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

**Efeito da ração hiperlipídica e do extrato
aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)
sobre a composição corporal e sobre a
resposta inflamatória de macrófagos
peritoniais de ratos *Wistar***

Maria Carolina Borges

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

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

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

São Paulo

2011

Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de ratos *Wistar*

Maria Carolina Borges

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

Área de Concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo

2011

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 mãe, Walderez, a figura da primeira e mais pura forma de amor que já conheci.

Agradecimentos

A Deus pela presença constante e por todos os ensinamentos.

À minha mãe, Walderez, e ao meu irmão, João, pelo amor incondicional dispensado por toda a minha existência.

À minha “família de coração”, Flávia, Cristina e Itamar, por compartilharem comigo os momentos de maior alegria e de maior dificuldade.

Ao meu pai, Amaury, *in memoriam*, pela breve e marcante participação em minha vida.

À tia Fany, tia Dulce, vó Lyse (*in memoriam*) e Vá pela sabedoria, pelo conforto e pelo carinho.

Ao Thiago, grande companheiro, por todo o amor, amparo e incentivo durante esta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Marcelo, por acreditar em mim e por me ensinar coisas que eu jamais aprenderia com um livro.

À Professora Primavera, um grande exemplo.

Aos professores que despertaram em mim a paixão por aprender: Vera, Ligia, Sílvio, Sílvia, Bayardo, André, Marcelo, Patrícia Jaime e Carlos Monteiro.

À amiga Ivanir, pelo grande carinho e pelo exemplo de luta e perseverança.

Às amigas Patty, Tati e Moniquinha por dividirem comigo os ônus e os bônus em todo o processo.

Aos colaboradores, Prof. Ricardo, Profa. Primavera, Prof. Julio, Prof. Rui Curi e Profa. Deborah, por abrirem as portas para o projeto.

Às amigas Karina, Amanda e Mariana pela solidariedade.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Bioquímica da Nutrição, representados por Léo, Lucas e Emídio, pelos conselhos e pelo apoio.

Aos alunos do Laboratório de Hematologia, Grazi, Luciana e Mayara, pela ajuda e pela paciência.

Àqueles que me auxiliaram na padronização das técnicas de Biologia Molecular: Marco, Martina, Lucas, William e Hosana.

Às Professoras Ana Campa e Marília pelas inestimáveis contribuições no momento da pré-banca.

Às queridas amigas, Bruna, Nati, Renata e Verônica, pela alegria e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Medicina Tropical e da Faculdade de Saúde Pública pela gentileza, atenção e prontidão.

À FAPESP pela minha bolsa de mestrado e pelos recursos financeiros que viabilizaram esta pesquisa.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Borges MC. Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de ratos *Wistar* [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.

Resumo

Introdução - A inflamação está envolvida na patogênese da síndrome metabólica e de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Em macrófagos, a modulação da expressão gênica de mediadores inflamatórios está, em grande parte, sob o controle do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), cuja atividade é modulada por diversos compostos bioativos presentes em alimentos. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contém compostos bioativos, como o ácido cafeico, o *kaempferol*, a quercetina e o ácido 3,5-dicafeoilquínico, que apresentam a capacidade de reduzir a ativação do NF- κ B *in vitro* em macrófagos. **Objetivo** - Investigar os efeitos da ração hiperlipídica (HL) e da ingestão do extrato aquoso de erva-mate sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de ratos *Wistar*. **Métodos** - Ratos *Wistar*, machos, foram submetidos à ração controle (n= 36) ou ração HL (n= 36) por 12 semanas. Após esse período, 12 animais de cada grupo foram eutanasiados, enquanto o restante foi distribuído em grupos que receberam ou não, por gavagem, o extrato aquoso de erva-mate durante o período de quatro semanas. Os resultados relativos ao efeito da ração HL foram comparados pelo test t de Student não pareado ou seu equivalente não-paramétrico (Mann-Whitney). Para a análise do efeito da erva-mate, utilizou-se a análise de variância

(ANOVA, post-hoc de Tukey) ou seu equivalente não-paramétrico (teste de Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn). Adotou-se como nível de significância $p < 0,05$. **Resultados** - Após 12 semanas, o consumo de ração HL resultou em aumento significativo do ganho de peso, de gordura corporal e do índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) ($p < 0,05$). Não foi observada alteração dos biomarcadores sistêmicos de inflamação, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , a interleucina (IL)-6 e o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI)-1. Em relação aos ensaios envolvendo macrófagos peritoniais, observou-se capacidade reduzida de síntese de IL-1 β , IL-6, óxido nítrico (NO) e IL-10 nas células dos animais com ração HL, quando estimuladas com LPS ($p < 0,05$). Tal fenômeno foi acompanhado por diminuição da fosforilação da quinase do inibidor do κ B (IKK)- β , da degradação do inibidor do κ B (I κ B)- α e da ativação do NF- κ B ($p < 0,05$). A ingestão do extrato aquoso de erva-mate atenuou o ganho de peso e de gordura corporal e reduziu as concentrações plasmáticas de insulina, TNF- α e IL-6 ($p < 0,05$). Não foi observado efeito do extrato aquoso de erva-mate sobre os parâmetros relativos à resposta inflamatória de macrófagos peritoniais. **Conclusões** - O consumo crônico da ração HL resultou em redução da capacidade de síntese de mediadores inflamatórios por macrófagos peritoniais estimulados com LPS, o que foi acompanhado por redução da ativação da via de sinalização do NF- κ B. Embora a ingestão de erva-mate não tenha influenciado a resposta inflamatória dos macrófagos, houve redução do percentual de gordura corporal e de marcadores de risco cardiometabólico, sugerindo potencial benefício da ingestão do extrato aquoso de erva-mate na redução do risco de DCNT.

Palavras-chave: Inflamação; Macrófagos; Ração hiperlipídica; Fator nuclear-kappa B; Erva-mate; Ratos

Borges MC. Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de ratos *Wistar*. / Effect of high-fat diet and yerba mate aqueous extract (*Ilex paraguariensis*) on body composition and on inflammatory response of peritoneal macrophages in Wistar rats [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.

Abstract

Introduction – Inflammation is involved in the pathogenesis of metabolic syndrome and non communicable chronic diseases (NCCD). In macrophages, the nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) controls the gene expression of many inflammatory mediators and its activity can be regulated by several food bioactive compounds. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) contains bioactive compounds such as caffeic acid, *kaempferol*, quercetin and 3,5-dicaffeoylquinic acid, which can reduce NF- κ B activity in macrophages *in vitro*. **Objective** – To investigate the effects of high fat diet (HFD) and yerba mate consumption on body composition and on the inflammatory response of peritoneal macrophages of Wistar rats. **Methods** - Male Wistar rats were fed control diet or HFD (n = 36) for 12 weeks. After this period, 12 animals from each group were euthanized, while the remaining was distributed in groups that received, or not, by gavage, yerba mate aqueous extract for four weeks. Data related to the effect of HFD were analysed by unpaired t test or the equivalent nonparametric test (Mann-Whitney). Concerning the analysis of Yerba mate effect, the analysis of variance (ANOVA, Tukey post-hoc) or the equivalent nonparametric test (Kruskal-Wallis, Dunn post-hoc) was used. The level of significance adopted

was $p < 0.05$. **Results** – After 12 weeks, the consumption of HFD increased weight gain, body fat and HOMA (Homeostasis Model Assessment) index ($p < 0.05$). There were no differences in systemic inflammatory biomarkers, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, and plasminogen activator inhibitor (PAI)-1. Concerning the essays involving peritoneal macrophages, the capacity of synthesis of IL-1 β , IL-6, nitric oxide (NO) and IL-10 was reduced in the cells of HFD-fed animals, when stimulated with lipopolysaccharides (LPS). Furthermore, a decrease in κ B inhibitor kinase (IKK)- β phosphorylation, in κ B inhibitor (I κ B)- α degradation and in NF- κ B activation was observed ($p < 0.05$). The ingestion of yerba mate aqueous extract lowered weight gain and body fat and reduced plasma insulin, TNF- α and IL-6 ($p < 0.05$). No effect of yerba mate was observed in parameters related to peritoneal macrophages inflammatory response. **Conclusions** – The chronic consumption of HFD led to a diminished capacity of synthesizing inflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages, which was associated to a decrease in NF- κ B signaling pathway activation. Although yerba mate did not influence peritoneal macrophages inflammatory response, it caused a reduction in body fat and in cardiometabolic risk biomarkers, suggesting a potential benefit of yerba mate for NCCD risk reduction.

Keywords: Inflammation; Macrophages; High-fat diet; Nuclear factor-kappa B; Yerba mate; Rats

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 REVISÃO DA LITERATURA	18
1.2 JUSTIFICATIVA	38
2. OBJETIVO	40
2.1 OBJETIVO DA ETAPA 1	40
2.2 OBJETIVO DA ETAPA 2	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	42
3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	49
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	52
3.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARCAÇA	53
3.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS	54
3.6 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	55
3.7 AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF-KB) EM MACRÓFAGOS PERITONIAIS ATIVADOS COM LPS	55
3.8 ENSAIO <i>WESTERN BLOTTING</i>	56
3.9 ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA RETARDADA EM GEL DE POLIACRILAMIDA	59
3.10 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 E NO <i>EX VIVO</i>	61
3.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RNAm POR PCR EM TEMPO REAL	62
3.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA CELULAR EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS	64
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
4. RESULTADOS	66
4.1 RESULTADOS REFERENTES AO EFEITO DA RAÇÃO HIPERLIPÍDICA	66
4.2 RESULTADOS REFERENTES À SUPLEMENTAÇÃO COM ERVA-MATE	84
5. DISCUSSÃO	111
5.1 EFEITO DA RAÇÃO HIPERLIPÍDICA	111
5.2 EFEITO DA INGESTÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE	126
6. CONCLUSÃO	130
7. REFERÊNCIAS	131
CURRÍCULO LATTES MARIA CAROLINA BORGES	154
CURRÍCULO LATTES MARCELO MACEDO ROGERO	155

Lista de Tabelas

Tabela 1 –	Composição das rações experimentais segundo valor energético	43
Tabela 2 –	Identificação dos compostos fenólicos do chá mate por cromatografia líquida de ultra-eficiência/espectrometria de massas (CLUE-ESI/MS)	85
Tabela 3 –	Parâmetros de validação do método analítico (CLUE-DAD) para caracterização do chá mate solúvel: precisão intra e interdia para tempo de retenção e área dos picos, limite de detecção e limite de quantificação	86
Tabela 4 –	Quantificação dos compostos fenólicos e da cafeína presentes no extrato solúvel de erva-mate	87
Tabela 5 –	Resumo dos resultados da etapa de avaliação do efeito da ração hiperlipídica	105
Tabela 6 –	Resumo dos resultados da etapa de avaliação do efeito da ração hiperlipídica e dos lipopolissacarídeos sobre macrófagos peritoniais	107
Tabela 7 –	Resumo dos resultados da etapa de avaliação do efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate	108
Tabela 8 –	Resumo dos resultados da etapa de avaliação do efeito da ração hiperlipídica, do extrato aquoso de erva-mate e dos lipopolissacarídeos sobre macrófagos peritoniais	110

Lista de Figuras

Figura 1 -	Vias de ativação do fator nuclear κ B	30
Figura 2 -	Principais classes de compostos bioativos presentes no extrato de erva-mate	34
Figura 3 -	Delineamento experimental	46
Figura 4 -	Síntese das determinações realizadas	51
Figura 5 -	Consumo médio diário de ração (Etapa 1)	67
Figura 6 -	Consumo total de ração (Etapa 1)	68
Figura 7 -	Curva de peso e ganho de peso corporal (Etapa 1)	69
Figura 8 -	Peso do coxim adiposo periepídídimo e retroperitoneal e soma desses coxins (Etapa 1)	71
Figura 9 -	Peso do coração, do fígado e dos músculos gastrocnêmio e sóleo (Etapa 1)	72
Figura 10 -	Quantificação relativa de umidade, lipídeos, massa magra, proteína e cinzas (Etapa 1)	73
Figura 11 -	Concentração sanguínea de glicose e insulina e índice de HOMA-IR (<i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>) (Etapa 1)	74
Figura 12 -	Concentração plasmática de inibidor do ativador do plasminogênio-1, fator de necrose tumoral- α e interleucina-6 (Etapa 1)	75
Figura 13 -	Contagem de células viáveis, mononucleares, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos no lavado peritoneal (Etapa 1)	78
Figura 14 -	Concentração de interleucina-1 β , interleucina-6, fator de necrose tumoral- α , óxido nítrico e interleucina-10 e razão entre fator de necrose tumoral- α e interleucina-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais (Etapa 1)	79
Figura 15 -	Expressão relativa de interleucina-1 β , interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α em macrófagos peritoneais (Etapa 1)	80

Figura 16 -	Ativação do NF- κ B em macrófagos peritoniais (Etapa 1)	81
Figura 17 -	Fosforilação da quinase do inibidor κ B (IKK)- β , expressão da proteína IKK- β e razão entre IKK- β fosforilada e IKK- β total de macrófagos peritoniais (Etapa 1)	82
Figura 18 -	Fosforilação do inibidor κ B (I κ B)- α , expressão da proteína I κ B- α e razão entre I κ B- α fosforilado e I κ B- α total de macrófagos peritoniais (Etapa 1)	83
Figura 19 -	Cromatograma CLUE-DAD (λ = 324 nm) com compostos fenólicos presentes no chá mate (Etapa 2)	84
Figura 20 -	Cromatograma CLUE-DAD (λ = 272 nm) com identificação da cafeína presente no chá mate (Etapa 2)	86
Figura 21 -	Consumo médio diário de ração (Etapa 2)	89
Figura 22 -	Consumo total de ração (Etapa 2)	90
Figura 23 -	Curva de peso e ganho de peso corporal (Etapa 2)	91
Figura 24 -	Peso dos coxins adiposos periepididimal, retroperitoneal e soma desses coxins (Etapa 2)	92
Figura 25 -	Peso do coração, do fígado e dos músculos gastrocnêmio e sóleo (Etapa 2)	93
Figura 26 -	Quantificação relativa de umidade, lipídeos, massa magra, proteína e cinzas (Etapa 2)	95
Figura 27 -	Concentração sanguínea de glicose e de insulina e índice HOMA-IR (<i>Homeostasis Assessment Model – Insulin Resistance</i>) (Etapa 2)	96
Figura 28 -	Concentração plasmática de inibidor do ativador do plasminogênio-1, fator de necrose tumoral- α e interleucina-6 (Etapa 2)	97
Figura 29 -	Contagem de células viáveis, mononucleares, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos no lavado peritoneal (Etapa 2)	100
Figura 30 -	Concentração de interleucina-1 β , interleucina-6, fator de necrose tumoral- α , óxido nítrico e interleucina-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoniais (Etapa 2)	101

Figura 31 -	Ativação do NF- κ B de macrófagos peritoniais (Etapa 2)	102
Figura 32 -	Fosforilação da quinase do inibidor κ B (IKK)- β , expressão da proteína IKK- β e razão entre IKK- β fosforilada e IKK- β total de macrófagos peritoniais (Etapa 2)	103
Figura 33 -	Fosforilação do inibidor κ B (I κ B)- α , expressão da proteína I κ B- α e razão entre I κ B- α fosforilado e I κ B- α total de macrófagos peritoniais (Etapa 2)	104

Siglas Utilizadas

5-CQA	ácido 5-cafeoilquínico
ACC	acetil-CoA carboxilase
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
Akt ou PKB	quinase de serina/treonina ou proteína quinase B
AMPK- α	proteína quinase ativada por AMP- α
ANOVA	análise de variância
AP-1	proteína ativadora-1
ATP	adenosina trifosfato
CBA	compostos bioativos
CCR2	<i>CC receptor 2</i>
ChIP	imunoprecipitação da cromatina
CLUE	cromatografia líquida de ultra-eficiência
COX	ciclo-oxigenase
CPT-1	carnitina-palmitoil transferase-1
CSF-1 ou M-CSF	fator de crescimento específico de macrófagos
DAD	detector de arranjo de diodos
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Eletrophoretic Mobility Shift Assay</i>
EN	extrato nuclear
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
ET	extrato total
ETA	efeito térmico dos alimentos
Fiaf	Fator adiposo induzido pelo jejum
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT 4	proteína transportadora de glicose 4
HL	hipelipídica
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
I κ B	inibidor do NF- κ B
IKK	quinase do inibidor do kappaB
IL	interleucina
IL-1R	receptor de IL-1

IMC	índice de massa corporal
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IRAK	quinase associada ao receptor de IL-1
IRS-1	substrato do receptor de insulina-1
JNK-1	<i>c-jun N-terminal kinase-1</i>
LCK	proteína com atividade tirosina quinase
LD	limites de detecção
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LBP	proteína ligadora de LPS
LPS	lipopolissacarídeos
LQ	limites de quantificação
MAGUK	quinase guanilato associada à membrana
MALT-1 e BCL-10	proteínas associadas ao linfoma do tecido linfóide associado à mucosa
MAP	proteína ativada por mitógenos
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	proteína quimiotática para monócitos-1
MD-2	proteína acessória extracelular
MEKK3	MAP/ERK quinase quinase 3
MHC II	complexo principal de histocompatibilidade II
MMP-9	metaloproteinase da matriz-9
MyD88	proteína adaptadora citoplasmática
NF-κB	fator nuclear-κB
NO	óxido nítrico
ONU	Organização das Nações Unidas
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio-1
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PE	ficoeritrina
PG	prostaglandinas
PKCθ	proteína quinase C θ
PPAR	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
RIP	quinase serina/treonina de interação com receptor
SAA	proteína sérica amiloide A
SIM	<i>single ion monitoring</i>
TAB1	proteína ligadora de TAK1
TAK1	quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento β
TCR	receptor de células T

TIR	domínio Toll/IL-1R
TLR	receptores do tipo Toll
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
TNFR1	receptor 1 do TNF
TL	tolerância ao LPS
TR	tempo de retenção
TRAF	fator associado ao receptor de TNF
TRADD	receptor de TNF associado via domínio da morte
UCP	proteínas desacopladoras
ZAP70	proteína quinase associada à cadeia ξ

1. INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT): Relação com a Dieta

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são uma ameaça à saúde pública e ao desenvolvimento humano (SCHMIDT et al., 2011). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que as DCNT correspondem a 48% da carga global de doenças, expressa por anos perdidos de vida saudável. Enquanto, no passado, as DCNT acometiam, sobretudo, países ricos, 80% das mortes ocorrem, atualmente, em países de baixa e média renda (WHO, 2005). No Brasil, em 2007, aproximadamente 72% das mortes foram atribuídas às DCNT (doenças cardiovasculares, neoplasias, diabetes, doenças respiratórias crônicas, nefropatias, dentre outras), 10% às doenças infecciosas e 5% aos distúrbios de saúde materno-infantis (SCHMIDT et al., 2011).

Além do reconhecido impacto na qualidade de vida e na mortalidade, o aumento da carga das DCNT nos países de baixa e média renda contribui para ampliar a pobreza e a desigualdade social. Aliado a isso, representa grande barreira ao crescimento econômico e ao cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento para o Milênio, propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU) (UN, 2002; WHO, 2005; STUCKLER et al., 2010; WORLD ECONOMY FORUM, 2011). As doenças cardiovasculares, por exemplo, geram o maior custo referente a internações hospitalares no sistema de saúde brasileiro (SCHMIDT et al., 2011).

A manifestação das DCNT frequentemente ocorre após décadas do início da exposição a seus fatores de risco e é precedida por um grupo de complexas alterações biológicas, como, por exemplo, obesidade visceral,

resistência à ação da insulina, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica, nomeadas em conjunto de síndrome metabólica (ALBERTI et al., 2009). Apesar de as evidências apontarem os componentes da síndrome metabólica como elementos-chave da história natural das DCNT, o conhecimento da fisiopatologia e da terapêutica dessas condições ainda apresenta muitas lacunas (TSCHOP e HEIMAN, 2001; BUETTNER et al., 2007).

O aumento da prevalência de síndrome metabólica e das DCNT no Brasil e em outros países em desenvolvimento está relacionado a uma rápida transição demográfica, que produziu uma pirâmide etária com maior proporção de adultos e idosos. Paralelamente, fatores como o crescimento da renda, a industrialização, a mecanização da produção agrícola e industrial, o maior acesso a alimentos e a globalização levaram à disseminação do “estilo de vida ocidental”, que resulta na adoção de um grupo de comportamentos de risco comuns à maioria das DCNT, a exemplo do tabagismo, do sedentarismo, do etilismo e dos hábitos alimentares não saudáveis (POPKIN, 2001; YUSUF et al., 2004).

No que se refere à alimentação, dados históricos e antropológicos evidenciam que alterações marcantes nos hábitos alimentares dos seres humanos tiveram início há 10.000 anos, com o advento da agricultura e da domesticação animal. Posteriormente, a Revolução Industrial provocou uma alteração profunda no modo de produção de alimentos, o que se refletiu em aumento da oferta e do grau de processamento dos gêneros alimentícios (CORDAIN et al., 2005; OMENN, 2010). Nesse contexto, as sociedades contemporâneas parecem convergir para um padrão alimentar denominado “dieta ocidental”, caracterizado pelo consumo de alimentos com elevada densidade energética, o que é parcialmente resultante do elevado conteúdo de lipídeos desses alimentos (DU et al., 2002; WHO, 2003; ROBERTS e BARNARD, 2005). A alta quantidade de lipídeos na dieta está associada ao elevado consumo de ácidos graxos saturados, *trans* e poliinsaturados ômega-6 (WHO, 2003; IBGE, 2004). Esse fato é particularmente relevante, tendo em vista a participação desses ácidos graxos na resposta inflamatória,

condição envolvida na patogênese de diversas DCNT (GALLI e CALDER, 2009; KENNEDY et al., 2009)

Nas áreas metropolitanas do Brasil, com base em dados de disponibilidade domiciliar de alimentos, evidenciou-se, nas últimas três décadas, um aumento do consumo de lipídeos totais e de ácidos graxos saturados, aliado ao baixo consumo de frutas e hortaliças e à diminuição do consumo de cereais e leguminosas (IBGE, 2004; LEVY-COSTA et al., 2005). Esse fato é, em parte, reflexo de um substancial aumento da aquisição de alimentos altamente processados, que detêm elevada densidade energética e alto conteúdo de açúcar e de ácidos graxos saturados e trans (MONTEIRO et al., 2011). Essa alteração no padrão alimentar da população brasileira é consistente com a participação crescente das DCNT no perfil de morbimortalidade do país e, particularmente, com o aumento da prevalência do excesso de peso (IBGE, 2004; LEVY-COSTA et al., 2005).

