outro lado, parece auxiliar no controle glicêmico pelo aumento da sensibilidade à ação da insulina (KEIJZERS et al., 2002; YAMAUCHI et al., 2010).

Um provável mecanismo pelo qual há a redução da concentração sérica de colesterol total e de suas frações é a capacidade da erva-mate em bloquear a absorção do colesterol no intestino delgado e/ou inibir a síntese hepática de colesterol. Tais processos podem ser atribuídos principalmente a presença de saponinas, compostos fenólicos, flavonóides e/ou cafeína presentes no chá-mate. Alguns autores têm sugerido que tanto o EAEM, quanto as saponinas isoladas da erva-mate, podem formar complexos com o ácido cólico *in vitro*, inibindo a absorção intestinal do colesterol (FERREIRA et al., 1997). Ainda, as catequinas e a cafeína parecem possuir a capacidade de suprimir a absorção intestinal de colesterol por reduzir a solubilidade das micelas (IKEDA et al., 1992, WANG et al., 2006). As quercetinas podem aumentar a excreção de colesterol nas fezes (BOK et al., 2002), enquanto que o ácido cafeico tem a capacidade de diminuir a atividade da enzima

colesterol acil-CoA aciltransferase no fígado de ratos alimentados com ração hipercolesterolêmica (IKEDA et al., 1992, WANG et al., 2006).

Um estudo conduzido por Morais et al. (2009) constatou que indivíduos hiperlipidêmicos, que consumiram um litro de EAEM por dia, apresentaram uma redução na concentração plasmática de colesterol total e de LDL-colesterol, bem como aumento da concentração plasmática de HDL-colesterol após 20 dias de protocolo experimental, sendo estas concentrações mantidas após 40 dias. Tais resultados corroboram para o mecanismo hipolipidêmico acima descrito e comprovados pelo presente estudo.

Recentemente, em um artigo foi publicado por Arçari e colaboradores (2011), ficou evidenciado o potente efeito do EAEM em atenuar a inflamação induzida pela obesidade. Com um desenho experimental muito similar ao do presente estudo, os autores submeteram ratos ao consumo de ração HL por 12 semanas e, posteriormente, à suplementação com o EAEM até a 16 ª semana. Constatou-se que os animais que receberam o EAEM apresentaram redução da expressão gênica hepática do TNF-α, da IL-6 e da iNOS, no entanto, não foi verificada diferença nas concentrações plasmáticas do TNF-α e da IL-6.

No presente estudo, semelhantemente, após a intervenção com o EAEM não se observou redução da concentração plasmática de nenhum dos parâmetros inflamatórios, como do TNF-α e da IL-6, no entanto, sua administração foi capaz de diminuir a razão da expressão da IKK na sua forma fosforilada pela total, o que, consequentemente, também acarretou em diminuição da fosforilação do NF-κB, que é um potente fator de transcrição de genes relacionados à inflamação (LI; VERMA, 2002).

Em um estudo *in vitro* realizado com macrófagos ativados por LPS, a presença do EAEM ou mesmo de seus compostos bioativos isolados inibiu a resposta inflamatória por meio do bloqueio da COX-2, sendo que a quercetina apresentou a maior capacidade de inibição. A combinação de quercetinas e saponinas do EAEM resultou em uma interação sinérgica que

inibiu a síntese de óxido nítrico e de prostaglandinas E2. Ainda, suprimiu a síntese de IL-6, IL-1 e reduziu a translocação induzida por LPS do NFκB (OLMOS et al., 2008). A despeito dos resultados observados pelos pesquisadores em questão, o presente trabalho foi um dos primeiros na literatura científica a avaliar o efeito do EAEM *in vivo* sob a via inflamatória e verificar resultados positivos.

Apesar de verificada apenas tendência na razão IRS-1 fosforilada:total, os resultados referentes à expressão da AKT no fígado corroboram a hipótese supracitada, sendo que se observou melhora da sensibilidade à ação da insulina pela intervenção com o EAEM nos animais submetidos à ração HL sem o estímulo com insulina.

Poucos são os estudos encontrados na literatura científica que relatam os efeitos do EAEM na via de sinalização da insulina no fígado sob um ponto de vista molecular, no entanto, o estudo previamente citado de Arçari e colaboradores (2011) também constatou que a administração do EAEM por 16 semanas reverteu a resistência à ação da insulina induzida pela dieta HL, resultado este evidenciado pelo aumento da expressão hepática da proteína AKT e diminuição da IRS-1 (Ser 307), ambas nas suas formas fosforiladas.

Uma limitação importante do trabalho a ser destacado é a dose administrada de 1 g/Kg de peso corporal/dia, a qual, se fosse extrapolada para o consumo populacional, corresponderia a 2,8 litros para um indivíduo de 70 Kg. No presente estudo, essa dose foi administrada uma única vez no dia para minimizar o sofrimento e o estresse dos animais decorrente da gavagem. Todavia o consumo habitual do EAEM é feito em pequenas doses, no decorrer do dia e, raramente, alcançam a quantidade estabelecida pela literatura científica visando os efeitos benéficos. Mas, por outro lado, há diversos estudos populacionais evidenciando, por exemplo, que o consumo de 1 litro de chá-mate já exerce efeitos positivos sob o ponto de vista metabólico (KLEIN et al., 2011; MORAIS et al., 2009).

