

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

CAROLINE BERTONCINI SILVA

**Perfil lipídico, inflamatório e microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à suplementação de diferentes doses de curcumina**

RIBEIRÃO PRETO

2022

CAROLINE BERTONCINI SILVA

**Perfil lipídico, inflamatório e microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à suplementação de diferentes doses de curcumina**

**Versão corrigida.** A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica.

Área de concentração: Clínica Médica  
Orientadora: Profa. Dra. Vivian M. Miguel Suen  
Co-orientadora: Profa. Dra. Priscila Giacomo Fassini

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Caroline Bertoncini

Perfil lipídico, inflamatório e microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à suplementação de diferentes doses de curcumina. Ribeirão Preto, 2022.

106 p. :23il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.  
Orientadora: Suen, Vivian Marques Miguel.

1. Curcumina. 2. Prevenção. 3. Obesidade 4. Inflamação.  
5. Fitoterapia. 6. Microbiota intestinal

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Caroline Bertoncini Silva

Perfil lipídico, inflamatório e microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à suplementação de diferentes doses de curcumina.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a)

---

Instituição:

---

Julgamento:

---

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e processo nº 2018/06094-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## *Dedicatória*

*A minha mãe, que durante todo percurso se dedicou com muito amor e carinho para que eu chegasse onde estou hoje e para tornar minha vida acadêmica possível, e a minha irmã, que também da sua forma esteve sempre presente. Por estarem juntas em todos os momentos difíceis e nos de vitória.*

## *Agradecimentos*

*Agradecer é admitir para si mesmo que se precisou de alguém. Por isso, expresso a minha gratidão:*

*Primeiramente, a **Deus** por guiar meus passos e iluminar meus caminhos e por ter me dado sabedoria mesmo quando os momentos foram os mais difíceis.*

*Ao **meu amado pai Marcelo** (saudades eternas), pelo amor que me mostrou a direção correta e me ensinou a ter fé na vida. A **minha amada mãe Ana Paula**, que sempre me apoiou, forneceu apoio e incentivo aos meus estudos. Sei que minha educação exigiu sacrifícios, e esse trabalho é uma pequena forma de agradecer tudo o que investiu em mim. A **minha amada irmã Isabela**, pelo companheirismo, parceria e força em todos os momentos. Ao **meu tio Dênis**, por sempre me apoiar e impulsionar em direção às vitórias dos meus desafios. Ao **meu padrasto Luiz** (in memoriam), pelo apoio em diversos momentos.*

*Ao **meu companheiro de vida, André**, pelo apoio incessante, pela ajuda, motivação e por sonhar comigo. Ter você ao meu lado também nessa etapa foi essencial.*

*A **minha orientadora, Profa. Dr<sup>a</sup>. Vivian Marques Miguel Suen**, que além de ser uma orientadora admirável, grande amiga, é inspiração de conduta profissional e pessoal, pela oportunidade, confiança, apoio, paciência e ensinamento. Obrigada por acreditar que eu era capaz e por ampliar meus horizontes.*

*A **minha coorientadora, Dr<sup>a</sup>. Priscila Giacomo Fassini**, pelo companheirismo e paciência, por não ter medido esforços para me ajudar, dar ideias e, pelas considerações e sugestões feitas no desenvolvimento deste trabalho. Aquela que se tornou fonte de inspiração diária.*

*Ao Laboratório de Imunorregulação de Doenças Metabólicas, especialmente à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela Carlos, pelo auxílio técnico com as dosagens de insulina, perfil lipídico, expressão proteica e microbiota intestinal, além de todo conhecimento compartilhado e paciência de sempre.*

*Ao laboratório de Patologia e Medicina Legal RPM, em especial à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leandra Ramalho, pelo auxílio com análise das lâminas histológicas e a Deisy M. da Silva.*

*Ao laboratório Multiusuário de Pesquisa Molecular e de Cultura de Células do Departamento de Patologia, em especial à Sheila Sanches, pelo auxílio com a dosagem de triglicerídeos hepáticos e LDL.*

*Ao laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial a Maria Ap. Nunes Ferreira (Cici), ao Marcel Nani Leite, pelo auxílio com eutanásia e armazenamento de materiais e a Natália Ap. de Paula pelo auxílio com análise da expressão gênica e por toda paciência e dedicação.*

*A pós-doutoranda Diane Meyre Rassi, por todo conhecimento compartilhado, pelas valiosas conversas, sugestões e críticas essenciais para esse trabalho.*

*A toda comissão da secretaria de pós-graduação em Clínica Médica, especialmente ao secretário Emerson Quirino, pela boa vontade de sempre em responder minhas perguntas, pela atenção dispensada e ajuda em questões burocráticas nesses anos de pesquisa.*

*A todos os amigos, colegas do doutorado, pesquisadores do LANNEN, equipe do laboratório de nutrição do HC (Júlia, Luiza e Sônia), pela boa convivência, pelas trocas de conhecimentos e sempre boa vontade em ajudar.*

*A **Cássia Machado** que de “colega de trabalho” passou a ser aquela amiga que sempre conseguiu me entender e ouvir, em todos os momentos. Aquela que vibrou, chorou, desesperou e se alegrou junto, que sempre me motivou. A sua amizade foi e é essencial.*

*Aos queridos amigos **Marina Rodrigues, Letícia Bizari, Aldrina Honorato e Anderson Gregorio**, as amizades e as trocas de conhecimentos foram essenciais, além de ajudarem a tornar o trabalho mais “leve”. Gratidão pelas discussões produtivas, conselhos, apoios e companhias.*

*Aos **técnicos do biotério**, especialmente ao **Roni** que estive presente, ajudando, auxiliando e fazendo companhia durante a dedicação deste trabalho.*

*A **Máira Peres**, da FCFRP pelo auxílio com a preparação da curcumina.*

*Aos professores **Dr. Júlio Sérgio Marchini, Dr<sup>a</sup> Ana Vitória Barban Margutti e Dr<sup>a</sup>. Carolina Nicoletti Ferreira**, pela contribuição com as válidas sugestões fornecidas no Exame de Qualificação.*

*Aos **membros da banca avaliadora desta tese**, pela colaboração e sugestões enriquecedoras ao trabalho.*

*A **CAPES e FAPESP**, por confiarem na minha pesquisa, pelo respaldo científico e financeiro, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Ninguém vence sozinho, então, deixo a todos o meu sincero e eterno agradecimento.*

## RESUMO

Silva, C. B. **Perfil lipídico, inflamatório e microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à suplementação de diferentes doses de curcumina** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2022.

Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que aproximadamente 13% da população mundial adulta são indivíduos com obesidade. Como causa comum da obesidade, o desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia, resulta em acúmulo excessivo de gordura corporal e inflamação crônica de baixo grau. A curcumina é encontrada no rizoma da *Curcuma longa* L. Diversos estudos têm demonstrado os efeitos dessa substância em distúrbios metabólicos, inflamação e obesidade. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito de diferentes doses de curcumina na microbiota intestinal, no peso corporal, no perfil lipídico e glicídico e no perfil inflamatório de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Avaliaram-se 50 camundongos machos, os quais foram divididos em 5 grupos de 10 animais cada: dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH), dieta hiperlipídica com 50 mg/kg de peso de curcumina (DHC50), dieta hiperlipídica com 250 mg/kg de peso de curcumina (DHC250) e dieta hiperlipídica com 500 mg/kg de peso de curcumina (DHC500). Durante o período experimental (12 semanas), avaliou-se a ingestão alimentar e o peso corporal semanalmente. O teste de tolerância a glicose foi realizado 48 horas antes da eutanásia. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e realizada a coleta de sangue, amostra de fezes e tecidos para análises bioquímicas, histológicas e moleculares. Todas as análises consideraram significância de 5% e foram feitas por Kruskal-Wallis e ANOVA. Ao observar a porcentagem de ganho de peso, o grupo DP apresentou menor ganho em comparação aos demais e, apesar de não diferente, o grupo DHC50 apresentou menor ganho (~16%) comparado ao grupo DH. Para o tecido adiposo marrom, observou-se maior peso nos grupos DHC250 e DHC50 (43% e 29%, respectivamente) comparados ao grupo DH. Ao analisar a expressão proteica de IL-10 no tecido adiposo epididimal, notou-se aumento nos grupos DHC250 e DHC500 comparados ao grupo DH. Para expressão gênica de TNF- $\alpha$  no fígado e no tecido adiposo retroperitoneal, observou-se que as três doses promoveram redução comparadas ao grupo DH. Já para a IL-10, quando analisada no fígado, observou-se um aumento nas doses 50mg e 250mg quando comparadas ao grupo DH. Aumento na expressão gênica de marcador de macrófago M2 (MRC-1) também foi observado nas doses de 250mg e 500mg. Sobre a microbiota intestinal, ao nível de filo, para Actinobacteria, os grupos DHC250 e DHC500 tiveram a abundância aumentada em comparação ao grupo DH. Para Proteobacteria, o grupo DHC50 apresentou diminuição da abundância (~49%) quando comparado ao grupo DH. Ao nível de gênero, redução de *Bacteroides* foi observada nos grupos DHC50 e DHC500 comparados ao grupo DH e aumento de *Clostridium cluster XIVa* foi observado nos grupos DHC50 e DHC250 comparados ao grupo DH. No geral, pode-se concluir que os efeitos da curcumina são possivelmente dose-dependentes, especificamente, uma dose menor de curcumina parece ser mais eficaz do que doses mais altas, como observado no perfil da microbiota intestinal e na resposta inflamatória.