1.1.2 Interface entre Metabolismo e Sistema Imune: Implicação para as DCNT

Dentre as características essenciais à sobrevivência da espécie humana, destacavam-se a capacidade de resistir a períodos de privação alimentar e a doenças infecciosas. A primeira característica favoreceu a seleção de indivíduos com elevada eficiência energética e com alta capacidade de estocar calorias em períodos de oferta de alimentos. A segunda privilegiou a sobrevivência de organismos capazes de elaborar uma resposta imune efetiva contra patógenos, especialmente em períodos de mortalidade massiva, como em epidemias e pandemias (HOTAMISLIGIL, 2006). Tais características evolutivas, em um ambiente marcado pelo suprimento alimentar contínuo e abundante e pelo sedentarismo, podem contribuir para o desenvolvimento de disfunções metabólicas e imunológicas

presentes em indivíduos com síndrome metabólica, que aumentam o risco de ocorrência de DCNT.

Historicamente, o estudo da imunologia e do metabolismo foi segregado em disciplinas distintas. Contudo, há, atualmente, um crescente corpo de evidências na literatura científica de que os processos metabólicos e imunológicos sejam integrados por vias de sinalização que guardam relação causal com disfunções orgânicas, como a resistência à ação da insulina e a obesidade (HOTAMISLIGIL e ERBAY, 2008; MATHIS e SHOELSON, 2011). Cabe ainda ressaltar que as células com participação central no metabolismo e na resposta inflamatória têm diversas características em comum no que se refere à sua funcionalidade (HOTAMISLIGIL e ERBAY, 2008). Isso pode ser exemplificado pelo fato de que tanto macrófagos, quanto adipócitos são ativados por lipopolissacarídeos (LPS) e têm a capacidade de secretar citocinas (CHARRIERE et al., 2003; CHUNG et al., 2006), fato que está relacionado com o quadro inflamatório característico das DCNT.

A partir da década de 1990, começaram a surgir evidências de que a obesidade resulta em um quadro inflamatório, que está diretamente envolvido na etiologia de doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2 e certos tipos de câncer (EMILSSON et al., 2008). Nesse contexto, no ano de 1993, HOTAMISLIGIL et al. observaram que roedores geneticamente obesos, como camundongos db/db e ob/ob e ratos fa/fa, apresentavam aumento da expressão gênica do fator de necrose tumoral (TNF)- α no tecido adiposo e que esse fato estava relacionado à redução da captação periférica de glicose. Soma-se a isso o fato de que a neutralização dessa citocina com anticorpos anti-TNF- α atenuou o quadro de resistência à ação da insulina.

A resposta inflamatória clássica representa uma reação aguda à infecção ou à lesão tecidual, que tende a caminhar para a resolução e para a homeostase (MEDZHITOV, 2008). Todavia, o processo inflamatório observado na obesidade e na síndrome metabólica difere da resposta inflamatória clássica em muitos aspectos. A inflamação metabólica ou metainflamação, como proposta por HOTAMISLIGIL et al. (2006), não

envolve os sinais e os sintomas clássicos da inflamação (dor, rubor, tumor e calor). Tal processo inflamatório manifesta-se de forma sistêmica e caracteriza-se por uma reação crônica e de baixa intensidade. Aliado a isso, seu desenvolvimento está intimamente relacionado com o estilo de vida, particularmente com a qualidade da dieta e com a prática de atividade física (EGGER e DIXON, 2009, 2010).

O desenvolvimento da metainflamação tem sido atribuído a uma rede vasta e integrada de vias de sinalização intracelulares, em que se destacam duas proteínas: a quinase do inibidor do kappaB (IKK)- β e a *c-jun N-terminal kinase* (JNK)-1. A IKK- β e a JNK-1 promovem a indução da síntese de mediadores inflamatórios em diversos tipos celulares (ARKAN et al., 2005; SOLINAS et al., 2007). A ativação da IKK- β e da JNK-1 culmina na ativação do fator nuclear (NF)- κ B e da proteína ativadora (AP)-1, respectivamente, os quais translocam para o núcleo celular e ativam a transcrição de diversos genes que codificam mediadores inflamatórios, como a interleucina (IL)-1 β , a IL-6 e o TNF- α . Alguns desses mediadores inflamatórios, como a IL-1 β e o TNF- α , ligam-se a receptores na membrana plasmática da célula, o que resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares, que ativam a IKK- β e a JNK-1, fato que promove a continuidade dessa reação inflamatória, a qual tem sido implicada em condições como a aterogênese e a resistência à ação da insulina (ARKAN et al., 2005; SOLINAS et al., 2007; GAREUS et al., 2008).

A principal origem dessa resposta inflamatória sistêmica está no tecido adiposo, o qual produz uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas, denominadas adipocinas, como a IL-1 β , a IL-6, o TNF- α e a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1 (CANCELLO e CLEMENT, 2006). Contudo, atualmente, sabe-se que há outros tecidos que também estão envolvidos na inflamação, como o fígado (CAI et al., 2005), o pâncreas (EHSES et al., 2007), o hipotálamo (DE SOUZA et al., 2005) e o músculo esquelético (VARMA et al., 2009).

Apesar de os estudos comprovarem, à exaustão, o envolvimento de um quadro pró-inflamatório em condições como obesidade, resistência à ação

da insulina e aterosclerose, há evidências de que indivíduos obesos e com DCNT apresentam prejuízo da resposta imune inata, inclusive da resposta inflamatória, frente a um processo infeccioso (KARLSSON e BECK, 2010; SCHMIDT et al., 2011). O reconhecimento de patógenos e a consequente secreção de mediadores inflamatórios pelas células do sistema imune inato são fatores críticos para a elaboração de uma resposta imune efetiva e consequente eliminação do agente patogênico. Sendo assim, disfunções na resposta inflamatória das células da imunidade inata podem aumentar o risco e a gravidade de infecções (KARLSSON e BECK, 2010).

Estudos em seres humanos corroboram esses resultados. Indivíduos hospitalizados com índice de massa corporal (IMC) superior a 30 kg/m² têm maior risco de desenvolver infecções secundárias e complicações como sepse, pneumonia, bacteremia e infecções cutâneas. Aliado a isso, pacientes obesos apresentam maior incidência de infecções pós-cirúrgicas, aumento do tempo de internação hospitalar e maior risco de morte (CHOBAN et al., 1995; CHOBAN e FLANCBAUM, 1997; CALLE et al., 1999). Recentemente, a obesidade grau 3 (IMC > 40 kg/m²) foi considerada como um fator de risco independente para a mortalidade e para a gravidade da infecção por influenza na pandemia do vírus H1N1 (MORGAN et al., 2010).

Em roedores com obesidade induzida pela dieta, constatou-se redução da imunocompetência na vigência de infecções virais e bacterianas (AMAR et al., 2007; SMITH et al., 2007). Nesse contexto, camundongos obesos infectados pelo vírus *influenza* apresentaram redução da citotoxicidade de células *natural killer*, retardo na indução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL1- β , IL-6 e TNF- α), além de aumento de mais de seis vezes na mortalidade decorrente da infecção (SMITH et al., 2007). Soma-se a isso o fato de que a infecção por *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), bactéria Gram-negativa associada a quadros de periodontite, resulta em maior perda óssea alveolar e em redução da resposta inflamatória em camundongos submetidos à ração hiperlipídica (HL) (AMAR et al., 2007).

1.1.3 Macrófago como Célula Central das Disfunções Metabólica e Imunológica presentes nas DCNT

Os macrófagos exercem papel de destaque na homeostase, não apenas na resposta contra patógenos, mas também na remoção de debris celulares e no remodelamento e reparo tecidual. Essas células apresentam distribuição ubíqua nos tecidos e grande especialização de suas funções dependendo da localização anatômica (MOSSER e EDWARDS, 2008). Macrófagos têm a capacidade de expressar variados padrões de citocinas, moléculas de superfície e enzimas em resposta a diferentes estímulos e microambientes. Esse fato está relacionado à grande diversidade de fenótipos assumidos por essas células, o que se reflete em diversos subtipos especializados de macrófagos, como, por exemplo, osteoclastos, células de Kupffer, macrófagos peritoniais, dentre outros (GORDON e TAYLOR, 2005).

A constatação de que há aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo branco de camundongos geneticamente obesos ou submetidos à ração HL possibilitou notório avanço no entendimento da relação entre obesidade/consumo de ração HL e inflamação (DAVIS et al., 2008; MURANO et al., 2008). Estudos demonstram que macrófagos correspondem a cerca de 40% do total de células do tecido adiposo branco em camundongos e em humanos obesos, em comparação a apenas 18% nos controles magros (LUMENG et al., 2007a).

No tecido adiposo branco, a expressão da MCP-1 correlaciona-se positivamente com a adiposidade, sendo maior no tecido adiposo visceral em relação ao tecido adiposo subcutâneo (CANCELLO e CLEMENT 2006; CAVE et al., 2008). O receptor para a MCP-1, CCR2 (*CC receptor 2*), é expresso em monócitos presentes no sangue periférico e em macrófagos do tecido adiposo. Isso implica que a obesidade favoreça o processo de migração de monócitos do sangue para o tecido adiposo visceral de indivíduos obesos, que se diferenciam em macrófagos, sendo este processo

regulado por fatores estimuladores de colônia, como o fator de crescimento específico de macrófagos, nomeado CSF-1 ou M-CSF (FERRANTE, 2007).

Macrófagos do tecido adiposo branco comumente contribuem para a síntese de diversas citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estudos demonstram que há relação causal entre presença de macrófagos no tecido adiposo e sensibilidade à ação da insulina, sendo que a inibição do recrutamento de macrófagos para esse tecido melhora o quadro de resistência à ação da insulina em modelos animais (KANDA et al., 2006; WEISBERG et al., 2006; LUMENG et al., 2007a). Macrófagos murinos reduzem a expressão da proteína transportadora de glicose 4 (GLUT 4) e do substrato do receptor de insulina (IRS)-1 em cocultura com adipócitos, sendo este fato parcialmente reversível pela neutralização com anticorpos anti-TNF- α (LUMENG et al., 2007c).

O uso de camundongos *knockout* para IKK- β e JNK-1 em células mieloides tem apontado para o papel central dos macrófagos na resposta inflamatória crônica característica da obesidade e de estados de resistência à ação da insulina. Quando submetidos à ração HL, esses animais apresentam acúmulo ectópico de lipídeos no fígado e nas fibras musculares e tornam-se igualmente obesos (quando comparados aos controles selvagens), mas não desenvolvem intolerância à glicose. Soma-se a isso o fato de que esses animais apresentam redução da infiltração de macrófagos no tecido adiposo branco e redução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo, no fígado e no músculo esquelético (ARKAN et al., 2005; SOLINAS et al., 2007).

O conhecimento acerca do papel dos macrófagos na inflamação característica dos estados de obesidade e de resistência à ação da insulina advém de estudos envolvendo macrófagos infiltrados no tecido adiposo (KANDA et al., 2006; WEISBERG et al., 2006; FERRANTE, 2007; LUMENG et al., 2007a; CAVE et al., 2008; DAVIS et al., 2008; MURANO et al., 2008). Contudo, considerando que grande parte do conhecimento atual sobre a biologia de macrófagos é proveniente do estudo de macrófagos peritoniais, torna-se relevante a investigação do comportamento dessas células em

indivíduos obesos ou em roedores alimentados com ração HL (GHOSN et al., 2010). Além disso, o uso de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal apresenta importantes vantagens de ordem prática, como o fácil acesso e a possibilidade de obter quantidades expressivas de células.

Nesse contexto, macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à ração HL, quando expostos a LPS oriundos da bactéria Gram-negativa da *P. gingivalis*, apresentam reduzida capacidade de síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , bem como diminuição da capacidade de ligação do NF- κ B em regiões promotoras de genes que codificam as citocinas IL-10 e TNF- α (AMAR et al., 2007). Desse modo, é possível que, além da relevante implicação no desenvolvimento do quadro inflamatório crônico, macrófagos também participem da disfunção imunológica manifestada em processos infecciosos em camundongos alimentados com ração HL.

1.1.4 Macrófagos e a Via de Sinalização do Fator Nuclear kappa B (NF-KB)

O sistema imune inespecífico de mamíferos utiliza duas distintas estratégias para o reconhecimento de microrganismos. A primeira estratégia é baseada no reconhecimento de modelos moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* — PAMP), os quais são produtos do metabolismo microbiano conservados ao longo da evolução das espécies e distribuídos amplamente entre os patógenos. Por exemplo, o modelo molecular de LPS é comum para todas as bactérias Gram-negativas, porém não é produzido pelo hospedeiro (MUSHEGIAN e MEDZHITOV, 2001; TSAN e GAO, 2004).

Receptores do sistema imune inato que reconhecem PAMP são denominados receptores de reconhecimento de modelos, os quais induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo que ativam mecanismos de defesa antimicrobianos do hospedeiro, como a síntese de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. O reconhecimento dos PAMP também pode levar à indução das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 na superfície de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (FUJIHARA et al., 2003; KAWAI e AKIRA, 2005). A indução das moléculas coestimulatórias, juntamente com a apresentação de pequenos peptídeos antigênicos ligados ao complexo principal de histocompatibilidade II (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) na membrana das células apresentadoras de antígeno para linfócitos T CD4⁺, acopla o reconhecimento de patógenos pela imunidade inata com a ativação das respostas imunes adaptativas (MUSHEGIAN e MEDZHITOV, 2001).

O sistema imune inato reconhece PAMP por meio de receptores do tipo Toll (TLR), que compreendem uma família de proteínas transmembrânicas, que desempenham papel fundamental na defesa do hospedeiro (KAWAI e AKIRA, 2010). Os TLR são membros da superfamília do receptor de IL-1 (IL-1R) e apresentam significativa homologia em suas regiões citoplasmáticas, como o domínio Toll/IL-1R (TIR). Foram identificados, respectivamente, dez e doze TLR funcionais em humanos e em camundongos, sendo os TLR1 a 9 conservados na maioria das espécies. Os TLR podem ser divididos em dois grandes grupos com base em sua localização celular e no tipo de PAMP ligante. Um grupo é composto de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11, que são expressos na membrana citoplasmática e que reconhecem, principalmente, componentes da membrana microbiana, como lipídeos, lipoproteínas e proteínas. O outro grupo é representado por TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, exclusivamente expressos em vesículas intracelulares, como retículo endoplasmático, endossomos, lisossomos e endolisossomos, onde reconhecem ácidos nucleicos de vírus e bactérias (KAWAI e AKIRA, 2010, 2011).

A principal função das proteínas TLR está relacionada ao controle das respostas inflamatórias e imunológicas. Como outros receptores de reconhecimento de antígenos, TLR medeia o reconhecimento de uma variedade de PAMP microbianos. O primeiro TLR caracterizado em humanos foi o TLR-4, o qual é expresso predominantemente em células do sistema imune, incluindo macrófagos e células dendríticas (MEDZHITOV et al., 1997; KAWAI e AKIRA, 2010, 2011).

LPS é um componente estrutural integral e predominante da membrana externa de bactérias Gram-negativas, além de representar um dos mais potentes iniciadores microbianos da inflamação (DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002). O LPS é um complexo glicolípídico composto de um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico denominado lipídio A. O LPS ativa monócitos e macrófagos para produzirem citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, as quais, por sua vez, atuam como mediadores endógenos da inflamação por meio de interações mediadas por receptores com diversas células alvo (BEUTLER e RIETSCHER, 2003). Macrófagos também secretam, em resposta ao LPS, vasta gama de outros mediadores biológicos, incluindo fator de ativação plaquetária, prostaglandinas, enzimas e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como anion superóxido e óxido nítrico (NO), respectivamente. A síntese de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores biológicos por monócitos e macrófagos contribui para o eficiente controle do crescimento e disseminação de patógenos que eventualmente tenham invadido o organismo (FUJIHARA et al., 2003).

O LPS oriundo de bactérias Gram-negativas inicialmente liga-se a uma proteína, presente no sangue ou no espaço extracelular, denominada proteína ligadora de LPS (*LPS-binding protein* — LBP). A LBP facilita a ligação do LPS na superfície da célula à molécula CD14, uma proteína que está ancorada à bicamada lipídica por meio de um grupo glicofosfatidilinositol e que está presente na maioria das células, porém, não está presente no endotélio. O CD14 pode também existir como uma proteína solúvel e, nesse caso, carrear o LPS para a superfície celular

(TRANTAFILOU M e TRIANTAFILOU K, 2005; ANAS et al., 2010). A molécula de CD14 não apresenta domínios transmembrânicos e intracelulares e, desse modo, não pode isoladamente iniciar o processo de transdução de sinal. Uma vez que o LPS liga-se ao CD14, o LBP dissocia-se e o complexo LPS-CD14 fisicamente associa-se com o receptor do tipo TLR4 (FUJIHARA et al., 200; KAWAI e AKIRA, 2010, 2011). O TLR4 necessita de uma molécula adicional, a MD-2 (proteína acessória extracelular), que forma um complexo com o domínio extracelular do TLR4 para o efetivo reconhecimento do LPS (TRANTAFILOU M e TRIANTAFILOU K, 2002).

Aliada à ativação do receptor do tipo TLR-4 induzida pelo LPS, verifica-se que ácidos graxos saturados — que compõem parte significativa da “dieta ocidental” — diretamente ativam receptores do tipo TLR-4 e, conseqüentemente, promovem aumento da atividade do NF- κ B (LEE et al., 2001).

O reconhecimento por TLR de PAMP dispara a associação dependente do domínio do receptor Toll/IL-1 (TIR) com adaptadores contendo o domínio TIR, incluindo MyD88 (proteína adaptadora citoplasmática), TIRAP-MAL, TRIF-TRICAM1 e TRAM-TRICAM2. A associação do TLR4 e MyD88 recruta membros da família quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK); dois membros, IRAK4 e IRAK1, são sequencialmente fosforilados, o que promove a sua dissociação a partir do complexo receptor e posterior associação deles com o fator associado ao receptor de TNF (TRAF)-6. A TRAF6 ativa quinases da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), as quais podem promover a ativação da AP-1 por meio da MAPK (BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2005) (**Figura 1**).

Figura 1 - Vias de ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B)

Extraído de LI e VERMA (2002).

A atividade do NF- κ B é estimulada por diversas vias, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e sinalização mediada por receptores presentes em linfócitos T (TCR). As quinases IKK1 e IKK2 (também denominadas IKK- α e IKK- β , respectivamente) e o modulador essencial da subunidade regulatória do NF- κ B (NEMO) (também denominado IKK- γ) formam o ponto de convergência das três vias. (ERK = quinase regulada por sinal extracelular; I κ B = Inibidor do NF- κ B; IKK = quinase inibidora do I κ B; IRAK = quinase do receptor de interleucina 1; LCK = proteína com atividade tirosina quinase; MD-2 = proteína acessória extracelular; MALT-1 e BCL-10 = proteínas associadas ao linfoma do tecido linfoide associado à mucosa; MAP = proteína ativada por mitógenos; MEKK3 = MAP/ERK quinase quinase 3; MAGUK = quinase guanilato associada à membrana; MYD88 = proteína adaptadora citoplasmática; PKC θ = proteína quinase C θ ; RIP = quinase serina/treonina de interação com receptor; TLR4 = receptor do tipo Toll 4; TNFR1 = receptor 1 do TNF; TRAF2 = fator 2 associado ao receptor de TNF; TRAF6 = fator 6 associado ao receptor de TNF; TAB1 = proteína ligadora de TAK1; TAK1 = quinase ativada pelo fator de transformação do crescimento β ; TRADD = receptor de TNF associado via domínio da morte; ZAP70 = proteína quinase associada à cadeia ξ).

No citoplasma de células não estimuladas, o NF- κ B — que se apresenta na forma de dímero — encontra-se inativado devido à sua associação com proteínas denominadas inibidores κ B (I κ B). A família de proteínas I κ B inclui I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3 e as regiões carboxi-terminais do NF- κ B₁ (p105) e NF- κ B₂ (p100). As proteínas I κ B ligam-se, com diferentes afinidades e especificidades, aos dímeros do NF- κ B. Portanto, além da existência de diferentes dímeros de NF- κ B em um tipo celular específico, há também grande número de combinações entre o I κ B e os dímeros do NF- κ B (CAAMANO e HUNTER, 2002; KAWAI e AKIRA, 2010, 2011).

O TRAF6 promove a ativação do complexo I κ B quinases (IKK) (BEUTLER, 2004; KAWAI e AKIRA, 2005). Esse complexo é composto de duas subunidades catalíticas IKK- α e IKK- β e uma subunidade regulatória IKK- γ e induz a fosforilação do I κ B. A fosforilação dos I κ B resulta na sua poliubiquitinação, a qual, por sua vez, acarreta na sua degradação mediada pelo proteasoma 26S, o que permite, desse modo, que o fator de transcrição NF- κ B transloque para o interior do núcleo celular e ative a transcrição de diversos genes dependentes do κ B, como genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (**Figura 1**). O NF- κ B também promove a estimulação da síntese do I κ B, uma vez que a região promotora do gene que codifica para o I κ B contém sítios funcionais para o NF- κ B. Desse modo, o I κ B recém-sintetizado liga-se ao NF- κ B e suprime a sua atividade (FUJIHARA et al., 2003; KAWAI e AKIRA 2005, 2010, 2011).