Outro fato limitante a ser ressaltado foi a utilização de ratos *Wistar* para a execução do protocolo experimental, visto que essa linhagem de

animais não responde adequadamente ao modelo de obesidade induzida pela dieta.

8 CONCLUSÃO

A ração HL foi capaz de induzir aumento da adiposidade corporal, resultando também em um quadro de hiperglicemia, intolerância à glicose, dislipidemia, os quais são decorrentes também do estabelecimento de um perfil pró-inflamatório. A ração HL não influenciou sobre a expressão de proteínas envolvidas com a resposta inflamatória (IKK, JNK e NF-κB) e da IRS-1 (Ser 307), que está presente na via de sinalização da insulina; contudo, diminuiu a fosforilação da AKT. Desta forma, conclui-se que o consumo de ração HL pode ser considerado um dos principais fatores na etiologia da obesidade e no desenvolvimento das doenças crônicas não-transmissíveis, em especial do DM2.

A intervenção com o EAEM diminuiu o ganho de peso do animais, ao mesmo tempo em que reduziu o percentual de lipídios e aumentou o percentual de massa magra da carcaça. Além disso, promoveu aumento da sensibilidade à ação da insulina e redução da concentração sérica de colesterol total. Apesar de não ter sido observada alteração do parâmetros inflamatórios séricos, a administração do EAEM foi capaz de diminuir a expressão hepática da razão IKK-β fosforilada:total, bem como diminuiu a expressão do NF-κB fosforilado, indicando atenuação da resposta inflamatória hepática. Todos esses fatores, em conjunto, indicam que o EAEM pode ter um efeito positivo na redução do risco e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis.

9 REFERÊNCIAS

1. ABOU-RAYA, A.; ABOU-RAYA, S. Inflammation: a pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. **Autoimmune Reviews**, v. 5, p. 331-337, 2006.

2. AGUIRRE, V.; UCHIDA, T.; YENUSH, L.; DAVIS, R.; WHITE, M.F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **Journal of Chemical Biology**, v. 275, p. 9047–9054, 2000.

3. ALBANESE, A.A.; ORTO, L.A. Protein and amino acids. In: Albanese, A.A., ed. **Newer methods of nutritional biochemistry**: with applications and interpretations. New York: Academic Press, 1963. v.1, p.84.

4. ADAMS, L.A.; ANGULO P.; LINDOR K.D. Nonalcoholic fatty liver disease. **Canadian Medical Association journal**, v. 172, p. 899–905, 2005a.

5. ADAMS, L.A. et al. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. **Journal of Hepatology**, v. 42, p. 132–138, 2005b.

6. ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of Human Nutrtion and Diet**, v. 14, p. 243–50, 2001.

7. ANESI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of Ilex paraguariensis. **Food Chemistry**, v. 97, p. 459-64, 2005.

8. ANJOS, L.A. **Obesidade e Saúde Pública**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2006. p.100.

9. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para Erva-Mate. Brasilia, DF, 1998.

10. ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, p. 186-190, 1994.

11. ARÇARI, D.P. et al. Antiobesity Effects of yerba maté Extract (Ilex paraguariensis) in High-fat Diet-induced Obese Mice. **Obesity**, v. 18, p. 2127-33, 2009.

12. ARÇARI, D.P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (Ilex paraguariensis) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, p. 110–115, 2011.

13. ARITA, Y. et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 257, p. 79–83, 1999.

14. ARKAN, M.C. et al. IKK-βlinks inflammation to obesity induced insulin resistance. Nature Medicine, v. 11, p. 191–198, 2005.

15. ASON, J. et al. ApoB siRNA-induced Liver Steatosis is Resistant to Clearance by the Loss of Fatty Acid Transport Protein 5 (Fatp5). Lipids, v. 46, p. 991–1003, 2011.

16. ASTRUP, A. et al. The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary meta-analysis of *ad libitum* low-fat dietary intervention. **British Journal of Nutrition**, v. 83, p. S25–S32, 2000.

17. BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. **Journal of Hepatology**, v. 51, p. 212–23, 2009.

18. BASARANOGLU, M.; KAYACETIN, S.; YILMAZ, N.; KAYACETIN, E.; TARCIN, O.; SONSUZ, A. Understanding mechanisms of the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 18, p. 2223-2236, 2010.

19. BASSOLI, B.K. et al.Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: Effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochemistry and Function,** v. 26, p. 320-328, 2008.

20. BASTOS, D.H.M.; TORRES, E.A.F.S. Bebidas a base de erva-mate (Ilex paraguarienses) e saude publica. Nutrire. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentacao e Nutricao**, v. 26, p. 77-89, 2003.

21. BASTOS, D.H.M. et al. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba mate (Ilex paraguarienses) beverages. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 91-95, 2005.

22. BASTOS, D.H. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (Ilex paraguariensis) and green tea (Camelia sinensis) extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423-432, 2007a.

23. BASTOS, D.H.M. et al. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 37-46, 2007b.

24. BERG, A.H.; SCHERER, P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 96, p. 939-949, 2005.

25. BERGSTRÖM, A. et al. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. **International Journal of Cancer**, v. 91, p. 421-430, 2001.