**Palavras-chave:** Curcumina. Prevenção. Obesidade. Inflamação. Fitoterapia. Microbiota intestinal

## ABSTRACT

Silva, C. B. **Lipid, inflammatory profile and gut microbiota of C57BL/6 mice fed a high-fat diet submitted to supplementation with different doses of curcumin** [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2022.

Data from the World Health Organization estimates that approximately 13% of the adult world population are individuals with obesity. As a common cause of obesity, an imbalance between energy intake and expenditure, results in an excessive accumulation of body fat and low-grade chronic inflammation. Curcumin is found in the rhizome of *Turmeric longa* L. Several studies have demonstrated the effects of this substance in metabolic disorders, inflammation, and obesity. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of different doses of curcumin on the gut microbiota, on body weight, on the lipid and glycid profile and on the inflammatory profile of mice fed a high-fat diet. Fifty male mice were evaluated, which were divided into 5 groups of 10 animals each: standard diet (SD), high-fat diet (HFD), high-fat diet with 50 mg/kg of body weight of curcumin (HFDC50), high-fat diet with 250 mg/kg of body weight of curcumin (HFDC250) and high-fat diet with 500 mg/kg of body weight of curcumin (HFDC500). During the experimental period (12 weeks), food intake and body weight were assessed weekly. The glucose tolerance test was performed 48 hours before euthanasia. At the end of the experiment, the animals were euthanized and blood, stool and tissue samples were collected for biochemical, histological and molecular analysis. All analysis considered a significance of 5% and were made by Kruskal-Wallis and ANOVA. When observing the percentage of weight gain, the SD group had a lower gain when compared to others and, although not different, the HFDC50 group had a lower gain (~16%) compared to the HFD group. For brown adipose tissue, greater weight was observed in the HFDC250 and HFDC50 groups had a greater weight of this tissue (43% and 29%, respectively) compared to the HFD group. When analyzing the protein expression of IL-10 in the epididymal adipose tissue, an increase was observed in the HFDC250 and HFDC500 groups when compared to the HFD group. For TNF- $\alpha$  gene expression in the liver and in the retroperitoneal adipose tissue, it was observed that the three doses promoted a reduction when compared to the HFD group. As for IL-10, when analyzed in the liver, there was an increase in doses of 50mg and 250mg compared to the HFD group. An increase in M2 macrophage marker gene expression (MRC-1) was also observed at 250mg and 500mg doses. Regarding the gut microbiota, at phylum level, for Actinobacteria, the HFDC250 and HFDC500 groups had an increased abundance when compared to the HFD group. For Proteobacteria, the HFDC50 group showed a decrease in abundance (~49%) when compared to the HFD group. At gender level, a reduction in *Bacteroides* was observed in the HFDC50 and HFDC500 groups compared to the HFD group and an increase in *Clostridium cluster XIVa* was observed in the HFDC50 and HFDC250 groups compared to the HFD group. In general, it can be concluded that the effects of curcumin are possibly dose-dependent, specifically, a lower dose of curcumin appears to be more effective than higher doses, as observed in the gut microbiota profile and in the inflammatory response.

**Key words:** Curcumin. Prevention. Obesity. Inflammation. Phytotherapy. Gut microbiota.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Planta de <i>Curcuma longa</i> L. mostrando rizoma e caule.....	21
<b>Figura 2</b> - Estrutura química dos pigmentos curcuminóides isolados do rizoma da <i>Curcuma longa</i> L. ....	23
<b>Figura 3</b> - Alvos moleculares modulados pela curcumina.....	25
<b>Figura 4</b> - Interações entre a curcumina e a microbiota intestinal. ....	30
<b>Figura 5</b> - Organograma de divisão dos grupos e tempos de tratamento.....	37
<b>Figura 6</b> - Agulha curva de aço inox BD-10 utilizada na gavagem e curcumina utilizada na suplementação (Ref: C1386 Sigma – Aldrich).....	40
<b>Figura 7</b> - Pistilo utilizado para dissociação mecânica dos fragmentos de tecido. ...	45
<b>Figura 8</b> - Gel de agarose (1,5%) indicando a integridade de RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 18s e 28s.....	47
<b>Figura 9</b> - Peso corporal (g) ao longo do período experimental (A). Porcentagem de ganho de peso ao final do período experimental (B). ....	52
<b>Figura 10</b> - Ingestão alimentar (g) ao longo do período experimental (A). Ingestão alimentar total (g) ao final do período experimental (B).....	53
<b>Figura 11</b> - Porcentagem das gorduras totais hepáticas analisadas ao final do período experimental.....	55
<b>Figura 12</b> - Teste de tolerância a glicose (GTT) (A). Área sob a curva (AUC) (B)....	56
<b>Figura 13</b> - Análise histológica do fígado nos diferentes grupos experimentais. ....	57
<b>Figura 14</b> - Análise histológica do pâncreas nos diferentes grupos experimentais. .	58
<b>Figura 15</b> - Análise histológica do intestino delgado nos diferentes grupos experimentais. ....	59
<b>Figura 16</b> - Análise histológica do intestino grosso nos diferentes grupos experimentais. ....	60
<b>Figura 17</b> - Taxa de expressão proteica no tecido adiposo epididimal de IL-10 (A), IL-17 (B) e TNF- $\alpha$ (C) analisadas ao final do período experimental. ....	63
<b>Figura 18</b> - Taxa de expressão gênica relativa de TNF- $\alpha$ (A) e de IL-10 (B) no fígado, calculada pelo método $2^{\Delta\Delta CT}$ a partir de CT obtidos de RT-PCR, usando o gene $\beta$ -actina como gene referência.....	64
<b>Figura 19</b> - Taxa de expressão gênica relativa de TNF- $\alpha$ (A) e de IL-10 (B) no tecido adiposo retroperitoneal, calculada pelo método $2^{\Delta\Delta CT}$ a partir de CT obtidos de RT-PCR, usando o gene $\beta$ -actina como gene referência. ....	65

<b>Figura 20</b> - Taxa de expressão gênica relativa de TNF- $\alpha$ (A) e de IL-10 (B) no tecido adiposo epididimal, calculada pelo método $2^{\Delta\Delta CT}$ a partir de CT obtidos de RT-PCR, usando o gene $\beta$ -actina como gene referência.....	65
<b>Figura 21</b> - Taxa de expressão gênica relativa de MRC-1 (A), de Arginase-1 (B), de TLR-4 (C) e de MCP-4 (D) no tecido adiposo epididimal, calculada pelo método $2^{\Delta\Delta CT}$ a partir de CT obtidos de RT-PCR, usando o gene $\beta$ -actina como gene referência. ....	67
<b>Figura 22</b> - Abundância relativa dos filos <i>Firmicutes</i> (A), <i>Bacteroidetes</i> (B), <i>Actinobacteria</i> (C) e <i>Proteobacteria</i> (D) expressos na microbiota intestinal.....	69
<b>Figura 23</b> - Abundância relativa dos gêneros <i>E. coli</i> (A), <i>Bacteroides</i> (B), <i>Clostridium cluster XIVa</i> (C) e <i>Clostridium cluster IV</i> (D) expressos na microbiota intestinal. ....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais filos e gêneros encontrados na microbiota intestinal humana. ....	27
<b>Tabela 2</b> - Composição química das dietas hiperlipídica (AIN 93 HF 60%) e padrão (AIN-93G).....	39
<b>Tabela 3</b> - Sequência de <i>primers</i> utilizados para determinação das bactérias da microbiota intestinal de interesse neste estudo. ....	43
<b>Tabela 4</b> - Sequência de <i>primers</i> utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real. ....	48
<b>Tabela 5</b> - Peso dos tecidos** nos diferentes grupos experimentais. ....	54
<b>Tabela 6</b> - Análise do perfil bioquímico realizado ao final do estudo nos diferentes grupos experimentais. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 $\beta$ -HSD1	<i>11<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase type 1</i>
AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
Arg-1	Arginase-1
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i>
CDNA	<i>Complementary DNA</i>
CETP	<i>Cholesteryl ester Transfer Protein</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate Sensitive Response Element Binding Protein</i>
CIM	<i>Carbohydrate-Insulin Model</i>
CMC	<i>Carboximetilcelulose</i>
CT	Colesterol Total
cT	<i>Cycle Threshold</i>
DEPC	<i>Diethyl Pyrocarbonate</i>
DH	Dieta Hiperlipídica
DHC	Dieta Hiperlipídica com Curcumina
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DP	Dieta Padrão
EBM	<i>Energy Balance Model</i>
FP	<i>Forward Primer</i>
GF	<i>Germ-Free</i>
GTT	<i>Glucose Tolerance Test</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HE	Hematoxilina de Harris e Eosina
HF	<i>High Fat</i>
HFD	<i>High Fat Diet</i>
IA	Índice Aterogênico
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12