Em mamíferos, a família de fatores de transcrição NF- κ B apresenta cinco membros: NF- κ B₁ (p105/p50), NF- κ B₂ (p100/p52), RelA (p65), RelB e c-Rel, os quais podem se dimerizar para formar homodímeros e heterodímeros, que estão associados a respostas específicas para diferentes estímulos e efeitos diferenciais sobre a transcrição. NF- κ B₁ (p50) e NF- κ B₂ (p52) não apresentam domínios de ativação transcricional — e seus homodímeros atuam como repressores. Por outro lado, Rel-A, Rel-B e c-Rel carregam domínios de ativação transcricional e, com exceção do Rel-B, esses são capazes de formar homodímeros e heterodímeros com os outros membros dessa família de proteínas. Consequentemente, o balanço entre os

diferentes homodímeros e heterodímeros do NF- κ B regula o nível de atividade transcricional. Cabe ressaltar que essas proteínas são expressas em um modelo específico celular e tecidual, que acarreta em um nível adicional de regulação. Por exemplo, NF- κ B₁ (p50) e RelA são amplamente expressas e, desse modo, o heterodímero p50/RelA constitui o mais comum indutor da atividade de ligação do NF- κ B (CAAMANO e HUNTER, 2002; LI e VERMA, 2002).

1.1.5 Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore da família das aquifoliáceas, originária de uma região subtropical da América do Sul, composta pelo sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. Seu uso teve início com populações nativas da região (Guaraníes) e, atualmente, é consumida de forma regular por milhões de pessoas, com ingestão média diária de um litro (BASTOS et al., 2007a; BRACESCO et al., 2010). A partir da erva-mate costuma-se fazer três diferentes tipos de bebidas: o chimarrão, o tererê e o chá mate. Tanto o chimarrão quanto o tererê são preparados com as folhas secas do mate verde, sendo o chimarrão preparado com água quente e o tererê, com água fria, enquanto o chá mate é produzido a partir da infusão da erva-mate que sofreu processo prévio de torrefação (BASTOS et al., 2007a, 2007b; HECK e DE MEJIA, 2007). Na região sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), o chimarrão é parte integrante da cultura popular e é consumido por cerca de 70% dos habitantes do gênero masculino (BRACESCO et al., 2010). Cabe ressaltar que o Brasil é o segundo maior produtor mundial de mate, tendo produzido cerca de 218.000 toneladas de folhas no ano de 2009 (IBGE, 2009).

Apesar de sua importância socioeconômica e cultural, o potencial terapêutico da erva-mate começou a ser investigado de forma sistemática

somente nos últimos 15 anos. Dentre os efeitos benéficos da ingestão de chá mate sobre a saúde, destacam-se os efeitos hipocolesterolêmico, hepatoprotetor (FILIP e FERRARO, 2003), estimulante do sistema nervoso central, diurético (GONZALEZ et al., 1993), antioxidante (FILIP et al., 2000; VANDERJAGT et al., 2002) e anti-inflamatório (ARCARI et al., 2009, 2011). Estudos *in vitro* demonstram que a atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate é semelhante ao extrato de chá verde (CHANDRA e DE MEJIA, 2004; BASTOS et al., 2007b). Além disso, a administração *in vivo* da infusão de erva-mate, de forma aguda ou crônica, reduz a oxidação do DNA e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a peroxidação lipídica, bem como melhora a capacidade antioxidante, por meio do aumento do estado antioxidante total do plasma e da expressão gênica das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (GUGLIUCCI, 1996; MIRANDA et al., 2008; MARTINS et al., 2009; MATSUMOTO e BASTOS, 2009).

Em roedores submetidos à ração HL, a administração *in vivo* do extrato aquoso de erva-mate resulta em redução da gordura corporal e em melhora da tolerância à glicose, do perfil lipídico e do acúmulo de gordura ectópica no fígado (PANG et al., 2008; ARCARI et al., 2009, 2011), o que está associado à redução da expressão gênica de proteínas com ação pró-inflamatória no fígado (TNF- α , IL-6 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS)) e no tecido adiposo (TNF- α , IL-6, MCP-1 e CCR2), bem como ao aumento da expressão gênica de proteínas com ação anti-inflamatória no tecido adiposo (adiponectina e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)- γ) (MIRANDA et al., 2008; MARTINS et al., 2009; ARCARI et al., 2009, 2011).

Numerosos compostos bioativos (CBA) têm sido identificados no chá mate, que podem ser responsáveis pelos seus efeitos benéficos à saúde. Entre estes, destacam-se os cafeoil-derivados (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico), flavonoides (quercetina, rutina e *kaempferol*), metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina), taninos e numerosas saponinas triterpênicas, que são derivadas do ácido ursólico e conhecidas

como matesaponinas (KRAEMER et al., 1996; POMILIO et al., 2002; ZAPOROZHETS et al., 2004). Cabe ressaltar que a concentração de polifenóis na erva-mate é superior à do chá verde e similar àquela encontrada em vinhos tintos (BIXBY et al., 2005), sendo os cafeoil-derivados os principais responsáveis pela capacidade antioxidante do chá mate (HECK e DE MEJIA, 2007) (**Figura 2**).

Figura 2 – Principais classes de compostos bioativos presentes no extrato de erva-mate (*I.paraguariensis*)

* ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico

** quercetina, rutina e *kaempferol*

1.1.6 Erva-mate e Modulação da Resposta Inflamatória de Macrófagos

Verifica-se que determinados compostos fenólicos presentes na erva-mate apresentam capacidade modulatória sobre a resposta inflamatória. Dentre estes compostos, destacam-se os ácidos clorogênicos, que inibem a síntese *in vitro* de TNF- α e de IL-6 por células mononucleares do sangue periférico de seres humanos, mediante estímulo com exotoxinas de estafilococos (KOSHIHARA et al., 1984; KRAKAUER, 2002). Ainda, o ácido cafeico reduz a ativação do NF- κ B, bem como a atividade das enzimas 5-lipoxigenase, 12-lipoxigenase e ciclo-oxigenase (COX)-2, as quais estão envolvidas na síntese de eicosanoides, como prostaglandinas (PG), tromboxanos e leucotrienos. Esse CBA também atua como potente e seletivo inibidor da transcrição e da atividade da metaloproteinase da matriz (MMP)-9, que tem sido associada com a progressão e invasão do câncer (KOSHIHARA et al., 1984; MIRZOEVA et al., 1996; MICHALUART et al., 1999; NARDINI et al., 2001; CHUNG et al., 2004). Os ácidos dicafeoilquínicos, também presentes no chá mate, apresentam a capacidade de diminuir a expressão das enzimas iNOS e COX-2, bem como de reduzir a atividade transcricional do NF- κ B (OLMOS et al., 2008).

Kaempferol e quercetina diminuem a ativação do NF- κ B, reduzindo a expressão do mRNA e da proteína da iNOS, bem como a produção de NO a partir de macrófagos estimulados com LPS (HAMALAINEN et al., 2001). Além disso, a quercetina induz redução da síntese de TNF- α a partir de macrófagos estimulados com LPS e interferon- γ (WANG e MAZZA, 2002). Cabe ainda destacar que CBA presentes na erva-mate podem modular a expressão gênica do PPAR- α , que exerce modulação transrepressional sobre o NF- κ B (DE BOSSCHER et al., 2006). Nesse contexto, LI et al. (2009) demonstraram que a injeção intraperitonal de ácido clorogênico (80

mg/kg de peso corporal), por oito semanas, em roedores submetidos à ração HL, aumentou a expressão gênica do PPAR- α no fígado.

No ano de 2009, foi publicado o primeiro estudo *in vitro* que comparou o efeito isolado de diversos CBA presentes na erva-mate em macrófagos. Células RAW 264.7 foram incubadas com LPS (1 μ g/mL) e com ácido clorogênico, quercetina, mateína, matesaponinas, ácido ursólico ou ácido oleanólico por 24 horas. O CBA com maior impacto na redução da produção de NO e de PGE₂ e da expressão de iNOS e COX-2 foi a quercetina, seguida das saponinas, o que foi associado à redução de cerca de 50% da atividade transcricional do NF- κ B. Aliado a isso, observou-se que a administração combinada de alguns CBA, em proporções similares às observadas no chá mate, resultava em sinergia ou antagonismo na modulação da resposta inflamatória de macrófagos. Nesse sentido, a adição conjunta de quercetina e de matesaponinas resultou em um efeito sinérgico na redução da síntese de NO e PGE₂. Por outro lado, a combinação de ácido clorogênico com matesaponinas ou mateína levou a um antagonismo na modulação da produção desses biomarcadores (PUANGPRAPHANT e DE MEJIA, 2009).

Em suma, dados da literatura sugerem que a adição *in vitro* de CBA presentes na erva-mate suprime a síntese de mediadores inflamatórios em macrófagos. No entanto, o estudo do efeito do alimento erva-mate e de suas preparações sobre a resposta inflamatória dessas células ainda é escasso. O alimento é uma matriz complexa constituída de uma infinidade de componentes. Sendo assim, embora o estudo do efeito de CBA isolados da erva-mate seja essencial ao entendimento de seus mecanismos de ação, sua contribuição para elucidar o potencial terapêutico da erva-mate é limitada. O único estudo que investigou a influência do chá mate sobre a resposta inflamatória de macrófagos (RAW 264.7) foi realizado *in vitro* e descreveu um efeito inferior ao apresentado por seus componentes isolados (PUANGPRAPHANT e DE MEJIA, 2009).

Por motivos inerentes ao tipo do modelo, estudos *in vitro* não contemplam fatores como bioacessibilidade e metabolização de CBA, o que

torna questionável a reprodutibilidade desses resultados no organismo. Além disso, nesses estudos, é prática comum utilizar doses de CBA muito superiores às encontradas em alimentos. Não há, no nosso conhecimento, um estudo que tenha avaliado se a administração *in vivo* da erva-mate tem algum impacto sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais, o que é particularmente importante, tendo em vista a participação central dessas células nas disfunções metabólicas e imunológicas que precedem e intensificam as DCNT.

1.2. JUSTIFICATIVA

Evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais caracterizam a inflamação crônica como fator etiológico da resistência periférica à ação da insulina e da aterogênese, condições de alto risco para o desenvolvimento de DCNT (BERG e SCHERER, 2005; QATANANI e LAZAR, 2007). Nesse contexto, verifica-se que indivíduos obesos e com síndrome metabólica, assim como roedores submetidos à ração HL, apresentam aumento da concentração sanguínea de biomarcadores inflamatórios como proteína C reativa, IL-6, IL-8, TNF- α e resistina.

A infiltração de macrófagos nos tecidos, particularmente, no tecido adiposo, é reconhecida como um fenômeno central no desencadeamento e na perpetuação desse quadro inflamatório (DAVIS et al., 2008; MURANO et al., 2008). Cabe ressaltar que, embora grande parte do conhecimento atual sobre a biologia de macrófagos seja proveniente de estudos que analisaram macrófagos da cavidade peritoneal, pouco se sabe a respeito do impacto da obesidade e do consumo de ração HL no comportamento dessas células (STEINMAN et al., 1994).

Nesse contexto, macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à ração HL, quando expostos a LPS oriundos da bactéria Gram-negativa da *P. gingivalis*, apresentam reduzida capacidade de síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , bem como diminuição da capacidade de ligação do NF- κ B em regiões promotoras de genes que codificam as citocinas IL-10 e TNF- α (AMAR et al., 2007). Desse modo, é possível que, além da relevante implicação no desenvolvimento do quadro inflamatório crônico, macrófagos também participem da disfunção imunológica manifestada em processos infecciosos em camundongos alimentados com ração HL.

Dentre os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da resposta inflamatória induzida pela obesidade e pelo consumo de ração

HL, destaca-se a via de sinalização do fator de transcrição denominado NF- κ B, que está relacionado com o aumento da expressão de diversos genes que codificam proteínas envolvidas com a resposta inflamatória e, conseqüentemente, com a patogênese de diferentes DCNT (CANCELLO e CLEMENT, 2006). Estudos *in vitro* indicam que a atividade do NF- κ B em macrófagos é modulada por diferentes CBA, como os presentes na erva-mate (ácido cafeico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, quercetina e *kaempferol*), que apresentam a capacidade de reduzir a ativação desse fator de transcrição (NARDINI et al., 2001; CAVE et al., 2008; OLMOS et al., 2008).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é nativa da América do Sul e tem grande importância socioeconômica e cultural em países como o Brasil. Apesar de utilizada desde 1500 por povos como incas, guaranis e quíchua, somente na década de 90 seu potencial terapêutico começou a ser investigado. Há evidências de que o consumo do extrato aquoso de erva-mate pode representar importante auxílio na conduta dietoterápica de indivíduos obesos e com síndrome metabólica (MOSIMANN et al., 2006). No entanto, não há, até o momento, estudos *in vivo* que avaliaram o impacto da ingestão do extrato aquoso de erva-mate sobre a ativação de vias de sinalização que desencadeiam a resposta inflamatória em macrófagos. Tal evidência pode agregar informações que promovam a redução do risco e das complicações de determinadas DCNT.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO DA ETAPA 1

Investigar o efeito do consumo de ração HL sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoneais de ratos *Wistar*.

2.1.1 Objetivos Específicos da Etapa 1

- Avaliar o efeito da ração HL sobre a síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e NO de macrófagos peritoneais estimulados *ex vivo* com LPS.
- Avaliar o efeito da ração HL sobre a expressão do mRNA de IL-1 β , IL-6 e TNF- α de macrófagos peritoneais estimulados *ex vivo* com LPS.
- Avaliar o efeito da ração HL sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos peritoneais estimulados *ex vivo* com LPS.
- Avaliar o efeito da ração HL sobre a expressão e sobre a fosforilação de proteínas IKK- β e I κ B- α em macrófagos peritoneais estimulados *ex vivo* com LPS.
- Avaliar o efeito da ração HL sobre a composição corporal.
- Avaliar o efeito da ração HL sobre a concentração sanguínea de glicose, de insulina, de TNF- α , de IL-6 e do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1).

2.2 OBJETIVO DA ETAPA 2

Investigar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de ratos *Wistar* submetidos à ração HL.

2.2.1 Objetivos Específicos da Etapa 2

- Avaliar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a síntese de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO de macrófagos peritoniais estimulados *ex vivo* com LPS.
- Avaliar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos peritoniais estimulados *ex vivo* com LPS.
- Avaliar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a expressão e sobre a fosforilação de proteínas IKK- β e I κ B- α em macrófagos peritoniais estimulados *ex vivo* com LPS.
- Avaliar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal.
- Avaliar o efeito da ingestão do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a concentração sanguínea de glicose, de insulina, de TNF- α , de IL-6 e do PAI-1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

3.1.1 Animais

Foram utilizados 72 ratos *Wistar* machos e adultos, com 2 meses de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas de criação, sob condições ambientais controladas, temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro (luz acesa às 7:00). Todos os procedimentos realizados com os ratos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (protocolo n°. 029/2008).

3.1.2 Ração

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

Em um estudo piloto, observou-se que os animais submetidos à ração HL apresentavam redução da quantidade de ração consumida (em gramas) em comparação aos animais alimentados com ração controle. 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 e TAYLOR, 2003; KISHINO et al., 2006; JOBGEN et al., 2009; SAFWAT et al., 2009). Além disso, em razão da maior susceptibilidade da ração HL à oxidação, aumentou-se a quantidade de tertbutil hidroquinona nessa ração (PANG et al., 2008) (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Composição das rações experimentais segundo valor energético

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

3.1.3 Grupos Experimentais

Os 72 animais foram distribuídos inicialmente em dois grupos. Um grupo recebeu dieta controle (CON), ou seja, a ração formulada segundo a AIN-93M, enquanto o outro recebeu ração HL durante o período de 12 semanas (**Tabela 1**).

Para a **etapa 1**, 12 animais de cada grupo foram eutanasiados na 12^a semana do protocolo experimental, com o objetivo de avaliar o efeito da ração HL ao final desse período (**Figura 3A**).

Para a **etapa 2**, a partir da 12^a semana, 12 animais de cada grupo receberam, durante um período de quatro semanas, o extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) tostada (1 g/kg/dia) (**Figura 3B**). Desse modo, o estudo foi realizado com seis grupos experimentais:

Etapa 1:

- **Grupo CONBL:** grupo “baseline”, com dieta CON, que foi eutanasiado após 12 semanas do início do estudo (n=12).
- **Grupo HLBL:** grupo “baseline”, com ração HL, que foi eutanasiado após 12 semanas do início do estudo (n=12).

Etapa 2:

- **Grupo CON:** grupo com dieta CON, que foi eutanasiado após 16 semanas do início do estudo (n=12).
- **Grupo CONEM:** grupo com dieta CON, que recebeu extrato aquoso de erva-mate (1 g/kg de massa corporal) entre a 13^a e a 16^a semana de protocolo, sendo eutanasiado após 16 semanas do início do estudo (n=12).

- **Grupo HL:** grupo com ração HL, que foi eutanasiado após 16 semanas do início do estudo (n=12).
- **Grupo HLEM:** grupo com ração HL, que recebeu extrato aquoso de erva-mate (1 g/kg de massa corporal) entre a 13ª e a 16ª semana de protocolo, sendo eutanasiado após 16 semanas do início do estudo (n=12).

Figura 3 – Delineamento experimental da etapa 1 (A) e da etapa 2 (B)

As flechas vermelhas (↓) indicam os momentos em que ocorreram as eutanásias.

3.1.4 Preparo e Administração da Erva-mate

A bebida à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) foi obtida por meio da dissolução do chá mate instantâneo liofilizado (lote A 2009, Leão Júnior S.A., Curitiba-PR, Brasil) em água. A solução era preparada diariamente no momento imediatamente anterior à utilização. O chá mate foi administrado com o auxílio de uma sonda gástrica (gavagem) durante as quatro últimas semanas do protocolo experimental. O grupo controle recebeu água via gavagem. A quantidade administrada do chá mate correspondeu a 1 g/kg de massa corporal em uma concentração de 0,2 g/mL. No dia da eutanásia, os animais não receberam gavagem, o que visou a evitar a interferência de um eventual efeito agudo do chá mate sobre os desfechos estudados. Cabe ressaltar que foi utilizado um único lote do produto ao longo de todo o experimento. Os frascos foram armazenados em ambiente seco e ao abrigo da luz.

3.1.5 Quantificação e Identificação de Compostos Fenólicos e Cafeína por Cromatografia Líquida de Ultra-eficiência (CLUE) presentes no Extrato Aquoso de Erva-mate

As análises do perfil de compostos fenólicos e cafeína presentes no extrato aquoso de erva-mate foram realizadas em cromatógrafo líquido, modelo Agilent 1200 SL, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas com fonte de íons eletrospray à pressão

atmosférica (API-ESI), modelo Agilent 6150, utilizando coluna Agilent Zorbax SB-C18 (50 x 2,1 mm, 1.8 μm).

O extrato aquoso de erva-mate foi preparado em triplicata, com diluição de 100 mg do extrato solúvel de erva-mate em 100 mL de água deionizada em balão volumétrico. Alíquotas de 1 mL foram filtradas com filtro para seringa 0,22 μm (Millipore) e 5 μL injetados no cromatógrafo.

A fase móvel foi constituída de ácido fórmico (Merck) 0,1% (v/v) em água deionizada (A) e metanol grau HPLC (Gold, CER Brasil) (B). Os solventes foram filtrados com membrana 0,45 μm nylon (Millipore) e desgaseificados em ultrassom antes de serem acoplados ao sistema cromatográfico. Antes do início da análise, o sistema foi equilibrado com uma mistura de 85:15 dos eluentes A e B, respectivamente. A programação do gradiente foi a seguinte: 15% de B até 1,8 minutos, 15 - 30% B até 5 minutos, 35% de B de 6 a 12 minutos, retorno a 15% de B aos 13 minutos e mantendo por mais 7 minutos nesta condição para equilibrar a coluna. O fluxo de fase móvel foi de 320 $\mu\text{L min}^{-1}$ e temperatura do forno mantida a 40 $^{\circ}\text{C}$.

As condições do espectrômetro de massas foram: voltagem na fonte de ionização ± 3.000 volts, fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) a 12 L min^{-1} , temperatura 350 $^{\circ}\text{C}$ e pressão do nitrogênio a 30 psi. A análise dos compostos fenólicos foi realizada no modo de ionização negativo e a análise de cafeína no modo positivo, na mesma corrida cromatográfica. Inicialmente foi realizada análise *scan* em ambos os modos e os íons mais abundantes de cada pico selecionados para análise do modo SIM (*single ion monitoring*).

A identificação do ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e da cafeína foram realizadas com base no tempo de retenção, espectro de absorção UV e espectro de massas, em comparação com os padrões de referência. A identificação dos demais compostos fenólicos, sem padrão de referência, foi realizada pelos espectros de absorção UV (similaridade com espectro do 5-CQA superior a 90%) e de massas, com base nos resultados anteriormente descritos por BASTOS et al. (2007b) e JAISWAL et al. (2010). A quantificação foi realizada pelo DAD, através de curva de calibração externa

de 5 pontos com o padrão referência: cafeína a 272 nm (5 a 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$, $r^2=0,99998$) e 5-CQA a 324 nm (5 a 45 $\mu\text{g ml}^{-1}$, $r^2=0,99995$). Os demais compostos fenólicos foram quantificados pela curva do 5-CQA e os resultados, somados ao do 5-CQA para estimativa do teor de fenólicos totais.

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

3.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

No dia anterior à eutanásia, a ração era retirada às 12 h e oferecida novamente às 19 h, sendo retirada definitivamente às 23 h. Esse protocolo foi realizado na tentativa de aumentar a probabilidade de o animal se alimentar pouco antes da retirada definitiva da ração, de modo a atenuar eventuais diferenças no tempo de jejum entre os animais.

Após jejum de 10 a 12 h, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (50 mg/kg) e cloridrato de quetamina (100 mg/kg), aplicados por via intramuscular, por meio de uma seringa de insulina com agulha 13 x 4,5 mm. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por

decapitação, utilizando-se guilhotina. Esse procedimento foi realizado de forma rápida, visando a minimizar qualquer forma de sofrimento ou estresse dos animais. A eutanásia foi realizada no período da manhã, entre 9 e 11 h (protocolo nº. 029/2008 - Comitê de Ética em Experimentação Animal IMT/USP).