26. BEUTLER, B. ET AL. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 353-389, 2006.

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

28. BIXBY, M. et al. 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 Science**, v. 77, p. 345-358, 2005.

29. BOK, S. H. et al. Quercetin dehydrate and gallate supplements lower plasma and hepatic lipids and change activities of hepatic antioxidant enzymes in high cholesterol-fed rats. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 72, p. 161–169, 2002.

30. BOGARDUS, C. et al. Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. **American Journal of Physiology**, v. 248, p. e286–91, 1985.

31. BONORA, E. et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 68, p. *374–3*78, 1989.

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

33. BLACK, S.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. C-reactive Protein. **Journal of Chemical Biology**, v. 279, p. 48487–90, 2004.

34. BRACESCO, N. et al. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, p. 379–87, 2003.

35. BRADY, M.J.; NAIRN, A.C.; SALTIEL, A.R. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 272, p. 29698-703, 1997.

36. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. ***Obesidade***. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

37. BROWNING, J.D.; HORTON, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 114:147–152, 2004b.

38. BROWNING, J.D. et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, v. 40, p. 1387–1395, 2004a.

39. CAI, D. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nature Medicine**, v. 11, p. 183–190, 2005.

40. CALDWELL, S.H.; OELSNER, D.H.; IEZZONI, J.C.; HESPENHEIDE, E.E.; BATTLE, E.H.; DRISCOLL, C.J. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. **Hepatology**, v. 29, 29, p. 664-66, 1999.

41. CAMPOS, A.M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E.A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of Ilex paraguaryenses extracts and red wine. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 7, p. 43-49, 1996.

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

43. CARICILLI, A.M. Gut Microbiota Is a Key Modulator of Insulin Resistance in TLR 2 Knockout Mice. **PLoS Biology,** v. 9, n. 12, p. e1001212, 2011.

44. CAVE et al. Obesity, Inflammation, and the Potential Application of Pharmaconutrition. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 23, n. 1, p. 16-34, 2008.

45. CHUNG, T.W. et al. 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. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, p. 1670-1681, 2004.

46. CICUTTINI, F.M.; BAKER, J.R.; SPECTOR, T.D. The association of obesity with osteoarthritis of the hand and knee in women: a twin study. **Journal of Rheumatology**, v. 23, p. 1221–1226, 1996.

47. CHARLTON, M. et al. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 35, p. 898–904, 2002.

48. COHEN-LAHAV, M., A. Vitamin D decreases NF-Kappa B activity by increasing I Kappa B alpha levels . **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 4, p. 889-97, 2006.

49. CONSOLI, A. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. **Diabetes Care**, v. 15, p. 430–441, 1992.

50. CROOKE, R.M.; GRAHAM, M.J.; LEMONIDIS, K.M.; WHIPPLE, C.P.; KOO, S.; PERERA, R.J. n apolipoprotein B antisense oligonucleotide lowers LDL cholesterol in hyperlipidemic mice without causing hepatic steatosis. The **Journal of Lipid Research**, v. 46, p. 72-884, 2005.

51. CROSS, D.A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, p. 785-9, 1995.

52. DE MORAIS, E.C. et al. Consumption of Yerba Mate (Ilex paraguariensis) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8316–8324, 2009.

53. DE SOUZA, C.T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, p. 4192–99, 2005.

54. EHSES, J.A. et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, p. 2356–70, 2007.

55. FALCK-YTTER, Y. et al. Clinical features and natural history of non-alcoholic steatosis syndromes. **Seminars in Liver Disease***,* v. 21, p. 17-26, 2001.

56. FELDSTEIN, A.E. et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. **Hepatology**, v. 40, p. 185–194, 2004.

57. FAN, J.G. et al., en SY. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. **Journal of Hepatology,** n. 43, n. 508–514, 2005.

58. FERRANNINI, E. et al. The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin-dependent diabetes. **Metabolism**, v.47, p.79–85, 1988.

59. FERREIRA, F. et al. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the Ilex paraguariensis A. St. Hil. saponins. Phytotherapy Research, v. 11, p. 79–81, 1997.

60. FIELD, A.E. et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, p. 1581-1586, 2001.

61. FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1437–1446, 2000.

62. FILIP, R.; FERRARO, G.E. Researching on new species of "Mate": Ilex brevicuspis: phytochemical and pharmacology study. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 50-54, 2003.

63. FONG, D.G. et al. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. **Hepatology***,* v. 32, p. 3-10, 2000.

64. FLEGAL, K.M. et al. Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010**The Journal of American Medical Association**, v. 307, n. 5, p. 491-497*,* 2012.

65. FRAULOB, J.C. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease in C57BL/6 mice fed a high fat diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 46, p. 212-223, 2010.

66. FREIRE, R.D. et al. Dietary fat is associated with metabolic syndrome in Japanese Brazilians. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1779-85, 2005.

67. FRIEDEWALD, W.T; LEVI, R.I; FREDRICKSON, D.S. Estimation of theconcentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 499–502, 1972.

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

69. GAO, Z. et al. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. **Journal of Chemical Biology**, v.278, p.24944–24950, 2003.

70. GONZALEZ, A. et al. Biological screening of Uruguayan medicinal-plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 217–220, 1993.

71. GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 1905-14, 2007.

72. GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 415–445, 2011.

73. GRIFFIN, M.E. et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes,** v.48, p.1270–1274, 1999.

74. GRUNDY, S.M. Dietary fat: at the heart of the matter. **Science**, v. 293, p. 801–2, 2001.

75. GUARNER, F. Prebiotics in inflammatory bowel diseases. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. S85-89, 2007.

76. GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, p. 367–377, 2008.

77. HALL, R.K. et al. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. **Journal of Biology and Chemistry,** v. 275, p. 30169–75, 2000.

78. HALLEUX, C.M. et al. Hormonal control of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and production in human adipose tissue: stimulation by glucocorticoids and inhibition by catecholamines. **The Journal of Clinical and Endocrinology Metabolism**, v. 84, p. 4097–4105, 1999.

79. HÄMÄLÄINEN, M. et al. 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 of Inflammation**, v. 2007, p. 1-10, 2007.

80. HAN, L.K. et al. Saponins from *Platycodi radix* ameliorate high diet-induced obesity in mice. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2241-45, 2002.

81. HARRISON, S.A.; NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Clinics in Liver Disease**, v. 8, p. 861–879, 2004.

82. HARLOW, M.B.; LANE, D. In: *__Antibody__*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. P. 726.

83. HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, v. 132, p. 344–362, 2008.

84. HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, p.333–336, 2002.

85. HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba Mate Tea (Ilex paraguariensis): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. R138-151, 2007.

86. HEMMERLE, H. et al. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-translocase. Journal **of Medical Chemistry**, v. 40, p. 137–145, 1997.

87. HEO, M. et al. Depressive mood and obesity in US adults: comparison and moderation by sex, age, and race. **International Journal of Obesity**, v. 30, p. 513-519, 2006.

88. HERLING, A.W. et al. Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the hepatic glucose-6-phosphatase system. **American Jornal of Physiology**, v. 274, p. 1087-1093, 1998.

89. HOSTTETMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins**, University Press, Cambridge, New York, USA, 1995.

90. HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860–67, 2006.

91. HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell,** v.140, p. 900-17, 2010.

92. HOWARD, J.K; FLIER, J.S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCs proteins. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 365-71, 2006.

93. HSIEH, P.S. et al. COX-2-mediated Inflammation in Fat Is Crucial for Obesity-linked Insulin Resistance and Fatty Liver. **Obesity Journal**, v. 17, p. 1150-1157, 2009.

94. HUANG, D.; SHEN, S.; WU, J.S. Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7687–7692, 2009.

95. HUSSEIN G.M.E. et al. Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Promotes Satiety and Body Weight Lowering in Mice: Involvement of Glucagon-Like Peptide-1. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 12, p. 1849—1855, 2011.

96. IKEDA, I. et al. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1127, p. 141–146, 1992.

97. 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.

98. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: **despesas, rendimentos e condições de vida no Brasil.** Rio de Janeiro, 2004.

99. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: **antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil.** Rio de Janeiro, 2010.

100. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da extração vegetal e da silvicultura.** Disponível em:

http://www.ibgegovbr/home/estatistica/economia/pevs/2005/defaultshtm. 2005. Acesso em: 14 de abril 2010.

101. INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY (IASO). **Obesity: Understanding and challenging the global epidemic**. Report. London 2009-2010.

102. JAISWAL R.; SOVDAT T.; VIVIAN F.; KUHNERT N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (Ilex paraguariensis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p.5471-84, 2010.

103. JAROSLAWSKA, J et al. Polyphenol-rich strawberry pomace reduces serum and liver lipids and alters gastrointestinal metabolite formation in fructose-fed rats. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 10, p. 1777-83, 2011.

104. JENNEMANN, R. Hepatic glycosphingolipid deficiency and liver function in mice. **Hepatology,** v. 51, p. 1799-1809, 2010.

105. JOBGEN, W. et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. **Journal of Nutrition**, v.139, p.230-7, 2009.

106. KANAYA, A.M. et al. Adipocytokines and incident diabetes mellitus in older adults: the independent effect of plasminogen activator inhibitor 1. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, p. 350-356, 2006.

107. KATHIRVEL, E. et al. Betaine improves nonalcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: a potential mechanism for hepatoprotection by betaine. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 299, n. 5, p.1068-1077, 2010.

108. KAWAMOTO, E.M. et al. Amyloid beta-peptide activates nuclear factor-kappaB through an N-methyl-D-aspartate signaling pathway in cultured cerebellar cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, p. 845-860, 2008.

109. KEIJZERS, G.B. et al. Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. **Diabetes Care**, v. 25, p. 364–369, 2002.

110. KEROUZ, N.J.; HORSCH, D.; PONS, S.; KAH, R. Differential Regulation of Insulin Receptor Substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and Phosphatidylinositol 3-Kinase Isoforms in Liver and Muscle of the

Obese Diabetic (ob/ob) Mouse. The American Society for Clinical Investigation, v. 100, n. 12, p. 3164-3172, 1997.

111. KIDO, Y., et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 2, p. 199-205, 2000.

112. KISHINO, E. et al. 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. **Journal of Nutrition**, v.136, p.433-9, 2006.

113. KOHLER, H.P.; GRANT, P.J. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. **The New England Journal Of Medicine**, v. 342, p. 1792–1801, 2000.