IL-17	Interleucina-17
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MCP-4	<i>Macrophage/monocyte Chemotactic Protein-4</i>
MRC-1	<i>Mannose Receptor C-Type 1</i>
MI	Microbiota Intestinal
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor Kappa b</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
NTC	<i>No Template Control</i>
NRT	<i>No Reverse Transcriptase</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPAR- $\alpha$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha</i>
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
RI	Resistência à Insulina
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RP	<i>Reverse Primer</i>
RTq-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time</i>
SREBP-1c	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c</i>
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAE	Tecido Adiposo Epididimal
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TAR	Tecido Adiposo Retroperitoneal
TG	Triglicérides
TLR-4	<i>Toll Like Receptor 4</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
UCP1	<i>Uncoupling Protein 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGF-R2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3 HIPÓTESE .....</b>	<b>34</b>
<b>4 OBJETIVO .....</b>	<b>35</b>
4.1 Objetivo Geral .....	35
4.2 Objetivos Específicos .....	35
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
5.1 Delineamento experimental.....	37
5.2 Tratamento dos animais .....	38
5.3 Composição das dietas, análise do consumo alimentar e suplementação.....	39
5.4 Avaliação ponderal.....	41
5.5 Teste de tolerância a glicose (GTT) .....	41
5.6 Eutanásia dos animais .....	41
5.7 Microbiota intestinal.....	42
5.7.1 Quantificação de DNA bacteriano por PCR quantitativo .....	42
5.8 Avaliações bioquímicas .....	43
5.9 Análise da expressão gênica.....	44
5.9.1 Extração de RNA total .....	45
5.9.2 Quantificação total e avaliação de integridade do RNA.....	46
5.9.3 Tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	47
5.9.4 RTq-PCR para a expressão tecidual de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, MRC-1, Arg-1, TLR-4 e MCP-4.....	48
5.9.5 Análise da Expressão Gênica .....	49
5.10 Análise histológica.....	50
5.11 Medição do teor de gordura hepática .....	50
5.12 Expressão proteica.....	51
5.13 Análise estatística.....	51
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
6.1 Peso corporal .....	52

6.2 Ingestão alimentar .....	53
6.3 Peso dos tecidos .....	54
6.4 Gorduras totais hepáticas.....	54
6.5 Teste de tolerância a glicose (GTT) .....	55
6.6 Análise histológica.....	56
6.7 Perfil bioquímico .....	61
6.8 Expressão proteica.....	62
6.9 Expressão gênica .....	63
6.10 Microbiota intestinal.....	68
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>106</b>
ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP (CEUA-FMRP).....	106

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve uma rápida expansão na prevalência mundial da obesidade (WHO, 2018) e essa tem se caracterizado como uma epidemia mundial. A literatura baseada em evidências descreve a obesidade como uma condição médica crônica de etiologia multifatorial, incluindo fatores genéticos, ambientais, metabólicos e comportamentais (Upadhyay et al., 2018).

De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde. O índice de massa corporal (IMC) é um índice simples de peso para altura e é utilizado de forma frequente para classificar o estado nutricional de adultos e definir a presença de sobrepeso e obesidade. Um indivíduo com IMC entre 25 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> apresenta excesso de peso e uma pessoa é considerada com obesidade quando apresenta IMC maior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup> (WHO, 2018).

Além disso, a obesidade é resultante do desequilíbrio energético a longo prazo entre o excesso de calorias ingeridas e as poucas calorias gastas (modelo de balanço energético – EBM, do inglês *energy balance model*). No entanto, a literatura traz que esse modelo pode ser insuficiente para esclarecer a pandemia de obesidade e, como alternativa, o modelo carboidrato-insulina (CIM, do inglês *carbohydrate-insulin model*) tem sido investigado a fim de elucidar melhor as alterações hormonais e metabólicas em resposta à composição da dieta (Hill; Wyatt; Peters, 2013).

De acordo com o modelo CIM, um papel importante no armazenamento de energia é exercido pela carga glicêmica da refeição, uma vez que em uma refeição composta de alimentos de alto índice glicêmico, observa-se aumento na insulina e redução do glucagon. Dessa forma, se a dieta apresenta alto índice glicêmico, é possível notar respostas hormonais (insulina e outros hormônios) a esse tipo de dieta, ocasionando em aumento da deposição de gordura corporal, o que conseqüentemente favorece um balanço energético positivo (Ludwig et al., 2021).

Dentre as complicações geralmente associadas a obesidade, a resistência insulínica (RI), a dislipidemia, e a esteatose hepática são extensivamente pesquisadas e relatadas (Global Burden of Disease, 2017). Para a maioria dessas

comorbidades, a perda de peso pode resultar em uma melhora significativa (Pi-Sunyer, 2009; Kushner, 2014).

Dados da OMS mostraram que em 2016 mais de 1,9 bilhões de adultos, com 18 anos de idade ou mais, estavam com sobrepeso e mais de 650 milhões eram obesos (WHO, 2018).

Estatísticas recentes revelam que em muitos pacientes, a obesidade exibe as atribuições típicas de um estado de doença, que incluem sinais e/ou sintomas específicos, fisiopatologia distinta, redução da qualidade de vida e aumento no risco de complicações/mortalidade (Rubino et al., 2020).

Conceitos emergentes envolvem vários eventos patogênicos no desenvolvimento e avanço de complicações da obesidade, incluindo estresse oxidativo e inflamação crônica de baixo grau (Skalicky et al., 2008).

Determinantes importantes da saúde metabólica são o IMC e a adiposidade total. Entretanto, variáveis como distribuição de gordura corporal e função do tecido adiposo comprometida, melhor predizem as alterações metabólicas relacionadas com a obesidade, como a RI (Goossens, 2017). A gordura subcutânea tem uma correlação muito menor com o risco cardiometabólico, quando comparada à gordura visceral, que possui uma atividade metabólica menos benéfica. A gordura hepática tem uma associação mais próxima com a RI. Embora essa gordura esteja relacionada com a gordura visceral, seu efeito na resistência à insulina é independente do tecido adiposo visceral (Müller et al., 2012; Mazzocchi, 2016).

Existem dois tipos de tecido adiposo, cujas funções parecem ser claramente distintas. O tecido adiposo branco (TAB) armazena as reservas de energia como gordura, enquanto oxidação lipídica para produzir calor é a função metabólica do tecido adiposo marrom. Para preservar a homeostase energética é importante que exista um equilíbrio entre eles. O TAB apresenta diferentes perfis metabólicos em seus diferentes locais. Apesar da célula característica do tecido adiposo ser o adipócito, este não é o único tipo celular presente no tecido adiposo, nem o mais abundante (Ràfols, 2014).

O TAB é conhecido como o maior órgão de armazenamento de energia na forma de triglicérides, que são mobilizados através do processo de lipólise, para fornecer substrato energético a outros órgãos e propiciar substratos ao fígado para gliconeogênese (glicerol) e síntese de lipoproteínas (ácidos graxos livres). Além da função central de armazenamento de lipídeos, esse órgão também possui

importante função endócrina secretando vários hormônios, como adiponectina e leptina, e um conjunto de outras proteínas (adipocinas). Essas adipocinas compreendem citocinas clássicas, fatores de crescimento e proteínas da via alternativa do sistema complemento. Há uma lista crescente de adipocinas envolvidas na inflamação, como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *tumor necrosis factor-alpha*), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-12 (IL-12) (Large et al., 2004).

É bem estabelecido que a obesidade esteja associada a inflamação crônica de baixo grau e a RI (Gangarapu et al., 2014; Moran; Shanahan, 2014; Remely et al., 2014). O tecido adiposo branco é o tecido adiposo mais importante, uma vez que exerce um papel central nesse estado inflamatório (Raybould, 2012).

Há um aumento da produção de citocinas no tecido adiposo branco na obesidade e, em seguida, uma infiltração de macrófagos (Little; Feinle-Bisset, 2011; Shen; Obin; Zhao, 2013). Esta infiltração aumenta as citocinas pró-inflamatórias e, por sua vez, induz a RI (Kim et al., 2012). A resposta inflamatória da obesidade leva também à redução de adipocinas com propriedades anti-inflamatórias, como a adiponectina (Bulló et al., 2007).

A inflamação sistêmica crônica na obesidade resulta da hipertrofia dos adipócitos, ocasionando respostas imunes locais do tecido adiposo. Células adiposas e os macrófagos infiltrados são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-6 e TNF- $\alpha$ , que participam do início da RI (Ouchi et al., 2011; Kwon; Pessin, 2013). Ademais, essas adipocinas são consideradas fortes indutoras da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (Fernández-Sánchez et al., 2011; Kwon; Pessin, 2013). Níveis de ROS aumentados podem estar envolvidos na ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, do inglês *fator nuclear kappa B*), que por sua vez pode aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Morgan; Liu, 2011).