Foram colhidas amostras de sangue em tubos sem anticoagulante, para a obtenção do soro, a partir do qual foi determinada a concentração de glicose. Em tubos contendo anticoagulante, EDTA a 10%, foram colhidas amostras de plasma para a determinação de insulina, PAI-1, IL-6 e TNF- α (**Figura 4**).

Posteriormente à coleta do sangue, macrófagos peritoneais foram coletados para a realização dos seguintes ensaios: síntese *in vitro* de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO; ativação do fator de transcrição NF- κ B; e avaliação da expressão e da fosforilação das proteínas I κ B- α e IKK- β , por meio da técnica *Western blotting* (**Figura 4**).

Os coxins adiposos (retroperitoneal e periepididimal), os músculos gastrocnêmio e sóleo, o coração e o fígado foram dissecados e, imediatamente, pesados. A partir da carcaça dos animais foi realizada a análise de sua composição química, ou seja, a quantificação de umidade, proteína, lipídeos e cinzas presentes na carcaça (**Figura 4**).

Figura 4 – Síntese das principais determinações realizadas

(PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; IL: interleucina; TNF-α: fator de necrose tumoral-α; LPS: lipopolissacarídeos; NO: óxido nítrico; EN: extrato nuclear; ET: extrato total; NF-κB: fator nuclear-κB; IKK: quinase do inibidor do NF-κB; IκB: inibidor do NF-κB). *Ensaio realizado apenas na etapa 1.

3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.3.1 Determinação da Concentração Sérica de Glicose

A concentração sérica de glicose foi quantificada com o kit Glicose HK Liquiform (Labtest Diagnóstica S/A, Minas Gerais, Brasil). A adenosina trifosfato (ATP) promove a fosforilação da glicose em uma reação catalisada pela hexoquinase. A glicose-6-fosfato produzida é oxidada a 6-fosfogluconato, na presença de NAD, em reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase. O NADH produzido é diretamente proporcional à concentração da glicose na amostra. A absorbância resultante é medida a 340 nm.

3.3.2 Determinação das Concentrações Plasmáticas de Insulina, PAI-1, TNF- α e IL-6

As concentrações plasmáticas de insulina, PAI-1, TNF- α e IL-6 foram determinadas com o auxílio do *kit* Lincoplex (Linco Research Inc., St. Charles, MO). Tal kit é fundamentado no imunoensaio e na tecnologia Luminex™ xMAP. Anticorpos de captura específicos para cada analito estão imobilizados a microesferas por meio de ligações covalentes não reversíveis. Tais microesferas são coradas com proporções diferentes de dois fluoróforos, o que lhes confere diferentes “códigos de cores”. Depois que o analito se liga aos anticorpos de captura localizados na superfície das microesferas, a detecção final é feita por meio de um terceiro marcador fluorescente, ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. O

equipamento Luminex 200 movimenta estas esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (o código de cor para o ensaio) e o segundo laser quantifica o sinal de reporte em cada microesfera.

3.3.3 Cálculo do Índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*)

O índice HOMA-IR foi calculado pelo produto da concentração de glicose (mmol/L) e da concentração de insulina (μ IU/mL), dividido pelo fator 22,5 (MATTHEWS et al., 1985).

3.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARÇAÇA

A composição corporal dos ratos (umidade, lipídeos, proteína e cinzas) foi determinada por meio de análise química da carcaça. Inicialmente, a carcaça foi submetida à secagem em estufa ventilada (a, aproximadamente, 70°C) durante sete dias. A diferença entre os valores obtidos na pesagem da carcaça antes e após a secagem permitiu o cálculo do conteúdo de umidade. Em seguida, a carcaça foi triturada e envolta em gaze e papel de filtro para a determinação do conteúdo total de lipídeos, utilizando-se um extrator Soxhlet e éter etílico como solvente. O restante da carcaça — sem umidade e lipídeos — foi completamente moído (IKA M20 grinder, Labortechnik) e, posteriormente, peneirado para a remoção de

pelos, os quais podem reduzir a homogeneidade da amostra. Esse processo resulta em um pó altamente homogêneo, que foi utilizado para a determinação do conteúdo de proteína da carcaça pelo método de micro-Kjeldahl (ALBANESE e ORTO, 1963). Além disso, esse pó também foi colocado em uma mufla por 12 horas, a 550 °C e, após ser resfriado, o peso das cinzas foi determinado. A quantidade de massa magra foi calculada a partir da diferença entre a massa total e a massa de lipídeos presentes na carcaça.

3.5 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS

Os macrófagos peritoniais foram obtidos da cavidade peritoneal, imediatamente após os animais serem anestesiados com cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina, eutanasiados e exsanguinados. Posteriormente, 60 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab – Campinas, Brasil), pH 7,4, estéril, apirogênico, contendo 10% de soro fetal bovino e 2 mmol/L de glutamina, foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. O lavado peritoneal foi aspirado com a utilização de pipetas de transferência descartáveis após delicada massagem abdominal durante 60 segundos e acondicionado em tubos de polipropileno. A suspensão celular foi lavada 2 vezes com meio RPMI 1640 em centrífuga a 4 °C, 1.500 rpm, durante 10 minutos. Após a última lavagem, o sedimento celular foi ressuspenso em 3 mL de meio RPMI 1640. Essa suspensão celular foi adicionada em placas de cultura de 6 ou de 24 poços. As células foram incubadas por duas horas, a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, para que ocorresse a adesão dos macrófagos à placa. Posteriormente, células não-aderentes foram removidas por meio da lavagem da placa com meio RPMI 1640. Todos os

procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, em ambiente asséptico. Todo o material utilizado para a realização dos experimentos envolvendo macrófagos peritoniais era estéril e apirrogênico.

3.6 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade de células presentes no lavado peritoneal foi avaliada por meio do teste de exclusão do Azul de Tripiano (0,5%) (KING et al., 1959; FALLON et al., 1962; CZARNETZKY et al., 1975). O número de células obtido da cavidade peritoneal foi determinado em câmara de Neubauer, enquanto os diferentes tipos celulares presentes foram avaliados pela análise morfológica realizada em lâminas obtidas de alíquotas do lavado peritoneal, previamente submetidas à citocentrifugação (Incibras®) e coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). A contagem de células viáveis do peritônio foi determinada subtraindo o número de células inviáveis do número de células totais contadas.

3.7 AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF-KB) EM MACRÓFAGOS PERITONIAIS ATIVADOS COM LPS

Posteriormente ao período de adesão celular (2 horas), macrófagos foram incubados com 1 µg/mL de LPS, durante 30 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células aderentes foram lisadas. A

partir desse lisado celular, foi realizada a determinação da expressão das proteínas I κ B- α e IKK- β tanto na forma fosforilada, quanto total, por *Western Blot*, bem como a determinação da atividade do fator de transcrição NF- κ B por meio do ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel de poliacrilamida (Eletrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA). Cabe destacar que, com o objetivo de controlar a quantidade real de proteína pipetada de cada amostra no ensaio *Western Blotting*, foi também determinada a expressão da proteína β -actina, a qual é expressa constitutivamente na célula e, portanto, indica a quantidade de proteína total da amostra (KAWAMOTO et al., 2008).

Para a determinação da concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e NO presentes no sobrenadante celular, macrófagos foram incubados com 1 μ g/mL de LPS durante 24 horas. Todas as determinações a serem realizadas nos macrófagos peritoniais ativados com LPS foram também efetuadas em macrófagos não estimulados com LPS.

3.8 ENSAIO *WESTERN BLOTTING*

3.8.1 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 10 % de poliacrilamida, 380 mM Tris.HCl (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

3.8.2 Preparo de Lisado de Proteínas para SDS-PAGE

Os lisados foram preparados a partir de 2×10^6 células em tampão RIPA (0,1 % SDS, 1 % Igepal CA-630, 1 % deoxicolato de sódio, 10 mM Tris.HCL, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA). Ao tampão RIPA, foram adicionados coquetéis contendo inibidores da atividade de proteases e de fosfatases (*Protease Inhibitor Cocktail* - P8340, *Phosphatase Inhibitor Cocktail 1* – P2850 e *Phosphatase Inhibitor Cocktail 2* – P5726, Sigma Chemical Company, EUA). O material foi centrifugado por 15 minutos, a 14.000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi separado e foi acrescentado tampão Laemmli (5 x concentrado, 1 M Tris.HCL, pH 6,8, 5 % 2-mercaptoetanol (v/v), 2 % SDS, 20 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol) na proporção 4:1. Posteriormente, a mistura de sobrenadante com tampão foi fervida por 5 minutos e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 120V. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular *Full-range Rainbow™ Molecular Weight Markers* (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Alemanha).

3.8.3 Transferência de Proteínas do Gel para a Membrana de Nitrocelulose

Inicialmente, a membrana de nitrocelulose foi incubada em tampão TBS (Tris, pH 7,5, 20 mM, NaCl 0,9 %). Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: 3 folhas de papel de 3 mm, gel, membrana e 3 folhas de 3 mm (Whatman). A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada na presença de tampão de transferência (25 mM tris base,

192 mM glicina, 0,02% SDS e 10% metanol), sob corrente de 300-400 mA, por 90 min. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana por 5 min com corante Ponceau (0,1% vermelho de Ponceau, 1% ácido acético), seguida de lavagem com TBS.

3.8.4 Sondagens das Proteínas com Anticorpos

Os sítios sem proteínas das membranas foram bloqueados por uma hora com solução de bloqueio (*Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit*, Piscataway, NJ, EUA), a 2 %, em tampão TBS com 0,01% de Tween 20 (TBST). O anticorpo primário foi diluído na proporção de 1:250 para IKK- β fosforilada no resíduo de serina 176/180; 1:500 para IKK- β total e para I κ B- α fosforilado no resíduo de serina 32 e total; e 1:40.000 para β -actina e utilizado para a incubação *overnight* com as membranas a 4°C, sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 5 min, com TBST. As proteínas foram então marcadas com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:2.000, por 1 h, com agitação. A membrana foi novamente lavada com TBST 3 vezes por 5 min.

3.8.5 Revelação com Sistema Quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura dos reagentes do kit ECL (*Amersham ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit*, Piscataway, NJ, EUA) 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, *Pittsburgh, PA, EUA*), utilizando o software ImageQuant™ Capture Software.

3.9 ENSAIO DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA RETARDADA EM GEL DE POLIACRILAMIDA (*ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY - EMSA*)

A atividade do fator de transcrição NF-κB foi avaliada por meio do ensaio de mobilidade eletroforética retardada em gel de poliacrilamida (*Electrophoretic Mobility Shift Assay - EMSA*). O ensaio de retardamento de banda permite avaliar a ligação de um fator de transcrição à sua sequência específica de DNA. Neste ensaio, o extrato proteico nuclear é incubado com um oligonucleotídeo dupla fita de DNA contendo a sequência consenso do fator de transcrição e marcado radioativamente. O fator de transcrição ativo liga-se ao oligonucleotídeo e, após eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições não-denaturantes, pode ser quantificado, uma vez que, sob essas condições, o complexo oligo-NFκB apresenta mobilidade menor que o oligo não-ligado ao fator de transcrição.

A sequência dupla fita a ser utilizada no ensaio para avaliar a ativação do NF-κB está descrita abaixo:

5'- AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC- 3'

Os oligonucleotídeos foram marcados por fosforilação da extremidade 5' com [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (GE Healthcare Life Sciences) catalisada pela enzima T4

polinucleotídeo quinase (Life Technologies). A reação, que conteve 10 pmol de oligonucleotídeo, 15 pmol de [γ^{32} P]-ATP, 1 U de T4 quinase e tampão de enzima 1X, foi incubada a 37°C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de tampão TE (Tris HCl (10 mM), EDTA (1mM), pH 8,0) contendo NaCl (0,1 M) e o excesso de [γ^{32} P]-ATP foi removido por centrifugação do volume da reação utilizando colunas MicroSpin S-300 HR (GE Healthcare Life Sciences).

Para o preparo do extrato de proteínas nucleares, foram utilizadas cerca de 5×10^6 células por tratamento. As células foram lavadas com 1 mL de tampão HBS (Hepes (25 mM) pH 7,6; NaCl (15 mM)) por duas vezes. Em seguida, o sedimento foi lavado uma vez com tampão RBI (KCl (100 mM); MgCl_2 (5 mM); EGTA (5 mM); $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (5 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 $\mu\text{g/mL}$); leupeptina (2 $\mu\text{g/mL}$)) e incubado por 5 minutos com 1 mL do mesmo tampão. Após a incubação, o sedimento foi lavado e incubado por 5 minutos com 1 mL de tampão RBII (KCl (50 mM); MgCl_2 (5 mM); EGTA (1 mM); $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (1 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 $\mu\text{g/mL}$); leupeptina (2 $\mu\text{g/mL}$)). Em seguida, o sedimento foi incubado com tampão LBS (Tris (25 mM) pH 7,5; MES (25 mM); Triton X-100 (0,1 %); DTT (1 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 $\mu\text{g/mL}$); leupeptina (2 $\mu\text{g/mL}$)) por 30 minutos no gelo.

O lisado foi centrifugado a 900 x g por 10 minutos e o sedimento restante contendo as proteínas nucleares foi ressuspenso em tampão de extração (Hepes (20 mM) pH 7,6; NaCl (0,45 M); EDTA (2,5 mM); glicerol (25 %); DTT (2,5 mM); PMSF (1 mM); aprotinina (2 $\mu\text{g/mL}$) e leupeptina (2 $\mu\text{g/mL}$)). Após incubação por 30 minutos a 4°C sob agitação, a suspensão foi centrifugada por 10 min a 4°C na rotação máxima e o sobrenadante contendo as proteínas nucleares foi armazenado a -70°C.

As proteínas nucleares foram quantificadas conforme descrito por Bradford (1976). Para a formação dos complexos proteína-DNA, as reações (volume final 20 μL) foram preparadas em gelo, contendo 5 μg de extrato nuclear, 1,5 μg de Poli dI-dC, 1pmol de oligonucleotídeo marcado e 6 μL de tampão de ligação (Hepes (20mM) pH 7,6; glicerol (10%); KCl (50mM); EDTA (0,2 mM), DTT (1mM)). As reações foram incubadas à temperatura

ambiente por 20 minutos. A seguir, as amostras foram aplicadas em gel contendo 6% de poliacrilamida (30:1) em tampão TBE (Tris base (45mM), ácido bórico (45mM) e EDTA (1mM) e submetidas à eletroforese a 150 V por 2 horas.

Após a eletroforese, o gel foi seco a vácuo a 80 °C e exposto em um filme de raio-X por uma semana. A exposição de uma película radiossensível ao gel gera uma radiografia que permite a visualização do retardamento do complexo oligonucleotídeos/ NF-κB. A intensidade das bandas radiografadas representa a quantidade do fator de transcrição que foi ativada. Os resultados foram analisados por densitometria utilizando o equipamento STORM 840 (Dynamic Molecular, Sunnyvale, EUA).

3.10 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE *IN VITRO* DE TNF-α, IL-1 β, IL-6, IL-10 E NO

Os macrófagos foram mantidos em cultura a 37 °C, 5% de CO₂, em placas de cultura com 24 poços, numa concentração de 1 x 10⁶ macrófagos por poço, e um volume total de 1 mL. As células foram cultivadas na ausência ou presença de 1 µg/mL de LPS de *Eschericia coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma Chemical Company, USA) em meio de cultivo celular (RPMI 1640) (Cultilab, Campinas, Brasil), estéril, apirogênico e contendo soro fetal bovino (10%). Após 24 horas, o sobrenadante da cultura celular foi removido e congelado (-80 °C) para posterior dosagem de TNF- α, IL-1 β, IL-6, IL-10 e NO.

A determinação da concentração de IL-1β, IL-6 e TNF-α presente no sobrenadante das culturas celulares foi realizada por meio de *kits* que utilizam a tecnologia Luminex™ xMAP (*Linco Research Inc., St. Charles,*

MO), como descrito no item 3.3.2. A concentração de IL-10 no sobrenadante foi determinada por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com auxílio do kit *Rat IL-10 Quantikine ELISA Kit* (R&D Systems, Minneapolis, MN).

A produção de NO foi avaliada pelo método colorimétrico de Griess modificado (GREEN et al., 1981). Em suma, em placas de cultura de 96 poços, foram misturados a amostra e o reagente de Griess (sulfanilamida 1%, α -naftil etilenodiamina 0,1% e ácido fosfórico 2% em água tridestilada) na proporção 1:1. A concentração de nitrito da amostra foi quantificada utilizando nitrito de sódio como padrão (NaOH_2) e meio RPMI 1640 como branco. Os resultados foram obtidos por meio de leitura espectrofotométrica a 550 nm no leitor *EL 800 Universal Microplate Reader* (Bio-Tek Instruments, INC.).

3.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RNAm POR PCR EM TEMPO REAL

A avaliação da expressão gênica (RNAm) foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (HIGUCHI et al., 1992) usando o equipamento ROTOR GENE 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). O RNA total de 6×10^6 macrófagos peritoniais foi obtido usando o reagente Trizol™ (Invitrogen Life Technologies, Rockville, MD, USA), conforme descrito por (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987).

Resumidamente, as células foram lisadas com 1 mL de Trizol, transferidas para microtubos, os quais foram acrescidos de 200 μL de clorofórmio, submetidos à homogeneização em vórtex e centrifugados a $12.000 \times g$. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e o RNA sedimentado por centrifugação ($12.000 \times g$) com isopropanol. O precipitado

de RNA foi lavado duas vezes com etanol a 75%, centrifugado a $7.500 \times g$ por 5 minutos e seco à temperatura ambiente. O RNA foi dissolvido em água livre de RNase e quantificado por meio da medida da sua absorbância a 260 nm no equipamento Nanodrop® 1000. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose desnaturante a 1% e a pureza do RNA avaliada pelas razões 260/280 e 260/230 nm (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987).

Antes da síntese do cDNA, as amostras foram tratadas com DNase I por meio do kit RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Germany). A ação da DNase foi inibida mediante o acréscimo de EDTA 25 nM na proporção de 1:10 seguido de incubação a 65°C por 10 minutos. A transcrição reversa foi feita utilizando-se 1 µg de RNA e o kit High Capacity RNA-to-DNA master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada em termociclador nas seguintes condições: 25°C por 5 minutos, 42 °C por 30 minutos e 85 °C por 5 minutos. O cDNA resultante foi diluído 2,5 vezes e armazenado a -40 °C.

Para a realização do qPCR, 5 µL de cDNA diluído foram adicionados à reação contendo 10 µL do master mix Kapa SYBR® Fast qPCR Kit 2x (Kapa Biosystems™, Boston, Massachusetts, USA), 0,1 µM de cada *primer* (sense e antisense) e água livre de RNases em um volume final de 20 µL. As sequências dos *primers* foram desenhadas usando informação disponibilizada no GeneBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A temperatura de anelamento e a sequência dos *primers* são mostradas no quadro 1. A quantificação da expressão gênica será realizada pelo método descrito por LIU e SAINT (2002), usando o gene *gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como controle interno. A reação foi submetida a 95°C por 3 minutos para ativação da enzima Taq polimerase, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e de 57 a 60°C por 30 segundos. Ao final, procedeu-se à curva de dissociação com o objetivo de possibilitar a análise da especificidade dos produtos formados.

Quadro 1 - Temperatura de anelamento e sequência dos *primers* utilizados

Gene	<i>Primer sense</i>	<i>Primer antisense</i>	Temperatura de anelamento (°C)
GAPDH	GACATCATCCCTGCATCC	CCTGCTTCACCACTTCTT	60 °C
IL-6	CCTTCTGGGACTGATGTTGTTGAC	GGGTGGTATCCTCTGTGAAGTCTCC	58 °C
IL-1β	AGGCAGTGTCATCATTGTGGC	TCACATGGGTCAGACAGCACG	58 °C
TNF-α	GCGTGTTTCATCCGTTCTCTA	CCTGTCGCCTGTTCTTTGA	60 °C

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; IL-6: interleucina-6; IL-1 β : interleucina 1 β ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α .

3.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA CELULAR EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS

A concentração de proteínas celulares presente em cada poço das culturas de macrófagos peritoniais foi determinada por meio de ensaio colorimétrico utilizando o *kit BCA Protein Assay* (*Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA*).

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados relativos ao efeito da ração HL foram inicialmente avaliados quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e tiveram suas variâncias comparadas pelo teste F. Em seguida, foi feita a comparação das médias dos grupos (grupo CONBL vs HLBL) pelo test t de Student não pareado. Em casos de distribuição não gaussiana ou ocorrência de heteroscedasticidade, realizou-se o teste de Mann-Whitney.

Os resultados relativos ao efeito da erva-mate (grupos CON vs HL vs CONEM vs HLEM) e ao efeito da incubação com LPS (sem vs com LPS) foram inicialmente avaliados quanto à normalidade de sua distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade das variâncias (Testes de Cochran C, Hartley, Bartlett) e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para identificação dos contrastes significantes. Em casos de distribuição não gaussiana ou ocorrência de heteroscedasticidade, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para identificação dos contrastes.

Em todas as análises, foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., CA, USA) e adotado um valor de alfa de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS REFERENTES À ETAPA 1 - EFEITO DA RAÇÃO HIPERLIPÍDICA

Nas **figuras 5A e 6A**, é possível observar que houve redução significativa da quantidade de ração consumida da 1ª à 12ª semana do protocolo experimental no grupo HLBL em relação ao grupo CONBL, sendo que essa redução foi em média de 28% ($p < 0,0001$). Por outro lado, na **figura 5B**, observa-se que, em razão da diferença na densidade energética das rações, não houve diferença estatisticamente significativa no consumo energético entre os grupos CONBL e HLBL, com exceção da 1ª e da 12ª semana do experimento. Corroborando esse fato, na **figura 6B**, observa-se que os grupos HLBL e CONBL não diferiram no tocante ao consumo energético total do período de 12 semanas. Apesar de o consumo energético não diferir entre os grupos, o peso corporal do grupo HLBL foi superior ao do grupo CONBL na 3ª, na 7ª, na 8ª e na 10ª semana de protocolo experimental (**Figura 7A**), sendo que o ganho de peso em relação ao peso inicial foi 23% superior no grupo HLBL quando comparado ao grupo CONBL ($p < 0,05$) (**Figura 7B**).