114. KOLIWAD, S.K. et al. DGAT1- dependent triacylglycerol storage by macrophages protects mice from diet-induced insulin resistance and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 756–767, 2010.

115. KOSHIHARA, Y.; NEICHI, T.; MUROTA, S.; LAO, A.; FUJIMOTO, Y.; TATSUNO, T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 792, p. 92–97, 1984.

116. KLEIN, G.A. et al. Mate Tea (Ilex paraguariensis) Improves Glycemic and Lipid Profiles of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes Individuals: A Pilot Study. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 320–332, 2011.

117. KRAEMER, K.H.; TAKETA, A.T.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from Ilex paraguariensis. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1119–1122, 1996.

118. KUBOTA, N. et al. Dynamic Functional Relay between Insulin Receptor Substrate 1 and 2 in Hepatic Insulin Signaling during Fasting and Feeding**. Cell Metabolism**, v. 8, p. 49–64, 2008.

119. LEBRUN, P.; VAN OBBERGHEN, E. SOCs proteins causing trouble in insulin action. **Acta of Physiology,** v. 192, p. 29-36, 2008.

120. 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.

121. LEVY-COSTA, R.B. et al. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 530-540, 2005.

122. LI, Q.; VERMA, I.M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, p. 725-34, 2002.

123. LI, Z.Z. et al. Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearoyl-CoA desaturase. **Journal of Chemical Biology**, v. 284, p. 5637–5644, 2009.

124. LIAO, J. et al. Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 273, p. 27320–4, 1998.

125. LIU, S.C.H. et al. Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 274, p. 18093–9, 1999.

126. LONGATO, L. et al. High fat diet induced hepatic steatosis and insulin resistance: Role of dysregulated ceramide metabolism. **Hepatology Research**, Article first published online: 16 DEC 2011DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00934.x, 2011.

127. MCPHERSON, S. et al. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Gut**, v. 59, p. 1265–1269, 2010.

128. MACHADO, R.M. et al. Intake of trans Fatty Acids Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Reduces Adipose Tissue Fat Content. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 6, p. 1127-1132, 2010.

129. MACKAY, I.R. Hematoimmunology: a perspective. **Immunology Cellular Biology**, v.80, p.36-44, 2002.

130. MADEC, S; CORRETTI, V.; SANTINI, E.; FERRANNINI, E.; SOLINI, A. Effect of a fatty meal on inflammatory markers in healthy volunteers with a family history of type 2 diabetes. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 106, n. 3, p. 364-8, 2011.

131. MARCHESINI, G. et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. **American Journal of Medicine**, v. 107, p. 450-55, 1999.

132. MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 50, p. 1844-50, 2001.

133. MARTINS, F. et al. Consumption of mate tea (Ilex paraguariensis) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 527–532, 2009.

134. MARTINS, F. et al. Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 18, p. 42-7, 2010.

135. MATTHEWS, D.; HOSKER J.; RUDENSKI, A.; NAYLOR B.; TREACHER D.; TURNER R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-419, 1985.

136. MATSUNAMI, Y.S. et al. Regulation of synthesis and oxidation of fatty acids by adiponectin receptors (AdipoR1/R2) and insulin receptor substrate isoforms (IRS-1/-2) of the liver in a nonalcoholic steatohepatitis animal model. **Metabolism Clinical and Experimental**, 2010.

137. MATSUZAWA, Y. et al. Adiponectin and metabolic syndrome. **Arteriosclerosis and Thrombosis Vascular Biology**, v. 24, p. 29-33, 2004.

138. MAVRI, A. et al. Subcutaneous abdominal, but not femoral fat expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is related to plasma PAI-1 levels and insulin resistance and decreases after weight loss. **Diabetologia**, v. 44, p. 2025–203, 2001.

139. MAZZAFERA, P. Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake**.** **Food Chemistry**, v. 60, p. 67-71, 1997.

140. 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**, v. 59, n. 8, p. 1092-105, 2010.

141. MERTENS, I. et al. Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 30, p. 1308-14, 2006.

142. MICHALANY, J. **Técnica histológica em Anatomia Patológica, com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. São Paulo, EPU, 1980, 277 p.

143. MICHALUART, P. et al. 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 Research**, v. 59, p. 2347–2352, 1999.

144. MILAGRO, F.I.; CAMPIÓN, J.; MARTÍNEZ, J.A. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. **Obesity**, v. 14, n. 7, p. 1118-23, 2006.

145. MILNER, K.L. et al. Adipocyte fatty acid binding protein levels relate to inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 49, p. 1926–1934, 2009.

146. MIRZOEVA, O.K.; YAQOOB, P.; KNOX, K.A.; CALDER, P.C. Inhibition of ICE family cysteine proteases rescues murine lymphocytes from lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis. **FEBS Letters**, v. 396, p. 266–270, 1996.

147. MONDINI, L.; MONTEIRO, C.A. Relevância epidemiológica da desnutrição e da obesidade em distintas classes sociais: métodos de estudo e aplicação à população brasileira. **Revista Brasileira de Epidemiologia,** v. 1, p. 28-29, 1998.