Observa-se também que o gene arginase-1 (Arg-1) tem sua expressão aumentada em macrófagos M2. Gene esse que bloqueia a atividade da iNOS (do inglês *inducible nitric oxide synthase*) por meio de diversos mecanismos, incluindo a competição pelo substrato de arginina que é necessário para a produção de óxido nítrico. De maneira geral, acredita-se que os macrófagos M2 colaborem no bloqueio das respostas inflamatórias e na promoção do reparo tecidual (Gordon; Taylor, 2005). Estudo realizado com animais mostrou que os macrófagos do tecido adiposo

de camundongos magros exibiram atividade aumentada de Arg-1 quando comparados a camundongos com obesidade (Lumeng; Bodzin; Saltiel, 2007).

Simultaneamente ao aumento exponencial da prevalência de obesidade e de suas comorbidades, tem aumentado a busca por medicamentos ou substâncias que possam prevenir e/ou tratar essas doenças.

Programas de intervenção com foco na indução de um balanço energético negativo com dieta ou exercício físico, ou a associação de ambos, são eficazes na indução e manutenção da perda de peso a curto e médio prazo, mas perdem eficácia a longo prazo (Bray et al., 2018).

Atualmente, os compostos bioativos naturais têm atraído atenção significativa devido ao fato de terem menos efeitos adversos e possuírem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, contra vários distúrbios e complicações observados na obesidade e no diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Arulselvan et al., 2016; Yeh et al., 2017).

Dentre essas substâncias, destaca-se a *Curcuma longa* L. (cúrcuma), monocotiledônea pertencente à família *Zingiberoidae* da subordem *Zingiberaceae* (Figura 1).

**Figura 1** - Planta de *Curcuma longa* L. mostrando rizoma e caule.



Fonte: Brasil Escola<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/saude/curcuma.htm>>. Acesso em: nov. 2020.

Popularmente conhecida como açafrão-da-terra, açafrão-da-índia e gengibre amarelo. De origem asiática, é uma erva aromática e da raiz (rizoma) seca e moída extrai-se o pó, sendo o rizoma a parte principal utilizada para fins culinários e medicinais (Mata et al., 2004), e exerce atividades múltiplas contra várias doenças, incluindo obesidade e DM2 (Kunnumakkara et al., 2017; Rivera-Mancía; Trujillo; Chaverri, 2018). A cor amarela da cúrcuma é devida, principalmente, à presença de curcuminóides polifenólicos (He et al., 2015).

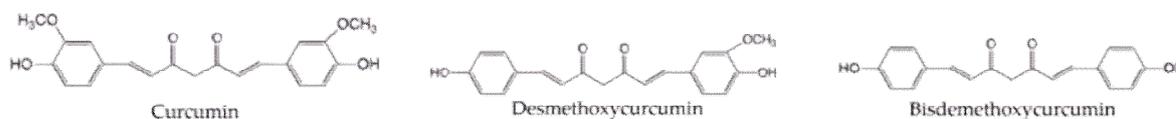
O composto de cúrcuma contém carboidrato (69,4%), proteína (6,3%), gordura (5,1%), mineral (3,5%) e umidade (13,1%) (Prasad et al., 2014).

A essência das raízes de açafrão-da-terra, pulverizadas por secagem, também contém óleos essenciais (em especial, zingibereno) e lactonas sesquiterpênicas (arturmerona e turmerona) e os curcuminóides. A composição de curcuminóides é de aproximadamente 70% de curcumina, 17% desmetoxicurcumina, 3% de bisdesmetoxicurcumina e o restante (10%) é chamado ciclocurcumina, recentemente identificada. No entanto, esse último tem sido associado à baixa ou nenhuma atividade biológica (Trujillo et al., 2013; Adiwidjaja; Mclachlan; Boddy, 2017; Stanić, 2017), além de conter também óleos voláteis (natlantone, turmerona e zingibereno), proteínas, minerais, carotenoides, açúcares e resinas (He et al., 2015).

Embora os três curcuminóides possuam atividade biológica, a maioria dos estudos apontam a curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) como sendo o componente mais ativo da *Curcuma longa* L., com evidência para a sua atividade antioxidante (Kumar et al., 2010). Em contrapartida, os demais curcuminóides têm sido menos estudados de forma isolada e, dessa forma, continuam incertas as suas possíveis atividades antioxidantes (Noorafshan; Ashkani-Esfahani, 2013; Camatari, 2017).

A curcumina apresenta dois grupos metoxila, a demetoxicurcumina contém apenas um grupo e a bisdemetoxicurcumina não apresenta nenhum grupo (Krishnaswamy, 2008; Jurenka, 2009) (Figura 2).

**Figura 2** - Estrutura química dos pigmentos curcuminóides isolados do rizoma da *Curcuma longa* L.



Fonte: Adaptado de Xu et al, 2018.

Os curcuminoides têm baixa solubilidade em solução aquosa, o que contribui para uma baixa biodisponibilidade, fazendo com que eles sejam pouco absorvidos e tenham rápida metabolização (Naksuriya et al., 2014). Após administração oral de curcumina em dose única de 1g/kg de peso corporal, apenas quantidades desprezíveis de curcumina livre foram encontradas no plasma de ratos e cerca de 75% foram excretadas nas fezes, o que sugere má absorção no intestino (Wahlström; Blennow, 1978).

Além da forma de administração, o pH é outro fator que interfere na biodisponibilidade da curcumina. Em condições neutras básicas (pH varia de 7 a 10), mais de 90% da curcumina é degradada (Wang et al., 1997). Embora apresente baixa absorção e seja suscetível a sofrer alterações estruturais pelo pH, a curcumina livre foi encontrada em diferentes tecidos, como por exemplo, hepatócitos, que podem reduzir a curcumina em hexa-hidrocurcumina e hexa-hidrocurcuminol (Ireson et al., 2001).

Garcea et al. (2004) observaram que no fígado foram encontrados vestígios de curcumina e seus metabólitos. Além disso, a curcumina é biotransformada em glucoroneto de curcumina, sulfato de curcumina, tetra-hidrocurcuminae hexa-hidrocurcumina no trato intestinal de humanos e roedores.

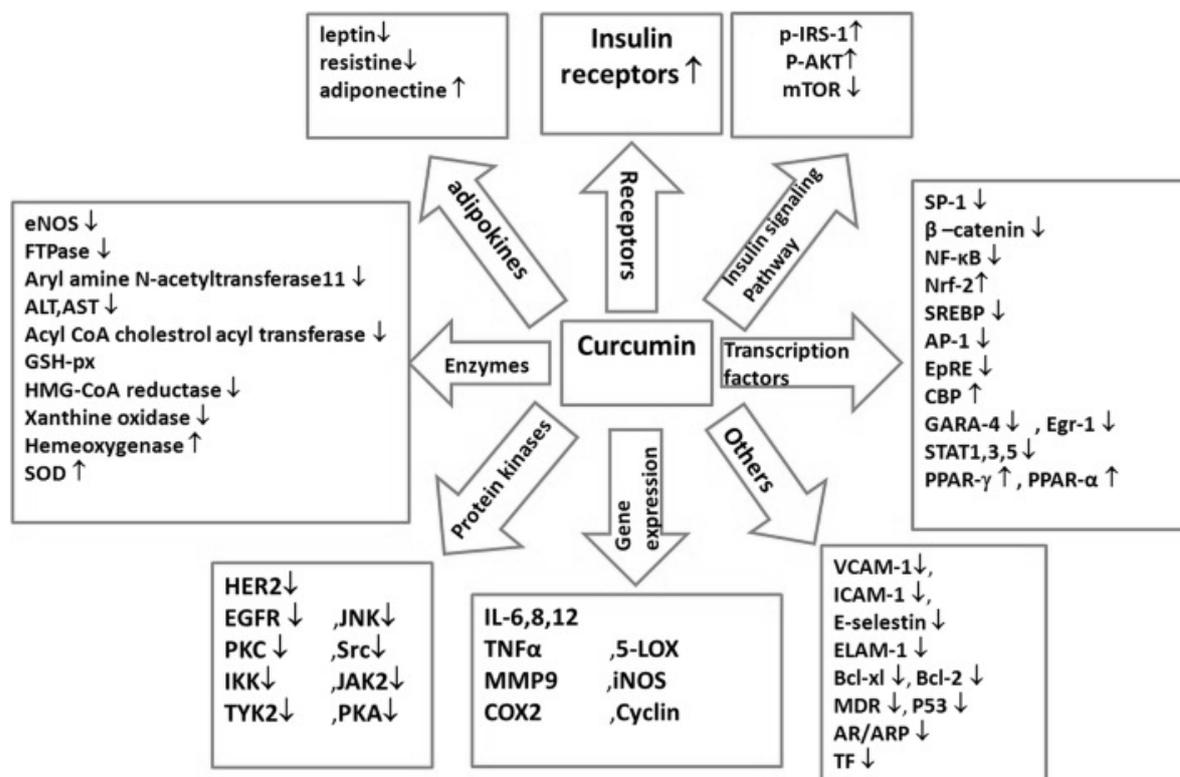
Apesar de apresentar baixa absorção, há estudos clínicos e em animais relatando algum efeito da curcumina em doenças metabólicas, como a RI (Eshaghian et al., 2018; Thota; Acharya; Garg, 2019), e sugerem fortemente que a curcumina e seus metabólitos podem ser candidatos à intervenção farmacológica nesse tipo de doença. O fato de o fígado e o intestino estarem envolvidos no metabolismo da curcumina, sugere que esses órgãos são os principais alvos dessa substância. Contudo, metabólitos variados ainda podem atuar em vias metabólicas de outros tecidos, interferindo na saúde e na doença (Jurenka, 2009; Prasad; Tyagi; Aggarwal, 2014).