Figura 5 - Consumo médio diário de ração (A) em gramas (g) e (B) em quilocalorias (kcal) 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 e desvio-padrão (n = 15/grupo).

* p < 0,05 em relação ao grupo CON.

Figura 6 - Consumo total de ração (A) em gramas (g) e (B) em quilocalorias (kcal) 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 e desvio-padrão (n = 15/grupo).

**** p < 0,0001 em relação ao grupo CONBL.

Figura 7 - 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 e desvio-padrão (n = 12/grupo).

* p < 0,05 em relação ao grupo CONBL.

O aumento do ganho de peso corporal do grupo HLBL em relação ao grupo CONBL refletiu-se em um aumento de gordura corporal como demonstrado pela maior massa dos coxins adiposos periepídídimal ($p < 0,001$), retroperitoneal ($p < 0,0001$) e pela soma desses coxins ($p < 0,0001$) (**Figura 8**). Não houve diferença em relação ao peso do coração, do fígado e dos músculos sóleo e gastrocnêmio entre os grupos (**Figura 9**).

Cabe ressaltar que, além da ração HL resultar em aumento do ganho de peso e da gordura corporal, seu consumo favoreceu a ocorrência de modificações na composição corporal dos animais, havendo significativo aumento da quantidade relativa de lipídeos (%) ($p < 0,05$) e redução da quantidade relativa (%) de umidade ($p < 0,01$) e de massa magra ($p < 0,05$) (**Figura 10**).

No que concerne aos parâmetros sistêmicos, o consumo da ração HL não influenciou as concentrações circulantes de glicose, insulina, PAI-1, TNF- α e IL-6 (**Figuras 11 e 12**). O grupo HLBL apresentou aumento significativo do índice HOMA-IR em relação ao grupo CONBL ($p < 0,05$) (**Figura 11C**).

Figura 8 - Peso do coxim adiposo periepídídimo (A) e retroperitoneal (B) e soma desses coxins (C) 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 e desvio-padrão (n = 12/grupo).

*** p < 0,001 e **** p < 0,0001 em relação ao grupo CONBL.

Figura 9 - Peso do coração (A), do fígado (B) e dos músculos gastrocnêmio (C) e sóleo (D) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 8-12/grupo).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 10 - Quantificação relativa (%) de umidade (A), lipídeos (B), massa magra (C), proteína (D) e cinzas (E) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental.

Figura 11 - Concentração sanguínea de glicose (A) e insulina (B) e índice de HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance*) 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 e desvio-padrão ($n = 8-12/\text{grupo}$).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

Figura 12 - Concentração plasmática de inibidor do ativador do plasminogênio (PAI)-1 (A), fator de necrose tumoral (TNF)- α (B) e interleucina (IL)-6 (C) de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 8-12/grupo).

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

No que se refere aos parâmetros relativos aos ensaios com macrófagos peritoneais, observou-se redução significativa do número total de células viáveis e de mononucleares no lavado peritoneal dos ratos do grupo HLBL ($p < 0,05$) (**Figura 13**).

Em relação à síntese *in vitro* de citocinas e de NO, constatou-se que, após 24 horas de estímulo com LPS, os macrófagos obtidos da cavidade peritoneal dos animais do grupo HLBL apresentavam reduzida capacidade de síntese de IL-1 β ($p < 0,05$), de IL-6 ($p < 0,01$) e de NO ($p < 0,05$) em relação aos animais do grupo CONBL (**Figuras 14 A, B e D**). Cabe destacar que não foi observada diferença entre os grupos em relação à concentração de TNF- α e à razão IL-10/TNF- α no sobrenadante da cultura celular (**Figuras 14 C e E**). Da mesma forma, não foi observada diferença entre os grupos na síntese de IL-1 β , IL-6 e NO em macrófagos peritoneais não estimulados com LPS (**Figuras 14 A, B e D**). Com o objetivo de melhor elucidar o impacto da ração HL sobre a resposta inflamatória dos macrófagos peritoneais, determinou-se também a concentração de IL-10 no sobrenadante. Ao contrário do grupo CONBL, o estímulo com LPS não acarretou em aumento significativo da produção de IL-10 no grupo HLBL (**Figura 14 D**).

Em relação ao RNA mensageiro da IL-1 β e da IL-6, notou-se que as células estimuladas com LPS do grupo CONBL apresentaram aumento significativo da expressão relativa dessas citocinas em comparação às células não incubadas com LPS, o que não ocorreu com o grupo HLBL (**Figuras 15 A e B**). Por outro lado, não foi observada diferença entre os grupos ou entre as células estimuladas ou não com LPS no que se refere à expressão relativa de TNF- α (**Figura 15 C**). No que concerne à capacidade de ligação do fator de transcrição NF- κ B à sua sequência específica de DNA, não foi encontrada diferença entre os grupos. Contudo, quando calculado o percentual de ativação do NF- κ B após 30 minutos de incubação com LPS, observou-se que o grupo CONBL teve aumento de 30%, ao passo que o grupo HLBL apresentou redução de 20% da ativação desse fator de transcrição ($p < 0,01$) (**Figura 16**).

No tocante às proteínas que regulam a via de sinalização do NF- κ B, notou-se que, em face ao estímulo com LPS, o aumento da fosforilação da IKK- β no grupo HLBL foi inferior ao grupo CONBL ($P < 0,05$) e que a razão entre IKK- β fosforilada e total foi menor no grupo HLBL em comparação ao grupo CONBL ($p < 0,001$) (**Figura 17**). A incubação com LPS induziu uma redução significativa da expressão de I κ B α no grupo CONBL, mas não no grupo HLBL ($p < 0,05$) (**Figura 18C**). Ambos os grupos apresentaram aumento da razão entre I κ B α fosforilado e total mediante estímulo com LPS ($p < 0,01$) (**Figura 18D**). Por outro lado, não foi observada diferença entre os grupos em relação à fosforilação do I κ B α (**Figura 18B**).

Figura 13 - Contagem total de células viáveis (A), de mononucleares (B), eosinófilos (C), mastócitos (D) e neutrófilos (E) do lavado peritoneal 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 e desvio-padrão.

Painel A: n = 8-12/grupo. Painéis B a E: n = 6 a 8/grupo.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo CONBL.

Figura 14 - Concentração de interleucina (IL)-1 β (A), IL-6 (B), fator de necrose tumoral (TNF)- α (C), óxido nítrico (NO) (D) e IL-10 (E) e razão entre TNF- α e IL-10 (F) no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais, estimulados (+) ou não (-) com LPS, 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 e desvio-padrão (n = 8-12/grupo).

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

Figura 15 – Expressão relativa do RNA mensageiro da interleucina (IL)-1 β (A), da IL-6 (B) e do fator de necrose tumoral (TNF)- α (C) de macrófagos peritoneais, estimulados (+) ou não (-) com LPS, de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 6/grupo).

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

Figura 16 - Ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) em macrófagos peritoneais, estimulados (+) ou não (-) com LPS, 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 e desvio-padrão (n = 6/grupo).

** p < 0,01 em relação ao grupo CONBL.

UA: unidades arbitrárias

Figura 17 - Fosforilação da quinase do inibidor κ B (IKK)- β (B), expressão da proteína IKK- β (C) e razão entre IKK- β fosforilada e IKK- β total (D) de macrófagos peritoneais, estimulados (+) ou não (-) com LPS, de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental.

A expressão das proteínas foi determinada por análise densitométrica e normalizada pela expressão da proteína β -actina (A).

Os valores são expressos como média e desvio-padrão ($n = 8-12$ /grupo).

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

Figura 18 - Fosforilação do inibidor κB ($\text{I}\kappa\text{B}$)- α (B), expressão da proteína $\text{I}\kappa\text{B}$ - α (C) e razão entre $\text{I}\kappa\text{B}$ - α fosforilado e $\text{I}\kappa\text{B}$ - α total (D) de macrófagos peritoneais, estimulados (+) ou não (-) com LPS, de ratos *Wistar* alimentados *ad libitum* com ração controle (CONBL) ou com ração hiperlipídica (HLBL) até a 12ª semana do protocolo experimental.

A expressão das proteínas foi determinada por análise densitométrica e normalizada pela expressão da proteína β -actina (A) por 30 minutos.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão ($n = 8-12/\text{grupo}$).

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

4.2 RESULTADOS REFERENTES À ETAPA 2 – EFEITO DA ERVA-MATE

4.2.1 Caracterização do Chá Mate

Com base nos espectros de absorção UV e espectro de massas, foram identificados onze compostos fenólicos nas amostras de chá mate solúvel, sendo quatro isômeros do ácido cafeoilquínico, três do ácido dicafeoilquínico, dois do ácido cafeoilshiquimico e ainda o ácido feruloilquínico e a rutina. Não foram encontrados os ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico nas formas livres. A identificação dos compostos é apresentada no cromatograma (**Figura 19**) e na tabela abaixo (**Tabela 2**).

Figura 19 - Cromatograma CLUE-DAD ($\lambda = 324$ nm) com compostos fenólicos presentes no chá mate

Tabela 2 – 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 20**. 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 20 - Cromatograma CLUE-DAD ($\lambda = 272$ nm) com identificação da cafeína presente no chá mate

Tabela 3 - Parâmetros de validação do método analítico (CLUE-DAD) para caracterização do chá mate solúvel: precisão intra e interdia para tempo de retenção (TR) e área dos picos, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Composto	* Precisão intradia (n=8)		* Precisão interdia (n=8)		LD ($\mu\text{g/mL}$)	LQ ($\mu\text{g/mL}$)
	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 4**, é possível visualizar as quantidades de 5-CQA, cafeína e compostos fenólicos totais presentes no extrato solúvel de erva-mate.

Tabela 4 – Quantificação dos compostos fenólicos e da cafeína presentes no extrato solúvel de 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.

4.2.2 Avaliação do Efeito do Chá Mate

Em relação ao consumo de ração, os animais que receberam ração HL apresentam redução significativa da quantidade consumida em gramas ($p < 0,001$), mas não em quilocalorias. Vale enfatizar que a suplementação com o extrato aquoso de erva-mate não teve efeito sobre o consumo alimentar dos animais ($p > 0,05$) (**Figuras 21 e 22**).

No que se refere ao peso corporal, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos da 12^a à 16^a semana de experimento (**figura 23 A**). No entanto, a suplementação com o extrato aquoso de erva-mate resultou em perda de peso de cerca de 2% nesse período, apenas nos animais que receberam ração HL, sendo essa diferença significativa em relação ao grupo HL, o qual apresentou um acréscimo de 6% no peso corporal ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa no ganho de peso dos grupos HL e HLEM quando comparados a seus respectivos controles, grupos CON e CONEM (**figura 23 B**).

Considerando os coxins adiposos, não houve efeito estatisticamente significativo da ração HL ou do extrato aquoso de erva-mate sobre o peso do coxim periepididimal (**Figura 24 A**). Por outro lado, o consumo da ração HL induziu um aumento estatisticamente significativo do coxim retroperitoneal ($p < 0,05$) (**Figura 24 B**). Além disso, o coxim retroperitoneal, bem como a soma dos coxins retroperitoneal e periepididimal, foi significativamente menor no grupo CONEM em comparação ao grupo HLEM ($p < 0,05$) (**Figura 24 C**). Não houve diferenças entre os grupos no peso do coração, do fígado e dos músculos sóleo e gastrocnêmio (**Figura 25**).

Figura 21 - Consumo médio diário de ração (A) em gramas (g) e (B) em quilocalorias (kcal) de ratos *Wistar* entre a 12^a e a 16^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 5/grupo).

* $p < 0,05$ para grupos HL e HLEM em comparação aos grupos CON e CONEM.

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 22 - Consumo total de ração (A) em gramas (g) e (B) em quilocalorias (kcal) de ratos *Wistar* entre a 12^a e a 16^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 5/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 23 - Curva de peso (A) e ganho de peso corporal (B) de ratos *Wistar* entre a 12^a e a 16^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 12/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 24 - Peso dos coxins adiposos periepídimal (A), retroperitoneal (B) e soma desses coxins (C) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 12/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 25 - Peso do coração (A), do fígado (B) e dos músculos gastrocnêmio (C) e sóleo (D) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 12/grupo).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

O consumo de ração HL acarretou em um aumento significativo do percentual de gordura corporal, em redução do percentual de massa magra (**Figura 26 B e C**) e em aumento da insulinemia e do índice HOMA-IR ($p < 0,05$) (**Figura 27 B e C**). Em contrapartida, a suplementação com extrato aquoso de erva-mate reverteu todas essas alterações induzidas pelo consumo de ração HL ($p < 0,05$) (**Figuras 26 e 27 B e C**). Ainda, o grupo HLEM apresentou diminuição significativa na concentração plasmática de TNF- α e de IL-6 em relação ao grupo HL ($p < 0,01$) (**Figura 28**).

Figura 26 - Quantificação relativa (%) de umidade (A), gordura (B), massa magra (C), proteína (D) e cinzas (E) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 8-12/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 27 - Concentração sanguínea de glicose (A) e de insulina (B) e índice HOMA-IR (*Homeostatis Assessment Model – Insulin Resistance*) (C) de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 8-12/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 28 - Concentração plasmática de inibidor do ativador do plasminogênio (PAI)-1 (A), fator de necrose tumoral (TNF)- α (B) e interleucina (IL)-6 (C) de ratos *Wistar* na 16^a semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 8-12/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Em relação ao lavado peritoneal, foi constatada redução na contagem de células viáveis e de mononucleares apenas no grupo HL ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na contagem diferencial de linfócitos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos (**Figura 29**).

Quanto aos ensaios envolvendo os macrófagos peritoneais, a incubação com LPS promoveu aumento significativo da produção de IL-1 β nos grupos CON e CONEM, mas não nos grupos HL e HLEM ($p < 0,05$). A síntese de IL-6 aumentou nas células estimuladas em relação ao seu estado basal em todos os grupos, com exceção do grupo HLEM ($p < 0,05$). Não foi encontrada diferença entre os grupos na concentração de TNF- α no sobrenadante da cultura celular. Em relação ao NO, observou-se que o estímulo com LPS acarretou em aumento significativo de sua síntese apenas no grupo CON (**Figura 30**).

No que concerne à ativação do NF- κ B, não foram verificadas diferenças entre os grupos quando os dados foram expressos em unidades arbitrárias (**Figura 31 B**). No entanto, ao calcular o percentual de ativação do NF- κ B em relação ao estado basal, células do grupo CON e CONEM apresentaram aumento da ativação de 30% e 20%, respectivamente, quando incubadas com LPS, ao passo que os grupos HL e HLEM tiveram redução de 8,5% e 4,5%, respectivamente. Tal diferença foi estatisticamente significativa apenas entre os grupos CON e HL ($p < 0,01$) (**Figura 31 C**).

Além de interferir no percentual de ativação do NF- κ B, foi possível observar uma modulação por parte da ração HL na fosforilação e na expressão de proteínas que participam da via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B. Após serem incubados com LPS por 30 minutos, os macrófagos do peritônio dos animais do grupo CON apresentam um incremento estatisticamente significativo na fosforilação da IKK- β e na razão entre IKK- β fosforilada e total ($p < 0,001$). No entanto, o mesmo fenômeno não foi verificado nos animais do grupo HL (**Figura 32 B e D**). Em relação ao efeito da erva-mate, vale ressaltar que os grupos CONEM e HLEM não tiveram aumento significativo da razão entre IKK- β fosforilada e total após incubação com LPS. A expressão da proteína IKK- β não foi influenciada pelo

tipo de ração ou pela presença do extrato de erva-mate; houve, entretanto, aumento de sua expressão nos grupos HL e CONEM após estímulo com LPS (**Figura 32**).

A fosforilação do I κ B- α não foi afetada pelo tipo de dieta ou pela suplementação com extrato aquoso de erva-mate (**Figura 33 B**). A expressão da proteína I κ B- α diminuiu significativamente após estímulo com LPS em todos os grupos, exceto o grupo HLEM ($p < 0,05$) (**Figura 33 C**), enquanto a razão entre I κ B- α fosforilado e total aumentou em todos os grupos mediante estímulo com LPS ($p < 0,05$) (**Figura 33 D**).

Figura 29 - Contagem total de células viáveis (A), mononucleares (B), eosinófilos (C), mastócitos (D) e neutrófilos (E) do lavado peritoneal de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão.

Painel A: n = 8-12/grupo. Painéis B a E: n = 4-8/grupo.

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 30 - Síntese de interleucina (IL)-1 β (A), IL-6 (B), fator de necrose tumoral (TNF)- α (C) e óxido nítrico (NO) (D) de macrófagos peritoniais de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 8-10/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 31 - Ativação do NF- κ B de macrófagos peritoneais de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 8-12/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

UA: unidades arbitrárias

Figura 32 - Fosforilação da quinase do inibidor κ B (IKK)- β (B), expressão da proteína IKK- β (C) e razão entre IKK- β fosforilada e IKK- β total (D) de macrófagos peritoniais de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

A expressão das proteínas foi determinada por análise densitométrica e normalizada pela expressão da proteína β -actina (A).

Os valores são expressos como média e desvio-padrão ($n = 8-12/\text{grupo}$).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Figura 33 - Fosforilação do inibidor κB (I κB - α) (B), expressão da proteína I κB - α (C) e razão entre I κB - α fosforilado e I κB - α total (D) de macrófagos peritoneais de ratos *Wistar* na 16ª semana do protocolo experimental.

A expressão das proteínas foi determinada por análise densitométrica e normalizada pela expressão da proteína β -actina (A).

Os valores são expressos como média e desvio-padrão (n = 8-12/grupo).

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

Grupo CON: grupo com ração controle; **grupo HL:** grupo com ração hiperlipídica; **grupo CONEM:** grupo com ração controle e extrato aquoso de erva-mate; **grupo HLEM:** grupo com ração hiperlipídica e extrato aquoso de erva-mate.

Nas **tabelas 5 a 8**, encontra-se um resumo dos resultados obtidos no presente estudo.

Tabela 5 – Resumo dos resultados da etapa de avaliação do efeito da ração hiperlipídica (HL)

Parâmetros	Ração HL*
Consumo de ração (g)	↓
Consumo de ração (kcal)	↔
Peso corporal (g)	↑ (semanas 3, 7, 8 e 10)
Ganho de peso corporal (%)	↑
Coxim adiposo periepididimal (g)	↑
Coxim adiposo retroperitoneal (g)	↑
Soma dos coxins (g)	↑
Peso do coração (g)	↔
Peso do fígado (g)	↔
Peso do músculo gastrocnêmio (g)	↔
Peso do músculo sóleo (g)	↔
<i>Composição corporal:</i>	
- Umidade (%)	↓
- Lipídeos (%)	↑
- Massa magra (%)	↓
- Proteína (%)	↔
- Cinzas (%)	↔
<i>Sangue:</i>	
- Glicose (mg/dL)	↔
- Insulina (pg/mL)	↔
- Índice HOMA-IR	↑
- PAI-1 (pg/mL)	↔
- TNF- α (pg/mL)	↔
- IL-6 (pg/mL)	↔
<i>Lavado peritoneal:</i>	
- Células viáveis (número de células)	↓
- Mononucleares (número de células)	↓
- Eosinófilos (número de células)	↔
- Mastócitos (número de células)	↔
- Neutrófilos (número de células)	↔

* comparação do grupo HLBL com o grupo CONBL na 12ª semana.

↓ = reduz; ↑ = aumenta; ↔ = sem diferença significativa

HOMA-IR: *Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance*;
PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio-1; TNF- α : fator de
necrose tumoral- α ; IL-6: interleucina-6; HL: hiperlipídica.

Tabela 6 – Resumo dos resultados da etapa de avaliação do efeito da ração hiperlipídica (HL) e dos lipopolissacarídeos (LPS) sobre macrófagos peritoneais

Parâmetros	Grupo CONBL/LPS+ ¹	Grupo HLBL/LPS+ ²
IL-1 β (pg/mL)	↑↑	↑
IL-6 (pg/mL)	↑↑	↑
TNF- α (pg/mL)	↔	↔
NO (μ M)	↑	↔
IL-10 (pg/mL)	↑	↔
Razão TNF- α /IL-10	↔	↔
RNA _m IL-1 β (ER)	↑	↔
RNA _m IL-6 (ER)	↑	↔
RNA _m TNF- α (ER)	↔	↔
Ativação NF- κ B (%)	↑	↓
Fosfo-IKK β (UA)	↑↑	↑
IKK β total (UA)	↔	↔
Razão fosfo-IKK β /total	↑	↔
Fosfo-I κ B α (UA)	↔	↔
I κ B α total (UA)	↓	↔
Razão fosfo- I κ B α /total	↑	↑

1 Comparação com o grupo CONBL/LPS- na 12ª semana.

2 Comparação com o grupo HLBL/LPS- na 12ª semana.

↓ = reduz; ↑ = aumenta; ↔ = sem diferença significativa

O número de flechas indica a intensidade do aumento.

IL: interleucina; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; NO: óxido nítrico; NF- κ B:

fator nuclear- κ B; IKK- β : quinase do inibidor do κ B; I κ B- α : inibidor do κ B- α ; UA:

unidades arbitrárias; ER: expressão relativa.