148. MONETTI, M. et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. **Cell Metabolism**, v. 6, p. 69–78, 2007.

149. MONTEIRO, C.A. et al., Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. *In*: MONTEIRO, C.A. **Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças.** São Paulo : Hucitec, 1995. p. 247-255.

150. MONTEIRO, C.M. et al. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 5–13, 2010.

151. MOSIMANN, A.L.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E.L. Aqueous extract of Ilex paraguarienses attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, v. 26, p 59-70, 2006.

152. MUSSO, G. et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 909-16, 2003.

153. NAKATANI Y. et al. Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. **Journal of Chemical Biology**, v. 279, n. 44, p. 45803-45809, 2004.

154. NARDINI, M. et al. Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 722–733, 2001.

155. NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS (NCHS). **Vital Health Stat Series nº2 (138)**. 2005. Disponível em: www.cdc.gov/nchs/data/series/sr_02/sr02_138.pdf. Acesso em: 14 de Maio 2010.

156. NELS, C. et al. Circulating Levels of TNF-_ Are Associated with Impaired Glucose Tolerance, Increased Insulin Resistance, and Ethnicity: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Journal of Clinical and Endocrinolology Metabolism**, v. 97, n. 3, p 1-9, 2012.

157. OLEFSKY, J.M; GLASS, C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annual Review of Physiology,** v. 72, p. 219-46, 2010.

158. OLMOS, A. et al. Interaction of dicaffeoylquinic derivatives with peroxynitrite and other reactive nitrogen species. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 475, p. 66-71, 2008.

159. OPALA, T. et al. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-basedweight loss formula on bodyweight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **European Journal of Medicine Research**, v. 11, p. 343–50, 2006.

160. OPIE, L.H.; WALFISH, P.G. Plasma free fatty acid concentrations in obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 268, p. 757-60, 1963.

161. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. **Report**. Geneva, 2000. (WHO - Technical Report Series, 894).

162. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. **Report**. Geneva, 2003. (WHO - Technical Report Series, 916).

163. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **WHO Fact Files: Ten facts on obesity.** Geneva: WHO. 2010. Disponível em: http://www.who.int/features/ factfiles/obesity/en/index.html. Acesso em: 16 de janeiro 2012.

164. OUCHI, N. et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NFkappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. **Circulation,** v. 102, p. 1296-301, 2000.

165. 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**, v. 476, p. 178–185, 2008.

166. PARKER, J. C. et al. Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. **Diabetes,** v. 47, p. 1630-36, 1998.

167. PENA, M.; BACALLAO, J. La obesidad en la pobreza: un problema emergente en las Américas. In: Peña M, Bacallao J, editores. **La obesidad en la pobreza: un nuevo reto para la salud pública**. [Publicação científica nº 576]. Washington, D.C.: OPAS; 2000.

168. PÉREZ PÉREZ, A. et al. Obesity and cardiovascular disease. Public Health Nutrition, v. 10, p. 1156-1163, 2007.

169. PITTLER, M.H.; ERNST, E. Dietary supplements forbody-weight reduction: a systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 529–36, 2004.

170. Poonawala, A.; Nair, S.P.; Thuluvath, P.J. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a casecontrol study. **Hepatology**, v. 32, p. 689-692, 2000.

171. POMILIO, A.B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A.A. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of Ilex paraguariensis using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 235-241, 2002.

172. POUDYAL H.; CAMPBELL, F.; BROWN, L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, highfat-fed rats. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 5, p. 946-53, 2010.

173. PRADHAN, A.D. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and the risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 286, p. 327–34, 2001.

174. PRASAD, C.N. et al. Gallic acid induces GLUT4 translocation and glucose uptake activity in 3T3-L1 cells. **FEBS Lett**, v. 584, p. 531–536, 2010.

175. PUANGPRAPHANT, S.; DE MEJIA, E.G. Saponins in yerba mate tea (Ilex paraguar- iensis A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through

NFkappaB pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8873–8883, 2009.

176. QATANANI, M.; LAZAR, M.A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. **Genes Development**, v. 21, p. 1443-1455, 2007.

177. RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology,** v. 43, suppl.1, p.S54–S62, 2006.

178. RADZIUK, J.; PYE, S. The role of the liver in insulin action and resistance. In: REAVEN, G.M.; LAWS, A. **Insuline Resistance – the Metabolic Syndrome X.** New Jersey, Ed. Humana Press. 1999. p. 197-220.

179. RATZIU V. et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. **Hepatology**, v. 35, p. 1485-1493, 2002.

180. 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**, v.123, p.1939-1951, 1993.

181. RIBANI M.; BOTTOLI C.; COLLINS C.; JARDIM I.; MELO L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

182. ROBERTS, C.K.; BARNARD, R.J. Effects of exercise and diet on chronic disease. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, p. 3-30, 2005.

183. RODRIGUEZ DE SOTILLO, D.V.; HADLEY, M. J. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. **Nutrition Biochemistry**, v. 13, p. 717-26, 2002.

184. ROTHER, K. I. *et al.* Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. **Journal of Chemical Biology,** v. 273, p. 17491–17497, 1998.

185. 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**, v. 25, p. 1157-68, 2009.

186. SAGHIZADEH, M. et al. The expression of TNF αby human muscle. Relationship to insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, p. 1111–16, 1996.

187. SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799–806, 2001.

188. SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends of Cellular Biology**, v.12, p.65–71, 2002.

189. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. In: **Molecular cloning**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p. 174-184.

190. SANYAL, A.J. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance. **Gastroenterology***,* v. 120, p. 1183–92, 2001.

191. SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J.C.; MOSCA, S.M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitricoxide-dependentmechanism. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 360–62, 2005.

192. SEPPÄLÄ-LINDROOS A. et al. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 7, p. 3023-8, 2002.

193. SHAO, W., et al. Curcumin Prevents High Fat Diet Induced Insulin Resistance and Obesity via Attenuating Lipogenesis in Liver and Inflammatory Pathway in Adipocytes. **Public Library of Science One**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2012.

194. SHEN, L. et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey. **World Journal of Gastroenterology***,* v. 9, p. 1106–1110, 2003.

195. SHIMOMURA, I.; MATSUDA, M.; HAMMER, R.E.; BASHMAKOY, Y.; BROWN, M.S.; GOLSTEIN, J.L. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Mollecular Cell**, v. 6, n. 1, p. 77-86, 2000.

196. SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, p.1793–1801, 2006.

197. SIRONI, A.M. et al. Impact of increased visceral and cardiac fat on cardiometabolic risk and disease. **Diabetic Medicine**, doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03503.x., 2011.

198. SLOOP, K.W. et al. Specific reduction of hepatic glucose 6-phosphate transporter-1 ameliorates diabetes while avoiding complications of glycogen storage disease. **Journal of Biology and Chemistry***,* v. 282, p. 19113 – 19121, 2007.

199. SMITH, B.W.; ADAMS, L.A. Non-alcoholic fatty liver disease. *Critical* **Reviews in Clinical Laboratory Sciences,** v. 48, n. 3, p. 97–113, 2011.

200. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, Sup. I, 2007.

201. SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKKβ: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. **Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, p. 2596–2611, 2010.

202. STEHOUWER, C.D. et al. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. **Diabetes**, v. 51, p. 1157–1165, 2002.

203. STUMVOLL, M.; HRING, H. Resistin and adiponectin of mice and men. **Obesity Research**, v. 10, p.1197–1199, 2002.

204. STEIN, C.J.; COLDITZ, G.A. The epidemic of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p. 2522-2525, 2004.

205. STUNKARD, A.J. Factores determinantes de la obesidad: opinión actual. In: Peña M, Bacallao J, editores. **La obesidad en la pobreza: un nuevo reto para la salud pública**. [Publicação científica nº 576]. Washington, D.C.: OPAS; 2000.

206. SULLIVAN, P.W et al. Obesity, inactivity, and the prevalence of diabetes and diabetes-related cardiovascular comorbidities in the U.S., 2000-2002. **Diabetes Care**, v. 28, p. 1599-1603, 2005.

207. TACKE, F.; LUEDDE, T.; TRAUTWEIN, C. Inflammatory Pathways in Liver Homeostasis and Liver Injury. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 36, p. 4–12, 2009.

208. TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews of Molecular Cellular Biology**, v. 7, p.85–96, 2006.

209. TALLMAN, D.L.; TAYLOR, C.G. Effects of dietary fat and zinc on adiposity, serum leptin and adipose fatty acid composition in C57BL/6J mice. **Journal of Nutrition Biochemestry**, v. 14, p. 17-23, 2003.

210. TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Molecular Medicine**, v. 14, p. 222–31, 2008.

211. TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology,** v. 52, p. 1836-1846, 2010.

212. TOBAR, N. et al. Diacerhein Improves Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity in Mice on a High-Fat Diet. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4080–4093, 2011.

213. TORRES, D.M.; HARRISON, S.A. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1682–1698, 2008.

214. TUNCMAN, G. et al. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 10741–10746, 2006.

215. UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C.R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Mollecular and Cellular Biology**, v. 24, p. 5434–5446, 2004.

216. U.S. DEPARTAMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Q2B **Validation of Analytical Procedures: Methodology** In: FDA, editor. International Conference on Harmonization (ICH); Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, p. 1-10, 1996.

217. UCHIDA, Y. et al. Cellular carbonyl stress enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in rat white adipocytes via reactive oxygen speciesdependent pathway. **Journal of Chemical Biology**, v. 279, p. 4075–4083, 2003.

218. UNGER, R.H.; SCHERER, P.E. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM,** v. 21, p. 345–352, 2010.

219. VANDERJAGT, T.J. et al. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. **Life Science**, v. 70, p. 1035–1040, 2002.

220. VICHAIWONG, K. et al. Attenuation of oxidant-induced muscle insulin resistance and p38 MAPK by exercise training. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 593–599, 2009.

221. VOLETI, B.; AGRAWAL. A. Regulation of basal and induced expression of C-reactive protein through an overlapping element for OCT-1 and NF-kB on the proximal promoter. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3386–90, 2005.

222. WADA, T. et al. Spironolactone Improves Glucose and Lipid Metabolism by Ameliorating Hepatic Steatosis and Inflammation and Suppressing Enhanced Gluconeogenesis Induced by High-Fat and High-Fructose Diet**. Endocrinology**, v. 151, p. 2040-49, 2010.