Embora sua baixa biodisponibilidade já ser relatada, algumas discussões a esse respeito têm sido realizadas nos últimos anos, pois, mesmo sendo de baixa absorção, rápido metabolismo e eliminação sistêmica, sabe-se que a curcumina é uma molécula lipofílica e com isso, rapidamente permeável entre as membranas celulares, tendo, assim, importante utilização e atividade biológica em nível celular (Noorafshan; Ashkani-Esfahani, 2013).

A curcumina possui propriedades anti-inflamatórias (Arulselvan et al., 2016), antitumoral e antioxidante (Kalpana; Rajasekharan; Menon, 2005). É uma substância polifenólica lipofílica (Jurenka, 2009), sendo comumente classificada como constituinte mais ativo e há muito tempo, é usada como medicamento natural para o tratamento de doenças inflamatórias (Sharma; Gescher; Steward, 2005; Deogade; Ghate, 2015). Como já mencionado, não é solúvel em água e em pH ácido e neutro, mas é solúvel em acetona, metanol e etanol (Goel; Kunnumakkara; Aggarwal, 2008; Jurenka, 2009).

Acredita-se que a peroxidação mediada por radicais livres dos lipídios de membrana e o dano oxidativo de DNA e proteínas estejam associados a uma variedade de doenças crônicas, como câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (Sudheer et al., 2005). Também é relatado que a curcumina exerce uma função indispensável contra doenças mediadas por estresse oxidativo (Xu et al., 2016).

A curcumina, com sua estrutura de polifenol, é capaz de modular de forma efetiva os alvos moleculares que têm um papel na patogênese de muitas doenças (Figura 3). Desempenha uma função importante na regulação de citocinas, enzimas, fatores de transcrição, fatores de crescimento, receptores, moléculas metastáticas e apoptóticas em quase todas as fases do desenvolvimento de muitas doenças (Shehzad; Lee, 2010; Baliga et al., 2012; Prasad et al., 2014). Também inibe as vias de sinalização, como o NF- $\kappa$ B e vias de co-receptor do receptor 4 do tipo Toll-2 da proteína de diferenciação mielóide, ativa receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR- $\gamma$ , do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) e bloqueia a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Ghosh; Banerjee; Sil, 2015; Xu et al., 2018).

**Figura 3** - Alvos moleculares modulados pela curcumina.

Fonte: Ghorbani; Hekmatdoost; Mirmiran, 2014.

A curcumina também pode modular a ativação de células-T, células-B, macrófagos, neutrófilos, célula natural killer e células dendríticas. Em doses baixas, pode aumentar as respostas de anticorpos. Desse modo, sugere-se que seu efeito anti-inflamatório se deva, em parte, à sua capacidade de “sequestrar” espécies reativas de oxigênio em situações de estresse oxidativo celular (Basnet; Skalko-Basnet, 2011).

Nos últimos 10 anos, uma ampla quantidade de estudos sobre os efeitos benéficos da cúrcuma e curcumina foram publicados, e tem-se evidenciado repetidamente que esta substância natural, além de possuir potenciais efeitos anti-obesidade e anti-inflamatórios, suprime o ganho de peso. (He et al., 2015; Ding et al., 2016; Kunnumakkara et al., 2017; Jin et al., 2018).

Devido a sua estrutura inclinada, a metoxilação de alto nível e hidrogenação de baixo nível, a curcumina tem uma propriedade que eleva a atividade de eliminação de radicais livres. (Devassy; Nwachukwu; Jones, 2015).

A Food and Drug Administration aprovou a curcumina como um composto “geralmente reconhecido como seguro” e um ensaio clínico relatou que essa

substância é bem tolerada e segura em doses tão altas como 4.000 a 8.000 mg/kg por dia (Tsuda, 2018).

Estudo realizado por Ding et al. (2016) demonstrou que camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica (DH) (60% de gordura) e tratados com curcumina (80 mg/kg) por 12 semanas, apresentaram menor ganho de peso quando comparados a camundongos alimentados com a mesma dieta, mas não tratados com curcumina.

Ejaz et al. (2009) evidenciaram que a curcumina pode ter propriedades anti-obesidade. Camundongos que receberam DH com 500 mg de curcumina/kg por 12 semanas apresentaram uma alta redução da densidade de microvasos no tecido adiposo, juntamente com a redução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGF-R2, do inglês *vascular endothelial growth factor receptor 2*), fatores cruciais para o desenvolvimento da angiogênese.

Miyazawa et al. (2018) forneceram DH por 23 semanas, seguida de restrição calórica (10 e 20%) e suplementação com cúrcuma, piperina, ambas ou nenhuma delas. Em comparação aos demais grupos, camundongos obesos que sofreram restrição calórica e receberam cúrcuma e piperina perderam mais gordura. É possível que a DH associada com restrição calórica e com a cúrcuma e piperina, aumente a perda de gordura corporal e suprima a inflamação induzida por essa dieta.

Paralelamente, embora muitos fatores tenham sido implicados no aumento da prevalência da obesidade, sucessivos indícios apoiam um importante papel de alterações no microbioma intestinal como um mediador da obesidade, bem como atribuição nos mecanismos patogênicos também pela inflamação sistêmica, hepática e do tecido adiposo (Blaser, 2014; Okeke; Roland; Mullin, 2014; Bouter et al., 2017).

A microbiota intestinal (MI) é definida como comunidade ecológica de comensal, simbiótico e microorganismos patogênicos presentes no organismo ou microbioma (sequência completa do genoma da comunidade microbiana) (Turnbaugh et al., 2007; NIH HMP Working Group, 2009).

De acordo com Tringe et al. (2005), o microbioma é formado principalmente por bactérias, mas também se compõe de fungos, leveduras, vírus, protozoários e arqueias que vivem em nosso corpo, sendo que cada região particular corresponde

a um compartimento altamente especializado e caracterizado pelos seus próprios clusters microbianos, dinâmica da sociedade e interação com o tecido hospedeiro.

O intestino adulto abriga aproximadamente 100.000.000.000.00 (10<sup>13</sup>) e pode ter em torno de 1.200 espécies bacterianas importantes (Sender; Fuchs; Milo, 2016). A MI adulta é tomada por dois filos, Firmicutes e Bacteroidetes, que classificam cerca de 90% de todas as espécies bacterianas no intestino (Tsukumo et al., 2009) das 70 divisões conhecidas, dividindo espaço com outros filos como Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, que se apresentam em menor abundância (Turnbaugh et al., 2006). Arqueias metanogênicas, principalmente *Methanobrevibacter smithii* também compõem a MI (Korecka; Arulampalam, 2012) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Principais filos e gêneros encontrados na microbiota intestinal humana.

Divisão	Filo	Gêneros Representativos
Bactéria	Firmicutes	<i>Ruminococcus</i>
		<i>Clostridium</i>
		<i>Peptoestreptococcus</i>
		<i>Lactobacillus</i>
		<i>Enterococcus</i>
	Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>
		<i>Prevotella</i>
		<i>Xylanibacter</i>
	Proteobacteria	<i>Desulfovibrio</i>
		<i>Escherichia</i>
<i>Helicobacter</i>		
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	
	<i>Collinsella</i>	
Archea	Euryarcheota	<i>Methanobrevibacter</i>

Fonte: Adaptado de DiBaise et al., 2008.

Bacteroidetes e Firmicutes são bactérias encontradas no intestino delgado e grosso, especialmente no cólon. O filo de Bacteroidetes é encontrado não só na MI de humanos, mas também em outros animais. A maioria das Firmicutes apresenta

uma parede celular e deste modo, ao contrário das Bacteroidetes que são gram-negativas, estas são gram-positivas (Pistelli; Costa, 2010).

Estudo realizado por Wu et al. (2011) mostrou que dieta rica em gorduras saturadas está associada a uma prevalência de Bacteroidetes e Actinobacteria, enquanto dieta rica em carboidratos e açúcares simples a uma prevalência de Firmicutes e Proteobacteria.

A associação entre a MI e o peso corporal tem sido amplamente estudada. Estudos demonstraram que roedores e humanos magros e com excesso de peso podem apresentar diferenças na composição de sua MI (Gérard, 2016; Saad; Santos; Prada, 2016).