Tabela 7 – Resumo dos resultados da etapa de avaliação do efeito do extrato aquoso de erva-mate (EM)

Parâmetros	Grupo HLEM*
Consumo de ração (g)	↔
Consumo de ração (kcal)	↔
Peso corporal (g)	↔
Ganho de peso corporal (%)	↓
Coxim adiposo periepídimal (g)	↔
Coxim adiposo retroperitoneal (g)	↔
Soma dos coxins (g)	↔
Peso do coração (g)	↔
Peso do fígado (g)	↔
Peso do músculo gastrocnêmio (g)	↔
Peso do músculo sóleo (g)	↔
<i>Composição corporal:</i>	
- Umidade (%)	↔
- Lipídeos (%)	↓
- Massa magra (%)	↑
- Proteína (%)	↔
- Cinzas (%)	↔
<i>Sangue:</i>	
- Glicose (mg/dL)	↔
- Insulina (pg/mL)	↓
- Índice HOMA-IR	↓
- PAI-1 (pg/mL)	↔
- TNF-α (pg/mL)	↓
- IL-6 (pg/mL)	↓
<i>Lavado peritoneal:</i>	
- Células viáveis (número de células)	↑
- Mononucleares (número de células)	↔
- Eosinófilos (número de células)	↔
- Mastócitos (número de células)	↔
- Neutrófilos (número de células)	↔

* comparação do grupo HLEM com o grupo HL.

↓ = reduz; ↑ = aumenta; ↔ = sem diferença significativa

HOMA-IR: *Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance*;
PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio-1; TNF- α : fator de
necrose tumoral- α ; IL-6: interleucina-6; HL: hiperlipídica.

Tabela 8 – Resumo dos resultados da etapa de avaliação do efeito da ração hiperlipídica (HL), do extrato aquoso de erva-mate (EM) e dos lipopolissacarídeos (LPS) sobre macrófagos peritoniais

Parâmetros	Grupo CON/LPS+ ¹	Grupo HL/LPS+ ²	Grupo CONEM/LPS+ ³	Grupo HLEM/LPS+ ⁴
IL-1 β (pg/mL)	↑	↔	↑	↔
IL-6 (pg/mL)	↑	↑	↑	↔
TNF- α (pg/mL)	↔	↔	↔	↔
NO (μ M)	↑	↔	↔	↔
Ativação NF- κ B (%)	↑	↓	↑	↓
Fosfo-IKK β (UA)	↑	↔	↑	↑
IKK β total (UA)	↔	↑	↑	↔
Razão fosfo-IKK β /total	↑	↔	↔	↔
Fosfo-I κ B α (UA)	↔	↔	↔	↔
I κ B α total (UA)	↓	↓	↓	↔
Razão fosfo- I κ B α /total	↑	↑	↑	↑

¹ Comparação com o grupo CON/LPS-

² Comparação com o grupo HL/LPS-

³ Comparação com o grupo CONEM/LPS-

⁴ Comparação com o grupo HLEM/LPS-

↓ = reduz; ↑ = aumenta; ↔ = sem diferença significativa

IL: interleucina; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; NO: óxido nítrico; NF- κ B: fator nuclear- κ B; IKK- β : quinase do inibidor do κ B; I κ B- α : inibidor do κ B- α ; UA: unidades arbitrárias.

5. DISCUSSÃO

5.1 ETAPA 1 - EFEITO DA RAÇÃO HIPERLIPÍDICA

Rações HL têm sido amplamente utilizadas como modelo de indução de obesidade e de síndrome metabólica em animais. A primeira descrição desse tipo de intervenção nutricional ocorreu na década de 1940 (INGLE, 1949; BUETTNER et al., 2007). Posteriormente, diversos pesquisadores demonstraram a capacidade da ração HL em promover aumento da adiposidade, hiperglicemia, resistência à ação da insulina, dislipidemia e esteatose hepática (LI et al., 2007; DE MEIJER et al., 2010; KANG et al., 2010).

Nesse contexto, a despeito de não ter sido verificada diferença no peso final, constatamos que ratos submetidos à ração HL tiveram aumento substancial do ganho de peso, dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal e do percentual de gordura corporal em comparação aos animais que receberam ração controle. Apesar de o consumo de ração HL ter resultado em aumento da adiposidade corporal, optou-se por evitar o uso do termo “obesidade”, uma vez que, diferentemente de seres humanos, não há atualmente um critério amplamente aceito para caracterizar obesidade em roedores.

O aumento da gordura corporal induzido pelo consumo de ração HL é, muitas vezes, agravado pelo desenvolvimento de um comportamento hiperfágico, definido pelo consumo energético excessivo e não necessariamente pelo aumento da quantidade de ração consumida (HARROLD et al., 2000; DOURMASHKIN et al., 2005, 2006; FAM et al., 2007). Evidências recentes sugerem que a ração HL, particularmente quando rica em ácidos graxos saturados, induz um processo inflamatório em regiões específicas do hipotálamo, como o núcleo arqueado, o que promove *cross-talk* negativo com as vias de sinalização da leptina e da insulina. Como

consequência, desenvolve-se um estado de resistência central à ação desses hormônios, prejudicando seu efeito anorexígeno (MUNZBERG et al., 2004; DE SOUZA et al., 2005; PICARDI et al., 2008; ZHANG et al., 2008; MILANSKI et al., 2009). Além disso, é possível que a associação entre consumo de ração HL e hiperfagia em roedores esteja relacionada a uma redução da sensibilidade ao hormônio gastrointestinal colecistoquinina, no que se refere à supressão da ingestão alimentar e do esvaziamento gástrico (SAVASTANO e COVASA, 2005; SWARTZ et al., 2010).

Neste estudo, verificou-se que o consumo médio de ração foi inferior nos grupos que consumiram ração HL em relação aos grupos controle. Por outro lado, em razão da densidade energética da ração HL ser superior à da ração controle, o consumo calórico não diferiu entre os grupos. Outros trabalhos também não identificaram comportamento hiperfágico associado ao consumo de ração HL, apesar do aumento da gordura corporal (HERBERG et al., 1974; BELL et al., 1997; ELLIS et al., 2002), o que indica que a hiperfagia isoladamente parece não explicar o aumento de adiposidade induzido pelas rações HL.

São múltiplas as variáveis que podem interferir na relação entre consumo de ração HL e desenvolvimento de hiperfagia, como, por exemplo, a composição da dieta, o tempo de duração do protocolo experimental, a população estudada e a idade dos animais no início da intervenção. Em relação ao presente trabalho, notam-se duas diferenças fundamentais em comparação aos estudos que observaram hiperfagia induzida pela ração HL: a população estudada e a composição da dieta.

Como já mencionado, a população de estudo foi composta por ratos *Wistar*, linhagem não isogênica ou *outbred*. Outros pesquisadores que optaram pelo uso de linhagens não isogênicas relatam que, dentro de uma coorte de animais alimentados com ração HL, apenas uma parte da amostra desenvolve hiperfagia (CHANG et al., 1990; HARROLD et al., 2000). Por isso, a análise dos valores médios de consumo de ração dos grupos poderia levar a conclusões errôneas, tendo em vista a variabilidade de resposta dos animais. Neste trabalho, não foi possível avaliar tais diferenças, uma vez que

foram utilizados os valores médios de consumo de ração de acordo com a caixa em que os animais foram mantidos (de 2 a 3 ratos por caixa).

Como apresentado na seção Resultados, o grupo que recebeu a ração HL teve consumo energético superior ao grupo controle somente na primeira semana do protocolo experimental. Nas semanas subsequentes, o consumo energético do grupo HL passou a ser semelhante ao do grupo controle, sendo que, ao final de 12 semanas, não houve diferença no consumo de ração em quilocalorias entre os grupos. Em razão dos ingredientes da ração HL terem sido ajustados em função de sua densidade energética, a ingestão de proteínas e de micronutrientes foi comparável entre os grupos. Outros estudos que utilizaram o mesmo tipo de ajuste da ração HL não observaram hiperfagia em roedores (JOBGEN et al., 2009; SAFWAT et al., 2009).

Os trabalhos que relatam comportamento hiperfágico em roedores alimentados com ração HL não utilizam o ajuste da ração adotado neste estudo (HARROLD et al., 2000; DOURMASHKIN et al., 2005, 2006; FAM et al., 2007). Isso implica que a ração utilizada nesses trabalhos tem uma densidade menor de nutrientes. Desse modo, para ingerir quantidades suficientes de proteínas, ácidos graxos essenciais e micronutrientes, o animal tem de consumir uma quantidade superior de calorias, o que contribui para a explicação da ocorrência de hiperfagia (HARIRI e THIBAUT, 2010).

O ajuste por energia, realizado em nosso estudo, permitiu a interpretação dos dados sem o confundimento que variações na ingestão de nutrientes poderiam induzir nos desfechos estudados. Ao não considerar a densidade de nutrientes na ração HL, dietas não ajustadas podem resultar em ingestão marginal de nutrientes, o que, por sua vez, tem implicações importantes para fenômenos como inflamação, estresse oxidativo e sensibilidade à ação insulina (COHEN-LAHAV et al., 2006; WINTERGERST et al., 2007).

Ainda é importante ressaltar, apesar de o consumo dos grupos CON e HL ter sido isocalórico, que se notou efeito da ração HL em diversos parâmetros estudados, como adiposidade, resistência à ação da insulina e

resposta inflamatória de macrófagos peritoniais. Esse fato reforça que a composição da dieta tem influência marcante sobre a saúde, independentemente do consumo energético. A extrapolação desses dados para seres humanos sugere que estratégias para a redução do risco/controle da obesidade e da síndrome metabólica não podem limitar-se à restrição do consumo de calorias, devendo abranger também a qualidade da dieta.

É de suma importância relatar que não foram observados sintomas de intolerância à ração HL, como esteatorreia (fezes volumosas, acinzentadas/claras, mal cheirosas ou com aparência oleosa), ou de deficiência nutricional severa (mudança de comportamento ou da aparência dos pelos). Contudo, não é possível excluir a interferência do consumo de ração HL sobre a absorção intestinal de nutrientes, uma vez que isso não foi investigado de maneira sistemática.

Há evidências de que o maior incremento de gordura corporal decorrente do consumo de ração HL pode estar associado à maior eficiência em induzir ganho de peso por quilocaloria de ração consumida. Isso significa que o consumo de ração HL predispõe ao balanço energético positivo e à deposição de lipídeos nos tecidos, em especial no tecido adiposo (BENNETT et al., 1992; FLATT, 1995; GRUNDY, 1999).

Um fator que pode estar implicado nessa relação é a microbiota intestinal. Em 2004, BACKHED et al. (2004) observaram que animais criados de forma convencional tinham aumento de 42% de gordura corporal e de 47% de gordura periepididimal em comparação a camundongos *germ-free*. Ainda, a transferência da microbiota do intestino do camundongo convencional para o intestino do camundongo *germ-free* resultou em aumento de 57% da gordura corporal em 2 semanas, apesar de o consumo de ração ter diminuído. Esse dado trouxe à luz do conhecimento o importante papel que a microbiota intestinal desempenha na homeostase energética e seu potencial envolvimento na etiologia da obesidade.

Estudos subsequentes demonstraram que o consumo de ração HL provoca profundas alterações na composição da microbiota de roedores, fenômeno conhecido por disbiose (CANI et al., 2008; TURNBAUGH et al.,

2008; HILDEBRANDT et al., 2009). Camundongos *germ-free* são resistentes ao aumento da adiposidade induzido por ração rica em lipídeos e em açúcares, o que está associado à maior atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no fígado e no músculo e à maior expressão do fator adiposo induzido pelo jejum (Fiaf) no intestino delgado (BACKHED et al., 2007). Por outro lado, a inoculação da microbiota de camundongos convencionais alimentados com essa ração em animais *germ-free* resulta em aumento da adiposidade (TURNBAUGH et al., 2008).

Cabe ainda ressaltar que a disbiose associada ao consumo de ração HL está envolvida no aumento da permeabilidade intestinal, o que resulta em maior translocação de LPS do lúmen intestinal para a circulação sanguínea. Essa endotoxemia metabólica está associada ao incremento de gordura corporal, à intolerância à glicose e ao aumento da expressão de mediadores inflamatórios (PAI-1, IL-1, TNF- α e MCP-1) e da infiltração de macrófagos no tecido adiposo branco. Nesse contexto, a administração de antibióticos foi capaz de reduzir o acúmulo de gordura visceral, bem como as disfunções metabólicas associadas, apontando para um papel preponderante da microbiota intestinal no aumento de adiposidade induzido pela ração HL (CANI et al., 2008).

Outro aspecto que pode ter contribuído para explicar o aumento de gordura corporal observado no presente estudo seria o gasto energético vinculado ao efeito térmico dos alimentos (ETA). O ETA representa o gasto energético inerente aos processos de digestão, absorção, armazenamento e metabolismo dos nutrientes, o qual corresponde de 2 a 3% para lipídeos, 25 a 30% para proteínas e 6 a 8% para carboidratos. Sendo assim, a eficiência de utilização de lipídeos é de 97 a 98%, ao passo que proteínas variam entre 70 e 75% e carboidratos, de 92 a 94% (HARIRI e THIBAUT, 2010). Apesar de os animais consumirem quantidades isocalóricas de dieta, a composição da ração controle e experimental variou em sua composição de macronutrientes, o que pode resultar em uma diferença na eficiência de utilização das calorias consumidas.

Além de o consumo de ração HL ter levado ao aumento da adiposidade corporal, observou-se também um estado de resistência à ação da insulina, avaliado pelo índice HOMA-IR. Por outro lado, não foi encontrada manifestação de um quadro pró-inflamatório sistêmico, uma vez que não houve aumento da concentração de PAI-1, IL-6 e TNF- α no sangue periférico. Esses resultados vão de encontro com outros trabalhos em que o consumo de ração HL, particularmente quando elaborada à base de gordura animal, induz aumento de marcadores sistêmicos de inflamação (DE TAEYE et al., 2007; SAFWAT et al., 2009).

Como já mencionado, o ajuste da ração HL com base em suas calorias permitiu que os grupos HL e CON tivessem o mesmo consumo de proteínas, fibras alimentares, vitaminas e minerais. Diversos micronutrientes, como a vitamina D, o selênio e o zinco, têm a capacidade de reduzir a síntese de mediadores pró-inflamatórios, o que está, em grande parte, relacionado à redução da ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1. A administração *in vitro* de vitamina D em sua forma ativa, a 1,25(OH) $_2$ D $_3$, em culturas de macrófagos peritoniais estimulados com LPS, reduziu a ativação do NF- κ B e a síntese de TNF- α por essas células (COHEN-LAHAV et al., 2006). Outros micronutrientes, como vitaminas do complexo B, vitamina C, selênio, zinco, cobre e ferro, podem modular a inflamação por atuar diretamente em células do sistema imune ou por sua ação antioxidante (WINTERGERST et al., 2007). Sendo assim, é possível que a oferta adequada de nutrientes para os grupos alimentados com ração HL tenha atuado como um fator de proteção contra o desenvolvimento de um quadro sistêmico de inflamação.

Alguns pesquisadores têm adotado dietas de cafeteria, em detrimento de rações estritamente HL, como modelo de indução de síndrome metabólica em roedores (SAMPEY et al., 2011). Nessa dieta, são oferecidos diversos alimentos, como biscoitos, cereais refinados, doces, carnes processadas, queijo, dentre outros, o que a torna particularmente palatável e densa energeticamente. Em teoria, a dieta de cafeteria induziria alterações

metabólicas mais pronunciadas que a ração HL clássica, uma vez que estaria associada à intensa hiperfagia.

SAMPEY et al. (2011) compararam o efeito do consumo da dieta de cafeteria e da ração HL, elaborada à base de banha de porco (45% do total de kcal), por 15 semanas em ratos *Wistar* com sete a oito semanas de vida. Ambas resultaram em aumento da adiposidade, bem como da concentração de insulina e de ácidos graxos não esterificados no sangue. Todavia, a dieta de cafeteria induziu intolerância à glicose e exacerbou o acúmulo de gordura periepídimal. Cabe ressaltar que os animais alimentados com dieta de cafeteria consumiram uma quantidade de calorias 40% maior, ao passo que o consumo energético dos animais com ração HL não diferiu do grupo controle.

O estudo das dietas de cafeteria é fundamental, uma vez que esse modelo se aproxima mais do padrão de dieta contemporâneo composto por alimentos ricos em sódio, gordura saturada, gordura trans, açúcares e pobres em fibras. No entanto, a grande variação da composição da dieta dificulta conclusões sobre a relação causal entre nutrientes específicos e as alterações metabólicas observadas. Ainda, o fato de tais dietas serem também pobres em micronutrientes introduz um viés na interpretação sobre seus efeitos na inflamação e nas alterações metabólicas decorrentes.

Há uma série de evidências apontando para o aumento do número de macrófagos infiltrados no tecido adiposo em roedores alimentados com ração HL, fato que está atrelado ao aumento da adiposidade (LUMENG et al., 2007a, 2007b; FUJISAKA et al., 2009). Além disso, dados recentes indicam que o consumo de ração HL resulta em alteração do fenótipo predominante da população de macrófagos nesse tecido. Nesse sentido, Lumeng et al. (2007a, 2007b) observaram que, em camundongos C57BL/6 magros, os macrófagos presentes no tecido adiposo apresentam elevada expressão de IL-10, citocina com ação anti-inflamatória. Em contrapartida, o consumo de ração HL induziu um aumento do recrutamento de macrófagos com elevada expressão de TNF- α , IL-6, iNOS e CCR2, mediadores com ação pró-inflamatória.

Ao contrário do tecido adiposo, não se observa aumento da infiltração de macrófagos no fígado de roedores obesos. Por outro lado, há ativação da resposta inflamatória em células hepáticas, incluindo as células de Kupffer residentes, o que parece estar envolvido na etiologia da resistência hepática à insulina (BAFFY, 2009). Esses achados reforçam a hipótese de que os macrófagos têm uma participação central no desenvolvimento do estado pró-inflamatório e das disfunções metabólicas relacionadas ao consumo de ração HL por roedores.

Embora grande parte do conhecimento atual sobre a biologia de macrófagos advinha de estudos que analisaram macrófagos da cavidade peritoneal (STEINMAN et al., 1994), pouco se sabe a respeito do impacto da obesidade e do consumo de ração HL sobre a função dessas células. Neste estudo, ficou evidente que o efeito da ração HL sobre a capacidade de síntese de citocinas e de NO a partir de macrófagos peritoneais de ratos *Wistar* é absolutamente divergente em relação ao observado no tecido adiposo. Além de não ter sido constatado um aumento da síntese de mediadores pró-inflamatórios nas células não estimuladas, verificou-se redução da contagem de células mononucleares do peritônio, bem como redução da capacidade de síntese de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e NO, e de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10, nas células desafiadas com LPS.

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações induzidas pela ração HL na hemopoese, outro membro do nosso grupo de pesquisa efetuou a contagem total e diferencial de células presentes na medula óssea e no sangue periférico. Não foi verificada nenhuma alteração da contagem de células da linhagem monocítica-macrofágica na medula óssea ou no sangue periférico, indicando que a contagem reduzida de células mononucleares no lavado peritoneal não está associada a uma redução da produção dessas células (CARMO, 2011). Sendo assim, é plausível que a redução da contagem de células mononucleares no lavado peritoneal seja consequência do aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo.

No estudo de AMAR et al. (2007), o consumo de ração HL resultou em maior persistência e gravidade da infecção por *P. gingivalis*, o que foi associado à supressão da resposta inflamatória de macrófagos peritoniais de camundongos. Corroborando os resultados do presente estudo, os macrófagos dos animais que consumiram ração HL apresentaram redução da síntese de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, RANTES e MCP-1, quando incubados com *P. gingivalis* por 15 minutos ou 4 horas (*ex vivo*). Além disso, por meio do ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP), foi possível verificar que o consumo de ração HL implicou a redução da ligação do NF- κ B à região promotora do gene que codifica a IL-10 em macrófagos, após 30 minutos de estímulo com o LPS da *P. gingivalis*. É interessante destacar que, à semelhança do presente estudo, não houve aumento da concentração de IL-6 e de TNF- α no sangue periférico. O único marcador sistêmico de inflamação que sofreu influência da ração HL foi a proteína sérica amiloide A (SAA), envolvida na resposta de fase aguda.

Cabe destacar que nossos resultados indicam que o impacto da ração HL na redução da expressão gênica de IL-1 β e de IL-6 e na redução da síntese de IL-1 β , IL-6, IL-10 e NO, em macrófagos peritoniais estimulados com LPS, foi precedido de uma regulação negativa da via de sinalização canônica do fator de transcrição NF- κ B. Nesse contexto, observou-se redução da ativação da IKK- β e, por consequência, redução da degradação do I κ B- α nos macrófagos peritoniais estimulados dos ratos alimentados com ração HL. Surpreendentemente, quando estimuladas com LPS, as células dos animais que consumiram ração HL tiveram uma redução de 20% na ativação NF- κ B, ao passo que o mesmo estímulo, em células de animais que consumiram ração controle, resultou em aumento de 30% da ativação desse fator de transcrição.

Diversos estudos apontam para o papel de destaque dos receptores TLR-4 em mediar a resposta inflamatória de roedores submetidos à ração HL. O consumo de ração HL à base de gordura animal, como a banha de porco, resulta em aumento da concentração sanguínea de LPS e de ácidos

graxos saturados, ambos ligantes de TLR-4 (NGUYEN et al., 2007; FESSLER et al., 2009). Em consonância, a deleção do gene que codifica o TLR-4 em células mieloides é um fator de proteção para o desenvolvimento de inflamação e de resistência à ação da insulina em camundongos C57BL6, a despeito do aumento da adiposidade induzido pela ração HL (SABERI et al., 2009).

Em contrapartida, em macrófagos peritoniais de ratos alimentados com ração HL, observamos que a adição *ex vivo* de um ligante específico para TLR-4, ou seja, LPS oriundo de *E. coli*, não ativou a via clássica de sinalização do NF- κ B com a mesma intensidade apresentada pelo grupo controle. ZHOU et al. (2009) demonstraram que o consumo de ração HL por 16 semanas leva à redução da expressão gênica de TLR-4, de TLR-2 e de iNOS em macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de células coletadas da medula óssea. A redução da expressão gênica de TLR, em especial de TLR-4, é condizente com a redução da capacidade de síntese de mediadores inflamatórios, mediante estímulo com LPS, verificada no presente estudo.