223. WAGNER E.F.; NEBREDA, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 8, p. 537-49, 2009.

224. WANG, S.; NOH, S.K.; KOO, S.I. Epigallocatechin gallate and caffeine differentially inhibit the intestinal absorption of cholesterol and fat in ovariectomized rats. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 2791–2796, 2006.

225. 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***,* v. 298, p. 634-642, 2010.

226. WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigatio**, v. 112, p. 1796–808, 2003.

227. WEST, D.B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. S505-512, 1998.

228. WHITE, M.F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Mollecular and Cellular Biology,** v. 182, p. 3-11, 1998.

229. WITHERS, D.J. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, p. 900-904, 1998.

230. WICK, M.J.; LEITHAUSER, F.; REIMANN, J. The hepatic immune system. **Critical Reviews in Immunology**, v. 22, p. 47-103, 2002.

231. WILLETT, W.C., ASCHERIO, A. Health effects of *trans*fatty acids. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 4, p.1006S-1010S, 1995.

232. WILSON, P.W. et al. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. **Archives of Internal Medicine**, v. 162, p. 1867-1872, 2002.

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

234. YAHAGI, N. et al. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 277, p. 19353-19357, 2002.

235. YAMAUCHI, R. et al. Coffee and caffeine ameliorate hyperglycemia, fatty liver, and inflammatory adipocytokine expression in spontaneously diabetic KK-A ymice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5597–5603, 2010.

236. YEH, Y. et al. Dietary caffeic acid, ferulic acid and coumaric acid supplements on cholesterol metabolism and antioxidant activity in rats. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 17, p. 123–132, 2009.

237. ZAHLTEN, R.N.; ROGOFF, T.M., STEER, C.J. Isolated Kupffer cells, endothelial cells and hepatocytes as investigative tools for liver research. **Federation Proceedings**, v. 40, p. 2460-2468, 1981.

238. ZHANG, Z. et al. Functional Proteomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rat Models: Enoyl–Coenzyme A Hydratase Down-Regulation Exacerbates Hepatic Steatosis. **Hepatology**, v. 51,1190-1199, 2010.

239. YAHAGI, N. et al. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in *Lep(ob)/Lep(ob)* mice. **Journal of Biology and Chemistry,** v. 277, p. 19353-357, 2002.

240. ZAPOROZHETS, O.A. et al. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 21–25, 2004.

241. ZELBER-SAGI, S. et al. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures**. Liver International***,* v. 26, p. 856–863, 2006.

242. ZICK, Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 268, p. 4, 2005.

CURRÍCULO LATTES

Patrícia Silva Jacob

Graduada pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (2009). Especializada em Nutrição em Cardiologia pelo Instituto do Coração do Hospital das Clinicas da Universidade de São Paulo (2010). Atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (2012). Tem experiências na área de Bioquímica da Nutrição, atuando principalmente nos seguintes temas: obesidade e doenças crônicas não-transmissíveis; obesidade e inflamação; inflamação e resistência à ação da insulina. **(Texto informado pelo autor)**

Última atualização do currículo em 07/02/2012
Endereço para acessar este CV:
http://lattes.cnpq.br/3089760760673668

Certificado pelo autor em 07/02/12

Dados pessoais

Nome Patrícia Silva Jacob

Nome em citações bibliográficas JACOB, Patrícia Silva;Jacob, Patrícia

Sexo Feminino

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

Formação acadêmica/Titulação

2010 Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeito da ingestão de dieta hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (Ilex paraguarienses) sobre a expressão de proteínas envolvidas na resposta inflamatória e na regulação da via de sinalização da insulina no fígado de ratos Wistar, *Orientador:* Marcelo Macedo Rogero.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ,FAPESP ,Brasil .
Palavras-chave: Resistência à insulina; Obesidade; Inflamação; erva-mate.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Nutrição.

2009 - 2010 Especialização em Nutrição Hospitalar em Cardiologia .
Hospital das Clínicas de São Paulo.
Título: Estado Nutricional de Coronariopatas em Pré-Operatório de Revascularização do Miocárdio e sua Correlação com Síndrome Metabólica, Fatores Socioeconômicos e Estilo de Vida.
Orientador: Maria Lucia Mendes Bruno.
Bolsista do(a): Fundação do Desenvolvimento Administrativo .

CURRÍCULO LATTES

Marcelo Macedo Rogero

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 (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. Tem experiência nas áreas de Bioquímica e Imunologia da Nutrição e Bioquímica do Exercício físico, atuando principalmente nos seguintes temas: Nutrigenômica e Inflamação; Bioquímica de Proteínas e de Aminoácidos; Metabolismo da Glutamina em Leucócitos; e Exercício Físico e Metabolismo de Macronutrientes.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 29/02/2012
Endereço para acessar este CV:
http://lattes.cnpq.br/6607279993080828

Certificado pelo autor em 29/02/12

Dados pessoais

Nome Marcelo Macedo Rogero

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

Sexo Masculino

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

Formação acadêmica/Titulação

2007 - 2008 Pós-Doutorado .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ,FAPESP ,Brasil .
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Nutrição / *Subárea:* Nutrigenômica.

2003 - 2007 Doutorado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeito do desmame precoce e da suplementação com glutamina, in vitro e in vivo, sobre a funcionalidade de macrófagos peritoniais e o estado nutricional de camundongos, *Ano de Obtenção:*2007. .