Diversos estudos, nos últimos 17 anos, mostraram que modificar a MI de ratos e camundongos usando, por exemplo, prebióticos (Gibson et al., 2017) reduz o ganho de peso corporal e o aumento da massa gorda e melhora o metabolismo da glicose (Cani; Dewever; Delzenne, 2004; Cani et al., 2006; Cani et al., 2009). Contudo, o primeiro estudo prova de conceito usando camundongos livres de germes (GF, do inglês “*germ-free*”) isto é, camundongos que são desprovidos de quaisquer microrganismos, foi encontrada apenas em 2006 por Turnbaugh et al., certificando que a transferência da microbiota de camundongos com obesidade genética (*ob/ob*) para camundongos GF levou a um maior ganho de peso e massa gorda (Turnbaugh et al., 2006). Essa ligação também foi constatada com a MI de roedores com obesidade induzida por dieta (Turnbaugh et al., 2008; Everard et al., 2014) e também com a microbiota de humanos com obesidade (Ridaura et al., 2013).

As dietas hipercalóricas, além de modificarem a composição da MI, influenciam para uma disfunção do intestino que, subsequentemente, resulta em inflamação da gordura visceral e desregulação metabólica sistêmica. Uma “microbiota obesogênica” pode alterar a função hepática estimulando a síntese de triglicerídeo hepático e modulando o metabolismo lipídico sistêmico, o que influencia de forma indireta o armazenamento de ácidos graxos no fígado (Arslan, 2014).

Muitos estudos (Ley et al., 2005; Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006) apontam para uma diminuição relativa na abundância de Bacteroidetes juntamente com um aumento relativo nos Firmicutes como uma característica da “microbiota obesogênica”, outros não encontraram mudanças notáveis na composição

microbiana entre os dois grupos e alguns até relataram descobertas inversas (Schwiertz et al., 2010).

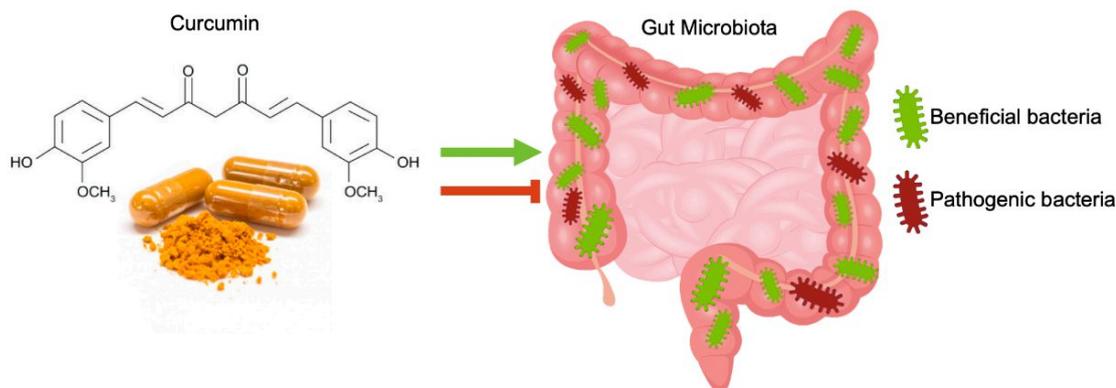
Estudo realizado por Ley et al. (2006) verificou que indivíduos com obesidade possuem maior concentração de Firmicutes e menor de Bacteroidetes em relação a indivíduos com peso ideal. Por outro lado, estudos clínicos demonstraram que a diminuição da relação Firmicutes/Bacteroidetes está diretamente relacionada à perda de peso (Ley et al., 2006; Sekirov et al., 2010; Minemura; Shimizu, 2015).

Essas mudanças afetam o potencial metabólico da MI de ratos, onde a microbiota do obeso tem uma maior capacidade de extrair energia a partir da dieta. Os mesmos autores observaram que a adição de uma microbiota de camundongos obesos em camundongos GF, após duas semanas, originou um aumento significativamente maior na gordura corporal se comparados à adição da microbiota de camundongos magros. Porém, os resultados são divergentes, destacando a necessidade de se concentrar mais em espécies específicas dentro desses grupos, em vez de compará-los somente no nível do filó.

O fato de que a composição pode ser diferente entre humanos magros e obesos apoiou a hipótese da influência da MI na fisiopatologia da obesidade (Tsukomo et al., 2009). Alguns estudos têm associado a MI ao estado inflamatório que ocorre na obesidade (Cani; Delzenne, 2007).

Além do papel da MI na regulação da energia, estudos em camundongos relacionaram a MI à patogênese da RI e à inflamação na obesidade. Camundongos colonizados com material obtido do ceco de camundongos convencionalmente criados, além de maior quantidade de gordura corporal, parecem também dispor de mais marcadores inflamatórios como interleucina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$ , proteína quimiotática de monócitos (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*), IL-6, maior intolerância à glicose e RI, ao serem comparados a camundongos GF. Animais com dietas ricas em gorduras e pobres em fibras (*“western diets”*) também podem ter situação parecida (Bäckhed et al., 2004).

Nos últimos anos, há ampla evidência apoiando as associações entre MI e suplementação de curcumina. Curiosamente, após a administração oral ou intraperitoneal, a curcumina se distribui e acumula preferencialmente no intestino e, dessa forma, pode exercer efeito regulador na MI, afetando a riqueza, diversidade e composição microbiana, favorecendo o crescimento de bactérias benéficas e limitando o crescimento de bactérias patogênicas (Figura 4) (Shen; Ji, 2016).

**Figura 4** - Interações entre a curcumina e a microbiota intestinal.

Fonte: Di Meo et al., 2019.

Feng et al. (2017) forneceram DH por 12 semanas e logo após administraram via gavagem 200mg/kg de curcumina por 4 semanas. Ao final do experimento encontraram que a suplementação de curcumina melhorou a integridade da barreira intestinal e alterou a composição da MI.

Shen, Liu e Ji (2017) investigaram os efeitos reguladores da administração de curcumina através de gavagem na microbiota intestinal de camundongos C57BL/6. Os resultados indicaram que a administração de curcumina tendeu a diminuir a riqueza e diversidade microbiana, mas sem diferenças significativas entre os grupos controle e curcumina. No entanto, a administração de curcumina teve efeito significativo na abundância de várias famílias bacterianas representativas em comunidades microbianas intestinais como *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae* e *Rikenellaceae* (Shen; Liu; Ji, 2017).

Estudo realizado por McFadden et al. (2015) que exploraram os efeitos modulativos da administração de curcumina na MI durante a colite, encontraram que essa substância poderia aumentar a riqueza da MI, aumentar a proporção da ordem de *Lactobacillales* (ordem de bactérias que compõem as bactérias do ácido láctico) e diminuir a proporção da ordem de *Coriobacteriales*. Todos esses achados sugeriram que os benefícios da curcumina na tumorigênese estavam relacionados à manutenção de uma ecologia microbiana colônica mais diversificada (McFadden et al., 2015).

Além disso, também foi descrito que os efeitos benéficos da administração da curcumina atuam através da melhoria da função da barreira intestinal em doenças metabólicas. Nos últimos anos, a associação entre lipopolissacarídeos (LPS) e

doenças metabólicas tem sido relatada em muitos estudos (Genth-Zotz et al., 2002; Cani et al., 2007; Creely et al., 2007; Pendyala; Walker; Holt, 2012).

Ghosh et al. (2014) evidenciaram que a suplementação de curcumina pode atenuar de forma considerável o nível de aumento de LPS no plasma induzido pela dieta ocidental. Esses dados indicam que a suplementação de curcumina é uma potente estratégia terapêutica para melhoria da função da barreira intestinal e prevenção de doenças metabólicas (Ghosh et al. 2014).

Estudo recente, similar ao anterior, encontrou que a administração de curcumina provocou melhora da função da barreira intestinal, modulando a sinalização intracelular e a organização de junções de oclusão (*tight junctions*) (Wang; Ghosh; Ghosh, 2017).

Todos esses estudos apontam que a curcumina pode prevenir doenças metabólicas através de um potencial mecanismo de ação envolvido na regulação da função da barreira intestinal.

Apesar das relações de causa e efeito da MI com a obesidade ainda não serem claras, a MI pode participar do metabolismo energético através da metabolização de energia a partir da dieta, regulação do armazenamento de gordura, regulação da lipogênese ou regulação da oxidação de ácidos graxos. Além disso, diferenças na composição da microbiota intestinal em humanos e camundongos obesos sugerem que diferentes microrganismos ou comunidades podem influenciar o peso corporal. A disbiose (composição microbiana alterada do intestino) associada com outros fatores genéticos e ambientais, pode contribuir para os distúrbios metabólicos do hospedeiro, resultando em muitas doenças (Gérard, 2016; Harakeh et al., 2016).

Em decorrência da progressão dos distúrbios associados ao desequilíbrio da MI (disbiose ou disbacteriose), tem-se despertado interesse de vários grupos de pesquisa em estudar as suas possíveis interferências na saúde. As pesquisas têm sido focadas na compreensão da íntima relação entre a MI, dieta, metabolismo e sistema imunológico e assim permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas na modulação da MI para tratar ou prevenir a obesidade.