Ainda no estudo de ZHOU et al. (2009), os animais alimentados com ração HL apresentaram redução substancial na fosforilação da quinase de serina/treonina Akt no resíduo de serina 473. Com o objetivo de melhor elucidar a importância dessa redução da ativação da Akt, os investigadores silenciaram o gene que codifica para essa proteína com o auxílio de RNA de interferência, o que provocou redução expressiva da ativação do NF- κ B e da expressão gênica de iNOS, TNF- α , IL-1 β e IL-10 nas células estimuladas com *P. gingivalis* por 4 horas. Cabe ainda ressaltar que a redução da ligação do NF- κ B nas regiões promotoras dos genes que codificam o TNF- α , a iNOS e a IL-10 foi também atribuída a alterações epigenéticas induzidas pela ração HL, uma vez que houve diminuição significativa da acetilação da histona H3 no resíduo de lisina 9 nas regiões promotoras dos genes supracitados (ZHOU, 2009, 2011).

Esses resultados sugerem que o consumo de ração HL acarrete em prejuízo à capacidade dos macrófagos peritoniais de responder a um estímulo bacteriano e de elaborar uma resposta inflamatória adequada. As

citocinas IL-1 β e IL-6 têm importância fundamental para a indução e para o controle da resposta inflamatória. Aliado a isso, a produção de NO é um dos mecanismos mais rápidos e eficazes na defesa contra infecções bacterianas.

Apesar dos dados recentes de que o consumo de ração HL resulta em maior persistência e gravidade de infecções bacterianas e que isso está associado à supressão da resposta inflamatória de macrófagos peritoneais (AMAR et al., 2007), não há estudos, até o momento, que tenham avaliado o efeito da ingestão de ração HL em parâmetros de funcionalidade dessa célula, como fagocitose e citotoxicidade. No entanto, em camundongos ob/ob, há redução da fagocitose de macrófagos alveolares e maior mortalidade por pneumonia induzida por *Streptococcus pneumoniae*. Todavia, uma vez que esses animais são deficientes em leptina, que tem papel crucial na indução da inflamação, o tratamento com leptina reverteu esse fenômeno (MANCUSO et al., 2006). Por outro lado, em outro estudo, a capacidade de *killing* de macrófagos peritoneais (*Candida parapsilosis*) frente a um estímulo inflamatório (tioglicolato 3%) apresentou-se reduzida em camundongos ob/ob quando comparados ao controle, sendo que o tratamento dessas células com leptina não reverteu esse quadro (COUSIN et al., 2001).

A supressão da resposta inflamatória e a redução da funcionalidade de macrófagos residentes frente a um estímulo infeccioso podem explicar, em parte, o comprometimento imunológico observado em indivíduos obesos. Esse fato é de extrema importância, tendo em vista a tendência mundial de evolução do padrão alimentar (“dieta ocidental”) e de aumento da proporção de obesos e de idosos (AGARWAL e BUSSE 2010). Soma-se a isso o fato de que países de baixa e média renda enfrentam, nos dias atuais, uma dupla carga de doenças, traduzida pela coexistência das DCNT e de doenças infecciosas, o que torna particularmente danosa a possível associação entre o consumo de dietas hipercalóricas e o comprometimento da imunidade inata (NARAYAN et al., 2010).

Conforme exposto, estes resultados, bem como dados da literatura, demonstram que o consumo crônico de ração HL provoca redução da capacidade inflamatória de macrófagos peritoniais frente a um estímulo de origem bacteriana, o que pode ter importância decisiva na resposta do organismo contra esses patógenos. Tal evidência conduz a uma série de questionamentos. Por que o consumo de ração HL resulta nesse tipo de resposta? Quais são as vias de sinalização que medeiam essa relação? Qual a implicação desse fenômeno?

Atualmente, haja vista o estado da arte da literatura, não é possível responder a eles. Não obstante, um fator que provavelmente está envolvido é a elevada plasticidade funcional dos macrófagos, ou seja, a alta capacidade de mudança de fenótipo em resposta a diferenças em seu microambiente. Um fato que ilustra o fenômeno mencionado é a elevada especialização dessas células em função de sua localização anatômica, o que resulta em amplo espectro de células com características peculiares, a exemplo das células de Kupffer, dos osteoclastos, dos macrófagos alveolares, dentre outros.

A capacidade em se adaptar a uma condição aguda de inflamação exacerbada é um mecanismo crucial para a proteção do hospedeiro contra o choque por endotoxinas (ex: LPS). O exemplo clássico desse mecanismo é a tolerância ao LPS (TL), fenômeno em que células ou organismos previamente expostos a pequenas concentrações da endotoxina entram em um estado transitório de baixa responsividade a desafios subsequentes com LPS. Em outras palavras, eles desenvolvem uma espécie de “tolerância” à endotoxina, o que resulta em supressão da síntese de citocinas pró-inflamatórias e protege a célula da toxicidade e da letalidade. O fenômeno tem sido observado *in vitro* e *in vivo*, em modelos animais e em seres humanos. A TL é relatada em situações clínicas como sepse, trauma, cirurgia e pancreatite (BISWAS e LOPEZ-COLLAZO, 2009).

Conforme anteriormente exposto, o consumo de ração HL resulta em alteração da composição da microbiota e em aumento da permeabilidade intestinal, o que leva ao aumento da concentração circulante de LPS,

fenômeno conhecido por endotoxemia metabólica (CANI et al 2009; NAITO et al 2011). Sendo assim, é possível inferir que a endotoxemia metabólica associada ao consumo de ração HL tenha participado do quadro de baixa responsividade ao LPS observado neste estudo. Soma-se a isso o fato de que o consumo de ração HL aumenta a exposição a ácidos graxos saturados de cadeia longa, que são também ligantes do TLR4. Nesse contexto, o tratamento prévio de macrófagos, obtidos a partir de precursores da medula óssea, com uma mistura de ácido palmítico e oleico, que compõe a maior parte dos ácidos graxos presentes na circulação sanguínea, resultou em redução da expressão gênica de iNOS, TNF- α , IL-1 β e IL-10 após estímulo com *P. gingivalis* (ZHOU et al., 2009).

Em algumas condições de “inflamação estéril”, associadas à elevada produção de TNF- α , como síndrome coronariana aguda, estresse pós-cirúrgico e lesões hepáticas de isquemia-reperfusão, observa-se um quadro semelhante à TL em monócitos (KAWASAKI et al., 2001; LANGDALE et al., 2003; DEL FRESNO et al., 2007). Em um artigo recentemente publicado, PARK et al. (2011) demonstraram que o pré-tratamento *in vivo* com TNF- α de macrófagos primários de humanos e de camundongos acarreta em supressão da expressão de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF- α e iNOS) mediante o desafio com LPS, cujo fato foi associado a “downregulation” da sinalização mediada por TLR-4. Os autores também observaram que, nos macrófagos previamente expostos ao TNF- α , o estímulo com LPS resultava em rápida reversão da degradação do I κ B- α (a partir de 15 minutos do estímulo), sendo que a expressão da proteína retornou ao basal após 60 minutos. Essa inibição da sinalização pelo TLR4, em consequência ao pré-tratamento com TNF- α , foi ocasionada pela indução da proteína A20, que regula negativamente a via do NF- κ B por múltiplos mecanismos, por exemplo, interferindo em proteínas que atuam “upstream” à IKK, como a TAK-1, TRAF 2/6, TRADD e RIP1 (VERSTREPEN et al., 2010).

Essa interrupção da sinalização induzida pelo TLR4 tem uma implicação importante para o presente estudo. A ativação inicial da via de

sinalização do NF- κ B pelo LPS poderia permitir a indução de genes de “resposta rápida”, como o gene do TNF- α , nos macrófagos peritoniais. Por outro lado, a interrupção precoce dessa via de sinalização reduziria a expressão de genes de resposta mais tardia, como o da IL-6 (WOLLENBERG et al., 1993).

Extrapolando esses resultados para o presente estudo, é possível que nós não tenhamos verificado diferenças na síntese de TNF- α de macrófagos submetidos à ração HL, após o estímulo com LPS, em razão de se tratar de um gene induzido precocemente. Além disso, essa ausência de efeito da ração HL na síntese de TNF- α pode estar relacionada ao momento de coleta do sobrenadante da cultura celular (24 horas). A concentração de citocina no sobrenadante da cultura celular é um produto da somatória de tudo o que foi produzido no período, exceto o que, eventualmente, foi degradado. Sendo assim, como o TNF- α é induzido precocemente, é possível que os macrófagos do grupo HLBL, ao final de 24 horas, tenham conseguido equiparar sua produção dessa citocina à do grupo CONBL. Apesar de não ter sido feita uma curva cinética da produção de TNF- α , os resultados relativos à expressão de TNF- α corroboram essa hipótese, uma vez que após quatro horas já não se observou efeito da incubação com LPS sobre a expressão gênica dessa citocina.

Neste estudo, não foi verificado aumento da concentração circulante de TNF- α ou de sua síntese por macrófagos peritoniais, o que torna questionável a participação dessa citocina na indução desse quadro de “baixa responsividade” ao LPS. Contudo, é possível que a síntese dessa molécula por outras células tenha atuado de maneira parácrina, modulando a resposta dos macrófagos ao LPS.

Uma outra possibilidade é que a ração HL não tenha induzido modificação do fenótipo dos macrófagos residentes no peritônio, mas sim que tenha levado a uma mudança da população dessas células na cavidade peritonal. Nesse sentido, GHOSN et al. (2010) demonstram que 90% dos macrófagos peritoniais de camundongos tinham um fenótipo similar. Contudo, dois a quatro dias após a inoculação *in vivo* de componentes

“inflamatórios” (LPS e tioglicolato), havia uma “repopulação” da cavidade peritoneal por macrófagos bastante distintos em termos morfológicos e funcionais. Tais células expressavam menor quantidade de TLR4 e apresentavam uma supressão da síntese de NO após estímulo com LPS *ex vivo*.

Surpreendentemente, no presente estudo, foi observada redução da síntese de mediadores pró-inflamatórios nas células estimuladas, bem como redução da produção de IL-10, reconhecida por suas propriedades anti-inflamatórias. Essa redução da IL-10 pode ser explicada pela regulação negativa da via do TLR ou até mesmo pela redução da síntese de mediadores pró-inflamatórios, os quais induzem a expressão de IL-10, o que funciona como um mecanismo de *feedback* negativo (BEZBRADICA e MEDZHITOV, 2009).

Na tentativa de categorizar diferentes subpopulações de macrófagos, muitos pesquisadores adotam a classificação de macrófagos em M1 ou M2, definida com base na divisão de linfócitos em Th1 e Th2. O fenótipo M1 corresponderia a macrófagos ativados de forma clássica, caracterizados pela elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias e de NO. Já o fenótipo M2 representaria aqueles ativados de forma alternativa, caracterizados pela baixa expressão de mediadores pró-inflamatórios e pela elevada expressão de IL-10 (MANTOVANI et al., 2004; GORDON e TAYLOR, 2005; ZEYDA e STULNIG, 2007). Contudo, esse modelo bimodal vem recebendo críticas, uma vez que a complexidade e a heterogeneidade do fenótipo de macrófagos, decerto, transpõem essa classificação (STOUT et al., 2009). A exemplo disso, no nosso estudo, a redução da síntese de mediadores pró-inflamatórios não foi acompanhada por um aumento da produção de IL-10, mas sim por uma redução.

5.2 ETAPA 2 - EFEITO DA INGESTÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE

Em relação à erva-mate, assim como em outros estudos (PANG et al., 2008; ARCARI et al., 2009, 2011), observamos que sua administração resultou em redução do ganho de peso e da gordura corporal, sem que houvesse alteração do consumo de ração. Há evidências de que o consumo de erva-mate induz um balanço energético negativo por meio do aumento do gasto energético e da oxidação de lipídeos, o que, possivelmente, é mediado pelo aumento da expressão gênica de proteínas desacopladoras (UCP) e pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK)- α (LIANG e WARD, 2006; PANG et al., 2008; ARÇARI et al., 2009, 2011).

Neste sentido, ARÇARI et al. (2009) demonstraram que o consumo do extrato aquoso de erva-mate, administrado via gavagem (1 g/kg de peso), por camundongos alimentados com ração HL aumenta a expressão da UCP-1 e do coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas (PGC)-1 α no tecido adiposo marrom. As UCP-1 localizam-se na membrana interna da mitocôndria e atuam dissipando o gradiente de prótons e desacoplando a fosforilação oxidativa da cadeia de transporte de elétrons, tendo como resultado a produção de calor e a redução da eficiência de formação de ATP. O aumento da expressão de UCP-1 foi acompanhado do aumento da expressão de PGC-1 α , que tem a capacidade de interagir com o PPAR- α , aumentando a transcrição da UCP-1 (LIANG e WARD, 2006). Em outro estudo, o consumo de erva-mate, adicionada à ração, reverteu a redução da expressão gênica da UCP-2 e da UCP-3 induzida pela ração HL no tecido adiposo branco periepídídimo, cujo fato pode estar associado à presença de metilxantinas em sua composição (PANG et al., 2008). Cabe ainda ressaltar que as metilxantinas presentes na erva-mate, como a cafeína e a teofilina, tem a capacidade de inibir a enzima fosfodiesterase 3B, o que resulta em aumento da concentração intracelular de cAMP. Tal fato leva à

ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que promove a fosforilação da enzima lipase hormônio sensível e das perilipinas, aumentando a atividade lipolítica (HURSEL e WESTERTERP, 2010).

A redução da gordura corporal resultante do consumo de erva-mate, neste estudo, pode também ter relação com o aumento da oxidação de ácidos graxos decorrente da maior atividade da AMPK- α pela fosforilação do resíduo Thr 172 (PANG et al., 2008). A AMPK- α , em sua forma ativa, fosforila e inativa a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), reduzindo o *pool* intracelular de malonil-CoA, substrato para a síntese de ácidos graxos e inibidor da enzima carnitina-palmitoil transferase (CPT) 1, enzima limitante da β -oxidação (KAHN et al., 2005). Há ainda evidências de que a administração *in vitro* de erva-mate resulta em inibição da atividade da lipase pancreática, o que pode contribuir para a redução da absorção de lipídeos e, desse modo, para a redução do acúmulo de gordura corporal (MARTINS et al., 2010).

No presente estudo, foi possível observar que a redução do ganho de peso e de gordura corporal promovida pelo consumo da *I. paraguariensis* foi acompanhada de uma melhora significativa de marcadores clássicos de risco cardiometabólico, como, por exemplo a concentração plasmática de insulina e o índice HOMA-IR. Vale ressaltar que tais efeitos da erva-mate, provavelmente, não são unicamente decorrentes da redução da gordura corporal, mas também são resultado de um efeito direto e independente da erva-mate. Nesse sentido, a ativação da AMPK no fígado pode resultar em aumento da oxidação de ácidos graxos e em inibição da lipogênese, da síntese de colesterol e de glicose, fatores que podem ter contribuído para a melhora da sensibilidade à insulina (KAHN et al., 2005; VIOLLET et al., 2009).

Observou-se ainda que a erva-mate atenuou biomarcadores sistêmicos de inflamação como o TNF- α e a IL-6. No trabalho de ARÇARI et al. (2009), o impacto da erva-mate na diminuição do quadro inflamatório induzido pela ração HL foi acompanhado por redução da infiltração de macrófagos no tecido adiposo periepídimal. No presente estudo, apesar de não ser

possível estabelecer uma relação direta, é possível inferir que a normalização da contagem de células viáveis da cavidade peritoneal tenha relação com a redução da migração de macrófagos para o tecido adiposo em resposta aos efeitos anti-inflamatórios da erva-mate.

Dados recentes da literatura demonstram que o consumo de erva-mate por roedores alimentados com ração HL reduz a inflamação não apenas no tecido adiposo branco, mas também no fígado e no músculo esquelético (ARÇARI et al., 2011). O conhecimento sobre a capacidade da erva-mate em modular a resposta inflamatória de macrófagos fundamenta-se, em sua totalidade, em estudos *in vitro* (PUANGPRAPHANT e DE MEJIA, 2009; PUANGPRAPHANT et al., 2011). Sendo assim, este projeto é o primeiro a avaliar o impacto da suplementação *in vivo* com *I. paraguariensis* sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoniais.

Nesse sentido, cabe destacar que os resultados deste estudo não reproduziram os resultados dos estudos *in vitro*, que apontam para um potencial efeito da erva-mate sobre a síntese de mediadores pró-inflamatórios por macrófagos, como IL-1 β , IL-6 e NO. Todavia, é relevante enfatizar que os trabalhos *in vitro* que investigam mecanismos de ação de CBA, em geral, fazem uso de padrões puros, em concentrações muito superiores àsquelas observadas *in vivo* (BASTOS et al., 2009). Outro aspecto importante é que esses estudos não consideram a biodisponibilidade dos CBA presentes no alimento, fator determinante para que os CBA atinjam seus tecidos-alvo e desempenhem sua atividade biológica. São diversos os fatores que afetam a biodisponibilidade dos CBA, sendo alguns deles: a complexidade da matriz (alimento), a forma química da substância de interesse, a interação com outros componentes do alimento, a motilidade intestinal e a metabolização pela microbiota intestinal. Nesse contexto, por exemplo, estima-se que cerca de 40 a 75% da curcumina ingerida, CBA com potente ação anti-inflamatória encontrado na *Curcuma longa* L., seja excretada pelas fezes (ANAND et al., 2007).

Cabe ainda destacar que, frequentemente, na passagem pelo trato digestório, os CBA são metabolizados e convertidos em outras substâncias.

O ácido clorogênico, por exemplo, um dos principais fenólicos presentes no extrato aquoso de *I. paraguariensis*, é minimamente absorvido no intestino delgado e sofre intensa transformação pela microbiota intestinal, sendo que cerca de metade do que é absorvido não se encontra em sua forma química original (GONTHIER et al., 2003; OLTROF et al., 2003). O mesmo se aplica ao resveratrol, presente em alimentos como o vinho tinto, o qual é encontrado na circulação sanguínea na forma conjugada, e não como aglicona, forma amplamente utilizada pelos estudos *in vitro* (WENZEL e SOMOZA, 2005).

Cabe ressaltar que há características deste estudo que ferem a extrapolação desses resultados para modelos *in vivo* em animais e em seres humanos. A primeira delas refere-se ao fato de a avaliação da síntese de mediadores inflamatórios pelos macrófagos peritoniais ter se processado *ex vivo*. O simples fato de retirar a célula de seu microambiente e submetê-la à cultura celular pode provocar alterações no fenótipo que tornam questionável a representatividade das observações *ex vivo* em situações *in vivo*. A exemplo disso, GHOSH et al. (2010) observaram que o padrão de síntese de NO de macrófagos peritoniais de animais previamente estimulados com LPS ou tioglicolato divergia quando avaliado *in vivo* ou *ex vivo*.

Outro fato que deve ser ressaltado é a forma de administração da erva-mate. Optou-se por utilizar a dose de 1 g/kg de peso/dia, o que corresponde à ingestão de cerca de 2,8 L de chá mate por um indivíduo de 70 kg. Essa dose foi ministrada em um único momento com a finalidade de minimizar o sofrimento e o estresse dos animais, provocados pelo procedimento de gavagem. Contudo, é relevante mencionar que a administração da erva-mate em *bolus* não reproduz a situação cotidiana, tendo em vista que as pessoas consomem erva-mate, via de regra, em doses fracionadas, o que implica quantidades menores, mas uma exposição mais prolongada aos seus componentes. É importante ressaltar que, apesar da elevada dose de erva-mate administrada, não foram observados efeitos colaterais, como, por exemplo, alterações comportamentais.

6. CONCLUSÃO

A ingestão crônica de ração HL, mesmo na ausência de hiperfagia, resultou em aumento da gordura corporal e em redução da sensibilidade à insulina. O efeito da ração HL sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoneais foi bastante divergente em comparação ao observado, na literatura, nos macrófagos infiltrados no tecido adiposo e nas células de Kupffer. O consumo dessa ração suprimiu parcialmente a resposta inflamatória de macrófagos peritoneais, quando incubados com LPS, o que foi associado à redução da ativação da via de sinalização do NF- κ B. A administração *in vivo* de erva-mate não reproduziu o efeito da administração *in vitro* de seus CBA no que se refere à inibição da ativação do NF- κ B em macrófagos. Embora a ingestão de erva-mate não tenha influenciado a resposta inflamatória dessas células, houve redução do percentual de gordura corporal e dos marcadores de inflamação sistêmicos, assim como melhora da sensibilidade à insulina, demonstrando um potencial benefício da erva-mate na redução do risco de DCNT.

7. REFERÊNCIAS

1. Agarwal S, Busse PJ. Innate and adaptive immunosenescence. *Annals of Allergy Asthma & Immunology*. 2010;104(3):183-90.
2. Albanese A, Orto L. Protein and amino acids. In: Albanese A, editor. *Newer methods of nutritional biochemistry: with applications and interpretations*. New York: Academic Press; 1963. p. 84.
3. Alberti K, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
4. Amar S, Zhou QD, Shaik-Dasthagirisheb Y, Leeman S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(51):20466-71.
5. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: Problems and promises. *Molecular Pharmaceutics*. 2007;4(6):807-18.
6. Anas A, van der Poll T, de Vos AF. Role of CD14 in lung inflammation and infection. *Critical Care*. 2010;14(2):209.
7. Arcari DP, Bartchewsky W, Jr., dos Santos TW, Oliveira KA, DeOliveira CC, Gotardo EM, et al. Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011;335(2):110-5.

8. Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, et al. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*. 2009;17(12):2127-33.
9. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine*. 2005;11(2):191-8.
10. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(44):15718-23.
11. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JL. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104(3):979-84.
12. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *Journal of Hepatology*. 2009;51(1):212-23.
13. Bastos DH, Rogero MM, Areas JA. [Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation]. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2009;53(5):646-56.
14. Bastos DHM, de Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PdO, Ribeiro ML. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. 2007a;1(1):37-46.
15. Bastos DHM, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*. 2007b;12(3):423-32.
16. Bell RR, Spencer MJ, Sherriff JL. Voluntary exercise and monounsaturated canola oil reduce fat gain in mice fed diets high in fat. *Journal of Nutrition*. 1997;127(10):2006-10.