Dessa forma, diante da ampla variação de doses e resultados discrepantes na literatura, buscou-se com esse estudo investigar como diferentes e quais doses de curcumina poderiam atuar na prevenção do ganho de peso, na modulação da

microbiota intestinal, na melhora do perfil pró e anti-inflamatório, no perfil lipídico e glicídico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

## **2 JUSTIFICATIVA**

A cúrcuma é uma substância com inúmeros benefícios comprovados na literatura, mas que vem sendo utilizada sem efetivo controle da definição de uma dosagem que promova benefícios à saúde de forma segura. Além disso, os mecanismos relacionados aos seus efeitos ainda não estão completamente esclarecidos. Assim, este estudo sugeriu a investigação de crescentes doses da suplementação da curcumina com o objetivo de avaliar se os resultados promovidos por essa substância são dose-dependente. Portanto, foi avaliado o efeito da suplementação da curcumina na prevenção do ganho de peso, na modulação da microbiota intestinal, no perfil pró e anti-inflamatório e na prevenção da disglícemia e da dislipidemia em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

### **3 HIPÓTESE**

A suplementação de curcumina promoverá um efeito dose-dependente na prevenção do ganho de peso, na modulação da microbiota intestinal, no perfil pró e anti-inflamatório e no perfil lipídico e glicídico de animais alimentados com dieta hiperlipídica.

## 4 OBJETIVO

### 4.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de diferentes doses de curcumina na microbiota intestinal, no peso corporal, no perfil lipídico e glicídico e no perfil pró e anti-inflamatório de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a abundância relativa dos filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria e dos gêneros *E. coli*, *Bacteroides*, *Clostridium cluster XIVa* e *IV* na microbiota intestinal entre os grupos controle e tratados;
- Analisar as modificações de expressão gênica do perfil pró-inflamatório (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatório (IL-10) nos tecidos hepático e adiposo retroperitoneal e epididimal por meio da técnica de PCR *real time* entre os grupos controle e tratados;
- Analisar as modificações de expressão gênica do perfil pró-inflamatório (TLR-4 e MCP-4) e anti-inflamatório (MRC-1 e Arg-1) no tecido adiposo epididimal por meio da técnica de PCR *real time* entre os grupos controle e tratados;
- Analisar as modificações de expressão proteica do perfil pró-inflamatório (TNF- $\alpha$  e IL-17) e anti-inflamatório (IL-10) no tecido adiposo epididimal entre os grupos controle e tratados;
- Avaliar histologicamente os efeitos da dieta hiperlipídica e das diferentes doses de curcumina no pâncreas, fígado e intestino entre os grupos controle e tratados;
- Avaliar o perfil metabólico por meio de análise dos níveis séricos de colesterol total e frações (HDL, LDL), de triglicerídeos, além de glicemia, insulina e índice aterogênico entre os grupos controle e tratados;
- Avaliar o teor de gordura hepática entre os grupos controle e tratados;
- Verificar a tolerância a glicose por meio do teste de tolerância a glicose (GTT) entre os grupos controle e tratados;

- Comparar peso de pâncreas, tecido adiposo epididimal, retroperitoneal, marrom e fígado entre os grupos controle e tratados;
- Aferir peso corporal para mensurar ganho ou perda de peso entre os grupos controle e tratados.

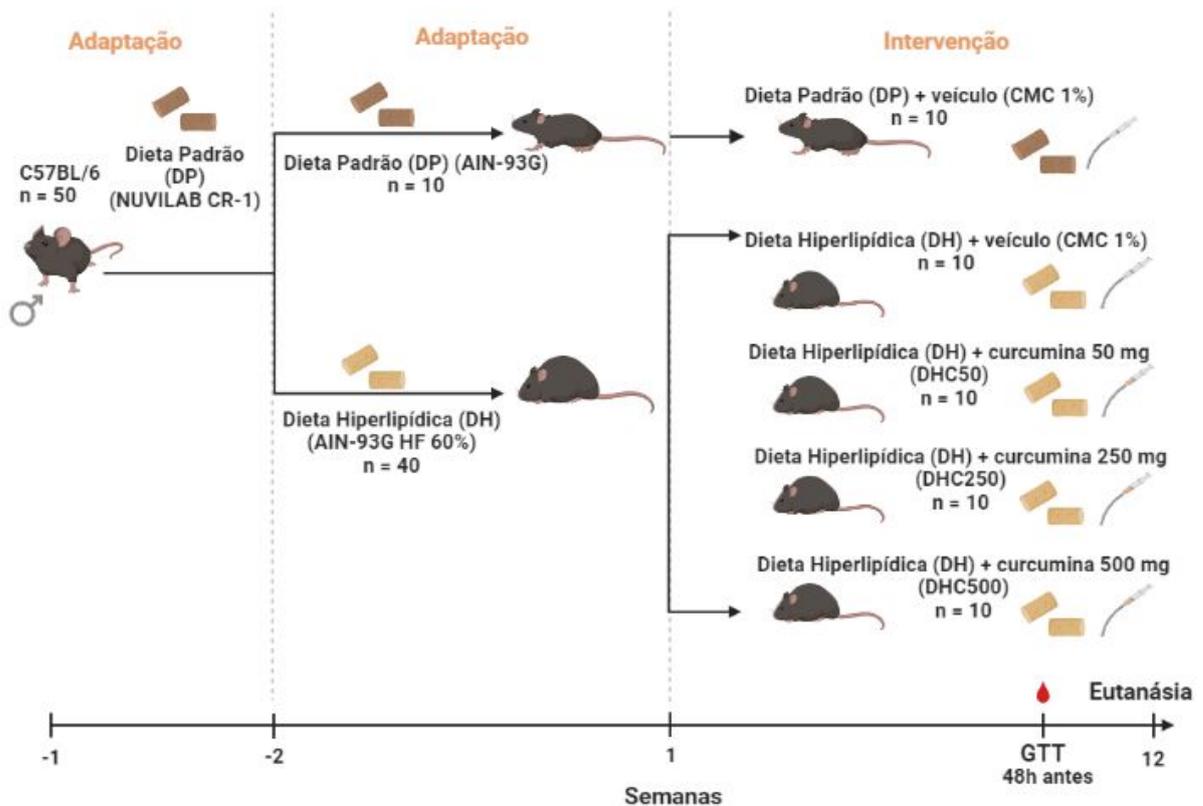
## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, em 2017, protocolo nº 089/2017 e iniciado somente após aprovação (Anexo A).

Foi realizado um estudo experimental, longitudinal, no qual foram estudados 50 camundongos machos C57BL/6, 30 dias após o nascimento, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto, e separados em 5 grupos com 10 animais cada, buscando homogeneizar por peso. O organograma de divisão dos grupos e tempos de tratamento está ilustrado na figura 5.

**Figura 5** - Organograma de divisão dos grupos e tempos de tratamento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.2 Tratamento dos animais

Os animais foram mantidos em caixas plásticas em polipropileno à temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  em ambiente com ciclo de luminosidade de 12 horas (7h às 19h) com água e ração padrão (Nuvilab CR-1) *ad libitum* por um período de adaptação de 1 semana.

Após a primeira semana de adaptação, os grupos foram divididos em 2 subgrupos de 10 e 40 camundongos em cada, permanecendo nessa divisão por mais uma semana.

1. Dieta padrão (dieta controle AIN-93G) (DP, n=10): animais que receberam dieta controle.

2. Dieta hiperlipídica (AIN 93 HF - high fat 60%) (DH, n=40): animais que receberam dieta hiperlipídica purificada.

Posteriormente as duas semanas de adaptação, os grupos foram randomizados e divididos em 5 grupos de 10 camundongos em cada, sendo:

Grupo 1. Dieta padrão (dieta controle AIN-93G) (DP, n=10): animais que receberam dieta padrão e gavagem apenas com o veículo (CMC 1%);

Grupo 2. Dieta hiperlipídica (AIN 93 HF 60%) (DH, n=10): animais que receberam dieta hiperlipídica purificada e gavagem apenas com o veículo (CMC 1%);

Grupo 3. Dieta hiperlipídica purificada (AIN 93 HFD 60%) e extrato de curcumina (DHC50, n=10): animais que receberam dieta hiperlipídica e suplementados com extrato de curcumina em concentração de 50mg/kg de peso/dia (em CMC 1% por gavagem);

Grupo 4. Dieta hiperlipídica purificada (AIN 93 HFD 60%) e extrato de curcumina (DHC250, n=10): animais que receberam dieta hiperlipídica e suplementados com extrato de curcumina em concentração de 250mg/kg de peso/dia (em CMC 1% por gavagem);

Grupo 5. Dieta hiperlipídica purificada (AIN 93 HFD 60%) e extrato de curcumina (DHC500, n=10): animais que receberam dieta hiperlipídica e suplementados com extrato de curcumina em concentração de 500mg/kg de peso/dia (em CMC 1% por gavagem).

### 5.3 Composição das dietas, análise do consumo alimentar e suplementação

As dietas foram obtidas comercialmente da PragSoluções (Jaú – SP, Brasil), cujas composições estão especificadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição química das dietas hiperlipídica (AIN 93 HF 60%) e padrão (AIN-93G) em 1000g.