17. Bennett C, Reed GW, Peters JC, Abumrad NN, Sun M, Hill JO. Short-term effects of dietary-fat ingestion on energy-expenditure and nutrient balance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1992;55(6):1071-7.
18. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2005;96(9):939-49.
19. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*. 2004;40(12):845-59.
20. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(2):169-76.
21. Bezbradica JS, Medzhitov R. Integration of cytokine and heterologous receptor signaling pathways. *Nature Immunology*. 2009;10(4):333-9.
22. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in Immunology*. 2009;30(10):475-87.
23. Bixby M, Spieler L, Menini T, Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sciences*. 2005;77(3):345-58.
24. Bracesco N, Sanchez A, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;136(3):378-84.
25. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. 2007;15(4):798-808.
26. Caamano J, Hunter CA. NF-kappa B family of transcription factors: Central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(3):414-29.
27. Cai DS, Yuan MS, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappa B. *Nature Medicine*. 2005;11(2):183-90.

28. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of US adults. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(15):1097-105.
29. Cancello R, Clement 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*. 2006;113(10):1141-7.
30. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
31. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58(8):1091-103.
32. Carmo LS. Proliferação e diferenciação *in vitro* de células mononucleares medulares após estímulo com fatores de crescimento em ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica [minuta da dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; 2011.
33. Cave MC, Hurt RT, Frazier TH, Matheson PJ, Garrison RN, McClain CJ, et al. Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition. *Nutrition in Clinical Practice*. 2008;23(1):16-34.
34. Chandra S, de Mejia EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(11):3583-9.
35. Chang S, Graham B, Yakubu F, Lin D, Peters JC, Hill JO. Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats. *American Journal of Physiology*. 1990;259(6):R1103-R10.

36. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, et al. Preadipocyte conversion to macrophage - Evidence of plasticity. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(11):9850-5.
37. Choban PS, Flancbaum L. The impact of obesity on surgical outcomes: A review. *Journal of the American College of Surgeons*. 1997;185(6):593-603.
38. Choban PS, Heckler R, Burge JC, Flancbaum L. Increased incidence of nosocomial infections in obese surgical patients. *American Surgeon*. 1995;61(11):1001-5.
39. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987;162(1):156-9.
40. Chung S, LaPoint K, Martinez K, Kennedy A, Sandberg MB, McIntosh MK. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology*. 2006;147(11):5340-51.
41. Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, 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. *Faseb Journal*. 2004;18(14):1670-81.
42. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NF kappa B activity by increasing I kappa B alpha levels. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006;21(4):889-97.
43. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81(2):341-54.
44. Cousin S, Andre M, Casteilla L, Penicaud L. Altered macrophage-like functions of preadipocytes in inflammation and genetic obesity. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;186(3):380-6.
45. Czarnetzky B, Cowan D, Belcher R, . The effects of polyanions on NBT reduction hexose monophosphat shunt activity and ultrastructure

- of polymorphonuclear leucocytes. *American Journal of Clinical Pathology*. 1975;64:34-40.
46. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity*. 2008;16(6):1248-55.
  47. De Meijer VE, Le HD, Meisel JA, Sharif MRA, Pan A, Nose V, et al. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. *Metabolism-Clinical and Experimental*. 2010;59(8):1092-105.
  48. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146(10):4192-9.
  49. De Taeye BM, Novitskaya T, McGuinness OP, Gleaves L, Medda M, Covington JW, et al. Macrophage TNF-alpha contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007;293(3):E713-E25.
  50. Del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gomez-Pina V, Gonzalez-Leon MC, Gomez-Garcia L, et al. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *Journal of Endotoxin Research*. 2007;13(1):39-52.
  51. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection*. 2002;4(9):903-14.
  52. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *International Journal of Obesity*. 2005;29(11):1368-78.
  53. Dourmashkin JT, Chang GQ, Hill JO, Gayles EC, Fried SK, Leibowitz SF. Model for predicting and phenotyping at nonnal weight the long-

- term propensity for obesity in Sprague-Dawley rats. *Physiology & Behavior*. 2006;87(4):666-78.
54. Du SF, Lu B, Zhai FY, Popkin BM. A new stage of the nutrition transition in China. *Public Health Nutrition*. 2002;5(1A):169-74.
  55. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappa B. *Oncogene*. 2006;25(51):6868-86.
  56. Egger G, Dixon J. Inflammatory effects of nutritional stimuli: further support for the need for a big picture approach to tackling obesity and chronic disease. *Obesity Reviews*. 2010;11(2):137-49.
  57. Egger G, Dixon J. Obesity and chronic disease: always offender or often just accomplice? *British Journal of Nutrition*. 2009;102(8):1238-42.
  58. Ehres JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(9):2356-70.
  59. Ellis J, Lake A, Hoover-Plow J. Monounsaturated canola oil reduces fat deposition in growing female rats fed a high or low fat diet. *Nutrition Research*. 2002;22(5):609-21.
  60. Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, Leonardson AS, Zink F, Zhu J, et al. Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature*. 2008;452(7186):423-U2.
  61. Fallon H, Frei E, Davison J, Trier J, Burk D. Leucocyte preparations from human blood: evaluation of their morphologic and metabolic state. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1962;59:779-91.
  62. Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Kebede M, Andrikopoulos S, Proietto J, et al. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes Obesity & Metabolism*. 2007;9:840-52.
  63. Ferrante AW. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *Journal of Internal Medicine*. 2007;262:408-14.

64. Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology*. 2009;20(5):379-85.
65. Filip R, Ferraro GE. Researching on new species of "Mate": *Ilex brevicuspis* - Phytochemical and pharmacology study. *European Journal of Nutrition*. 2003;42(1):50-4.
66. Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*. 2000;20(10):1437-46.
67. Flatt JP. Body-composition, respiratory quotient, and weight maintenance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995;62(5):S1107-S17.
68. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;100(2):171-94.
69. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, et al. Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*. 2009;58(11):2574-82.
70. Galli C, Calder PC. Effects of Fat and Fatty Acid Intake on Inflammatory and Immune Responses: A Critical Review. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2009;55(1-3):123-39.
71. Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulea S, van der Made I, Gijbels MJJ, Kardakaris R, et al. Endothelial Cell-Specific NF-kappa B Inhibition Protects Mice from Atherosclerosis. *Cell Metabolism*. 2008;8(5):372-83.
72. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(6):2568-73.

73. Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Remesy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Journal of Nutrition*. 2003;133(6):1853-9.
74. Gonzalez A, Ferreira F, Vazquez A, Moyna P, Paz EA. Biological screening of uruguayan medicinal-plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 1993;39(3):217-20. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64.
75. Green LC, Deluzuriaga KR, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1981;78(12):7764-8.
76. Grundy SM. The optimal ratio of fat-to-carbohydrate in the diet. *Annual Review of Nutrition*. 1999;19:325-41.
77. Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;224(2):338-44.
78. Hamalainen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappa B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappa B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*. 2007; 2007:45673.
79. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*. 2010;23(2):270-99.
80. Harlow MB, Lane D. *Antibody*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
81. Harrold JA, Widdowson PS, Clapham JC, Williams G. Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2000;279(2):E340-E7.

82. Harrold JA, Williams G, Widdowson PS. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: Key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Journal of Neurochemistry*. 2000;74(3):1224-8.
83. Heck CI, De Mejia EG. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*. 2007;72(9):R138-R51.
84. Herberg L, Doppen W, Major E, Gries FA. Dietary-induced hypertrophic-hyperplastic obesity in mice. *Journal of Lipid Research*. 1974;15(6):580-5.
85. Higuchi R., et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 1992;10(4):413-7.
86. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716-24.
87. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
88. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):923-34.
89. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor-necrosis-factor-alpha - direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
90. Hursel R, Westerterp-Plantenga MS. Thermogenic ingredients and body weight regulation. *International Journal of Obesity*. 2010;34(4):659-69.
91. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2004.

92. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Produção da extração vegetal e da silvicultura 2009 [June 16th]; Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1760.
93. Ingle DJ. A Simple means of producing obesity in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1949;72(3):604-5.
94. Jaiswal R, Sovdat T, Vivan F, Kuhnert N. Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(9):5471-84.
95. Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, Li P, Lee M-J, Smith SB, et al. Dietary L-Arginine Supplementation Reduces White Fat Gain and Enhances Skeletal Muscle and Brown Fat Masses in Diet-Induced Obese Rats. *Journal of Nutrition*. 2009;139(2):230-7.
96. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*. 2005;1(1):15-25.
97. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa KI, Kitazawa R, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(6):1494-505.
98. Kang JH, Tsuyoshi G, Han IS, Kawada T, Kim YM, Yu R. Dietary Capsaicin Reduces Obesity-induced Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Obese Mice Fed a High-fat Diet. *Obesity*. 2010;18(4):780-7.
99. Karlsson EA, Beck MA. The burden of obesity on infectious disease. *Experimental Biology and Medicine*. 2010;235(12):1412-24.
100. Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. 2005;17(4):338-44.

101. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 2010;11(5):373-84.
102. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
103. Kawamoto E, Lepsch L, Boaventura M, Munhoz C, Lima L, Yshii L, 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*. 2008;86:845-60.
104. Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, Tomihisa T, Okamoto K, Shigematsu A. Surgical stress induces endotoxin hyporesponsiveness and an early decrease of monocyte mCD14 and HLA-DR expression during surgery. *Anesthesia and Analgesia*. 2001;92(5):1322-6.
105. Kennedy A, Martinez K, Chuang C-C, LaPoint K, McIntosh M. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. *Journal of Nutrition*. 2009;139(1):1-4.
106. King W, Paulson S, Puckett N, Krebs A. Cell death: the effect of injury on the entrance of vital dye in Erlich tumor cells. *American Journal of Pathology*. 1959;35:1067-75.
107. Kishino E, Ito T, Fujita K, Kiuchi Y. A mixture of the *Salacia reticulata* (Kotala himbutu) aqueous extract and cyclodextrin reduces the accumulation of visceral fat mass in mice and rats with high-fat diet-induced obesity. *Journal of Nutrition*. 2006;136(2):433-9.
108. Koshihara Y, Neichi T, Murota SI, Lao AN, Fujimoto Y, Tatsuno T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1984;792(1):92-7.

109. Kraemer KH, Taketa ATC, Schenkel EP, Gosmann G, Guillaume D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemistry*. 1996;42(4):1119-22.
110. Krakauer T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2002;24(1):113-9.
111. Langdale LA, Kajikawa O, Frevert C, Liggitt HD. Sustained tolerance to lipopolysaccharide after liver ischemia-reperfusion injury. *Shock*. 2003;19(6):553-8.
112. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(20):16683-9.
113. Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes ND, Monteiro CA. Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). *Revista De Saude Publica*. 2005;39(4):530-40.
114. Li JZ, Ye J, Xue BF, Qi JZ, Zhang J, Zhou ZH, et al. Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation. *Diabetes*. 2007;56:2523-32.
115. Li QT, Verma IM. NF-kappa B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(10):725-34.
116. Li S-Y, Chang C-Q, Ma F-Y, Yu C-L. Modulating Effects of Chlorogenic Acid on Lipids and Glucose Metabolism and Expression of Hepatic Peroxisome Proliferator-activated Receptor-alpha in Golden Hamsters Fed on High Fat Diet. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2009;22(2):122-9.
117. Liang H, Ward W. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education*. 2006;30(4):141-51. Liu WH, Saint

- DA. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;294(2):347-53.
118. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007a;117(1):175-84.
  119. Lumeng CN, DeYoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007b;56(1):16-23.
  120. Lumeng CN, Deyoung SM, Saltiel AR. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007c;292(1):E166-E74.
  121. Mancuso P, Huffnagle GB, Olszewski MA, Phipps J, Peters-Golden M. Leptin corrects host defense defects after acute starvation in murine pneumococcal pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;173(2):212-8.
  122. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004;25(12):677-86.
  123. Martins F, Noso TM, Porto VB, Curiel A, Gambero A, Bastos DHM, et al. Mate Tea Inhibits In Vitro Pancreatic Lipase Activity and Has Hypolipidemic Effect on High-fat Diet-induced Obese Mice. *Obesity*. 2010;18(1):42-7.
  124. Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arcari DP, Ribeiro ML, Markowicz Bastos DH, et al. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *British Journal of Nutrition*. 2009;101(4):527-32.

125. Mathis D, Shoelson SE. Foreword Immunometabolism: an emerging frontier. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(2):81-3.
126. Matsumoto RLT, Bastos DHM. Effects of Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(5):1775-80.
127. 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 concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9.
128. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
129. Medzhitov R, PrestonHurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-7.
130. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, 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*. 1999;59(10):2347-52.
131. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(2):359-70.
132. Miranda DDC, Arcari DP, Pedrazzoli J, Jr., Carvalho PdO, Cerutti SM, Bastos DHM, et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. 2008;23(4):261-5.

133. Mirzoeva OK, Yaqoob P, Knox KA, Calder PC. Inhibition of ICE-family cysteine proteases rescues murine lymphocytes from lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis. *Febs Letters*. 1996;396(2-3):266-70.
134. Monteiro CA, Levy RB, Claro RM, de Castro IRR, Cannon G. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. *Public Health Nutrition*. 2011;14(1):5-13.
135. Morgan OW, Bramley A, Fowlkes A, Freedman DS, Taylor TH, Gargiullo P, et al. Morbid Obesity as a Risk Factor for Hospitalization and Death Due to 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Disease. *Plos One*. 2010;5(3).
136. Mosimann ALP, Wilhelm D, da Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors*. 2006;26(1):59-70.
137. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(12):958-69.
138. Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 2004;145(11):4880-9.
139. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research*. 2008;49(7):1562-8.
140. Mushegian A, Medzhitov R. Evolutionary perspective on innate immune recognition. *Journal of Cell Biology*. 2001;155(5):705-10.
141. Naito E, Yoshida Y, Makino K, Kounoshi Y, Kunihiro S, Takahashi R, Matsuzaki T, Miyazaki K, Ishikawa F. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *Journal of Applied Microbiology*. 2011;110(3):650-7.

142. Narayan KMV, Ali MK, Koplan JP. GLOBAL HEALTH Global Noncommunicable Diseases - Where Worlds Meet. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(13):1196-8.
143. Nardini M, Leonardi F, Scaccini C, Virgili F. Modulation of ceramide-induced NF-kappa B binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: Comparison with other antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;30(7):722-33.
144. Nguyen MTA, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282:35279-92.
145. Olmos A, Giner RM, Recio MC, Rios JL, Gil-Benso R, Manez S. Interaction of dicaffeoylquinic derivatives with peroxynitrite and other reactive nitrogen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;475(1):66-71.
146. Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman M, van Amelsvoort JMM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *Journal of Nutrition*. 2003;133(6):1806-14.
147. Omenn GS. Evolution and public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:1702-9.
148. Pang J, Choi Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;476(2):178-85.
149. Park S, Park-Min K, Chen J, Hu X, Ivashkiv L. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nature Immunology*. 2011;12(7):607-15.

150. Picardi PK, Calegari VC, Prada PD, Moraes JC, Araujo E, Marcondes CCG, et al. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology*. 2008;149(8):3870-80.
151. Pomilio AB, Trajtemberg S, Vitale AA. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2002;13(4):235-41.
152. Popkin BM. The nutrition transition and obesity in the developing world. *Journal of Nutrition*. 2001;131(3):871S-3S.
153. Puangraphant S, Berhow MA, Vermillion K, Potts G, Gonzalez de Mejia E. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF-kappaB nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res*. 2011. Epub 2011/06/10.
154. Puangraphant S, de Mejia EG. Saponins in Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and Quercetin Synergistically Inhibit iNOS and COX-2 in Lipopolysaccharide-Induced Macrophages through NF kappa B Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(19):8873-83.
155. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & Development*. 2007;21(12):1443-55.
156. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents - final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*. 1993;123(11):1939-51.
157. Ribani M, Bottoli C, Collins C, Jardim I, Melo L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 2004;27(5):771-80.

158. Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. *Journal of Applied Physiology*. 2005;98(1):3-30.
159. Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Memórias do Instituto Butantan*. 1947;20:315-28.
160. Saberi M, Woods NB, de Luca C, Schenk S, Lu JC, Bandyopadhyay G, et al. Hematopoietic Cell-Specific Deletion of Toll-like Receptor 4 Ameliorates Hepatic and Adipose Tissue Insulin Resistance in High-Fat-Fed Mice. *Cell Metabolism*. 2009;10(5):419-29.
161. Safwat GM, Pisano S, D'Amore E, Borioni G, Napolitano M, Kamal AA, et al. Induction of non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance by feeding a high-fat diet in rats: does coenzyme Q monomethyl ether have a modulatory effect? *Nutrition*. 2009;25(11-12):1157-68.
162. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: *Molecular cloning*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p. 174-184.
163. Sampey B, Vanhoose A, Winfield H, Freemerman A, Muehlbauer M, Fueger P, et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity*. 2011;19(6):1109-17.
164. Savastano DM, Covasa M. Adaptation to a high-fat diet leads to hyperphagia and diminished sensitivity to cholecystokinin in rats. *Journal of Nutrition*. 2005;135(8):1953-9.
165. Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011;377(9781):1949-61.
166. Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *Journal of Nutrition*. 2007;137(5):1236-43.

167. Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naugler W, et al. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metabolism*. 2007;6:386-97.
168. Steinman RM, Moberg CL. Cohn, Zanvil, Alexander, 1926-1993. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179(1):1-30.
169. Stout RD, Watkins SK, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2009;86(5):1105-9.
170. Stuckler D, Basu S, McKee M. Drivers of Inequality in Millennium Development Goal Progress: A Statistical Analysis. *Plos Medicine*. 2010;7(3): e1000241.
171. Swartz TD, Savastano DM, Covasa M. Reduced Sensitivity to Cholecystokinin in Male Rats Fed a High-Fat Diet Is Reversible. *Journal of Nutrition*. 2010;140(9):1698-703.
172. Tallman DL, Taylor CG. Effects of dietary fat and zinc on adiposity, serum leptin and adipose fatty acid composition in C57BL/6J mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2003;14(1):17-23.
173. Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *Journal of Endotoxin Research*. 2005;11(1):5-11.
174. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology*. 2002;23(6):301-4.
175. Tsan MF, Gao BC. Endogenous ligands of toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;76(3):514-9.
176. Tschop M, Heiman ML. Rodent obesity models: An overview. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2001;109(6):307-19.

177. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mousedistal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3(4):213-23.
178. UN - United Nations . UN Millennium Development Goals (MDG). 2002 [cited 2011 May 27th]. Available at: <http://www.un.org/millenniumgoals>.
179. U.S. Department of Health and Human Services. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology In: FDA, editor. International Conference on Harmonisation (ICH); Rockville: U.S. Department of Health and Human Services; 1996. p. 1-10.
180. VanderJagt TJ, Ghattas R, VanderJagt DJ, Crossey M, Glew RH. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences*. 2002;70(9):1035-40.
181. Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Nolen GT, Phanavanh B, Starks T, et al. Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2009;296(6):E1300-E10.
182. Verstrepen L, Verhelst K, van Loo G, Carpentier I, Ley SC, Beyaert R. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochemical Pharmacology*. 2010;80(12):2009-20.
183. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiologica*. 2009;196(1):81-98.
184. Wang J, Mazza G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(4):850-7.

185. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(1):115-24.
186. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005;49(5):472-81.
187. WHO - World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. Geneva: World Health Nutrition, 2003. Report No.: 916.
188. WHO - World Health Organization. Preventing chronic diseases: a vital investment. Geneva: World Health Organization, 2005.
189. Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2007;51:301-23.
190. Wollenberg GK, DeForge LE, Bolgos G, Remick DG. Differential expression of tumor necrosis factor and interleukin-6 by peritoneal macrophages in vivo and in culture. *Am J Pathol*. 1993;143(4):1121-30.
191. World Economy Forum. Global risks 2011 [cited 2011 May 27th]. Available at: <http://riskreport.weforum.org/>
192. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-52.
193. Zaporozhets OA, Krushynska OA, Lipkovska NA, Barvinchenk VN. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(1):21-5.
194. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunology Letters*. 2007;112(2):61-7.

195. Zhang XQ, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai DS. Hypothalamic IKK beta/NF-kappa B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135(1):61-73.
196. Zhou QD, Leeman SE, Amar S. Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(7):2867-72.
197. Zhou QD, Leeman SE, Amar S. Signaling mechanisms involved in altered function of macrophages from diet-induced obese mice affect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(26):10740-5.

CURRÍCULO LATTES

Maria Carolina Borges

Nutricionista. Mestranda do Programa de Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. Tem experiência na área de Nutrição com ênfase em Nutrigenômica e Imunonutrição (**Texto informado pelo autor**)

Última atualização do currículo em 19/08/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/6917413921663903>

Dados pessoais

Nome Maria Carolina Borges

Nome em citações bibliográficas BORGES, M.C.;Borges, Maria Carolina

Sexo Feminino

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

Formação acadêmica/Titulação

- 2009-atual** Mestrado em andamento em Nutrição em Saúde Pública .
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
Título: Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoneais de ratos Wistar, *Ano de Obtenção:* 2011.
Orientador: Marcelo Macedo Rogero.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ,FAPESP ,Brasil .
Palavras-chave: inflamação; dieta hiperlipídica; erva-mate; macrófagos; fator nuclear-kappa B.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Nutrição.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Imunologia.
- 2004 - 2008** Graduação em Nutrição .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ,FAPESP ,Brasil .

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 26/07/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/6607279993080828>

Dados pessoais

Nome Marcelo Macedo Rogero

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

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.
Orientador: Julio Orlando Tirapegui Toledo.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ,CNPq ,Brasil .
- 1999 - 2002** Mestrado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7) .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeitos do exercício e da suplementação com L-glutamina e L-alanil L-glutamina sobre as concentrações de glutamina no plasma, músculo e fígado em ratos, *Ano de Obtenção:* 2002.
Orientador: Julio Orlando Tirapegui Toledo.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior .

Palavras-chave: Exercício; suplementação; L-glutamina; L-alanil-L-glutamina; Rato; Sistema Imune.

Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos.

1991 - 1994 Graduação em Nutrição .
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Orientador: Ignez salas Martins.
Bolsista do(a): Coordenadoria de Assistência Social da Universidade de São Paulo .