Ingredientes	DP <sup>3</sup>		DH <sup>4</sup>	
	g/kg	kcal	g/kg	kcal
Amido de milho	400	1600	-	-
Farelo da soja	305	1220	-	-
Amido dextrinizado	95	380	-	-
Proteína da soja	-	-	188,6	754,4
Carboidratos (amidos, sacarose)	-	-	346,5	1386
Sacarose	80	320	-	-
Óleo de soja	30	270	40	360
Banha	10	90	300	2700
Fibra	-	-	50	-
Celulose microcristalina	31,7	-	-	-
Mix de mineral (AIN 93) <sup>1</sup>	35	-	61,6	-
Mix de vitamina (AIN 93) <sup>2</sup>	10	40	10	40
L cistina	1,8	7,2	1,8	7,2
Colina	1,5	-	1,5	-
BHT	0,014	-	0,06	-
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>3927</b>	<b>1000</b>	<b>5248</b>

<sup>1</sup>Mistura de minerais (g/Kg de mistura): NaCl – 139,3 / KI – 0,79 / MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 57,3 / CaCO<sub>3</sub> – 381,4 / MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O – 4,01 / FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 27,0 / ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,548 / CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O – 0,477 / CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O – 0,023 / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 389,0.

<sup>2</sup>Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura): Acetato de retinol – 0,6 / Colecalciferol – 0,005/ Ácido p-aminobenzóico – 10,00 / I-Inositol – 10,00 / Niacina – 4,00 / Pantotenato de cálcio – 4,00 / Riboflavina – 0,80/ Tiamina HCl – 0,50 / Piridoxina HCl – 0,50 / Ácido fólico – 0,20 / Biotina – 0,04 / Vitamina B12 – 0,003 / Sacarose – q.s.p. 1000. / Colina – 200,0 /  $\alpha$ -Tocoferol – 6,7.

<sup>3</sup>Dieta padrão (DP): 75,09% de carboidratos, 15,03% de proteínas e 9,88% de lipídios, calculados sobre o valor calórico total.

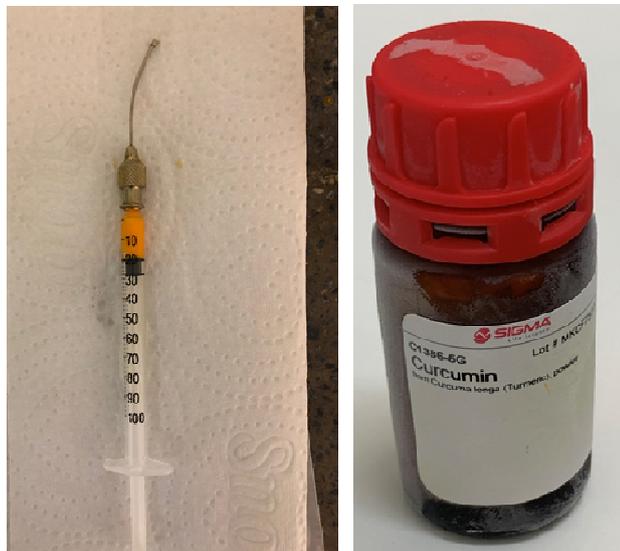
<sup>4</sup>Dieta hiperlipídica (DH): 27,17% de carboidratos, 14,52% de proteínas e 58,31% de lipídios, calculados sobre o valor calórico total.

BHT: hidroxitolueno butilado, do inglês *butylated hydroxytoluene*.

Os animais foram alimentados com as dietas previamente apresentadas (tabela 1) durante 12 semanas. E para os grupos suplementados (3, 4 e 5), foi feita a adição de curcumina (Ref: C1386 Sigma - Aldrich – *Curcumin from Curcuma longa* (*Turmeric*), pureza 75% - HPLC) (figura 6), por gavagem nas diferentes dosagens. Nos grupos controle (1 e 2), a gavagem foi feita apenas com o veículo (CMC 1%).

O volume ideal da gavagem para o animal é 1% do peso corporal, como exemplo, um animal de 20g pode receber 0,2 ml/dia (UBC *Animal Care Guidelines*, 2012). A capacidade total de seringa utilizada (insulina) é de 100 unidades (1 mL) e dessa forma, as doses administradas foram ajustadas e concentradas em 20 unidades (0,2 mL). Considerando que o peso do animal ultrapassa as 20g com o decorrer do experimento, podendo chegar até aproximadamente 35 a 40g, a quantidade de volume administrado não ultrapassou o recomendado.

**Figura 6** - Agulha curva de aço inox BD-10 utilizada na gavagem e curcumina utilizada na suplementação (Ref: C1386 Sigma – Aldrich).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A respeito das kcal ingeridas, considerou-se, então, a equivalência de 3,927 kcal para cada 1g consumido de dieta padrão e 5,248 kcal para cada 1g consumido de dieta hiperlipídica.

A dieta oferecida semanalmente foi fracionada em pequenas porções pesadas e acondicionadas em comedouro específico. A sobra foi pesada para ser calculada a quantidade final de alimento ingerido. O consumo pelos animais de cada grupo foi avaliado diariamente e uma estimativa do consumo individual foi realizada através da divisão do consumo total pelo número de animais contidos na caixa. Os valores são apresentados de acordo com a média semanal de ingestão.

A água oferecida foi renovada diariamente.

#### 5.4 Avaliação ponderal

Durante 12 semanas, os animais foram acompanhados por meio do levantamento de medidas de peso pré-tratamento e a cada semana. A balança utilizada foi digital com capacidade máxima para 15 kg (Filizola S. A., São Paulo, Brasil). O percentual do ganho de peso foi calculado a partir da diferença entre o peso final e inicial. Para o cálculo da porcentagem de ganho de peso, utilizou-se a equação:

$$\frac{[(\textit{peso final} - \textit{peso inicial})] \times 100}{\textit{peso inicial}}$$

#### 5.5 Teste de tolerância a glicose (GTT)

O teste de tolerância à glicose (GTT, do inglês *glucose tolerance test*) foi realizado 48 horas antecedentes à eutanásia, após jejum de 10 a 12 horas, sendo a primeira coleta de sangue no tempo 0' por meio de uma incisão na extremidade caudal do animal. Subsequentemente, foi administrada, via intraperitoneal, uma solução de glicose na dose de 1mg/g peso do animal, segundo protocolo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa. Posteriormente, a coleta de sangue para leitura da glicemia foi realizada nos tempos 30', 60' e 120' após administração de glicose (Silva et al., 2020). As concentrações de glicose foram determinadas através de glicosímetro Accu-Chek (Accu-chek Performa Roche, Mannheim, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. A partir do GTT, foi construída a curva glicêmica e verificada a área sob a curva (AUC, do inglês *area under the curve*), no software GraphPad Prism.

#### 5.6 Eutanásia dos animais

Ao final do período experimental, os animais foram privados de alimentação por 8 horas e posteriormente, eutanasiados por decapitação. Nesse momento, houve coleta de amostras sanguíneas que foram prontamente centrifugadas a 3500rpm, a 4°C durante 15 minutos para obtenção do soro e o mesmo foi armazenado em freezer a -70°C para posterior dosagem de glicemia, insulina e lipidograma. Durante a eutanásia, também foram coletadas amostras de tecido

hepático, tecido adiposo epididimal, tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo marrom e tecido pancreático, os quais foram pesados, colocados em tubos do tipo *ependorf* e imediatamente mantidos em nitrogênio líquido até o término da eutanásia, quando foram conservados em freezer -70°C. Fragmentos de tecido hepático, pancreático e intestino foram separados em tubos do tipo *ependorf* contendo uma solução de formol 10% para análise histológica. Fragmentos de tecido hepático e adiposo retroperitoneal e epididimal foram separados em tubos do tipo *ependorf* contendo TRIzol<sup>®</sup> para análise da expressão gênica de citocinas. Fragmentos de tecido adiposo epididimal foram separados em tubos do tipo *ependorf* contendo inibidor de protease para análise da expressão proteica das citocinas. Além disso, fragmentos de tecido hepático também foram separados em tubos do tipo *ependorf* para dosagem de gorduras hepáticas totais.

## 5.7 Microbiota intestinal

Após a eutanásia, para avaliar a abundância relativa dos filos da microbiota intestinal, foi realizada a coleta fecal simples das fezes íntegras e estéreis, localizadas na parte final do intestino (reto), e transportadas imediatamente para um microtubo estéril, a fim de evitar contaminação da amostra. As amostras de fezes foram mantidas imersas no gelo até o término da eutanásia para posterior armazenamento. A pinça usada para coleta dessas amostras foi exclusiva e separada dos demais materiais. Para a PCR quantitativa de bactérias dos filos e gêneros das amostras fecais, elas foram congeladas até a sua utilização.

### 5.7.1 Quantificação de DNA bacteriano por PCR quantitativo

O DNA do conteúdo fecal foi obtido usando o Kit DNeasy<sup>®</sup> PowerSoil<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Alemanha). A PCR quantitativa de bactérias dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria e dos gêneros *E.coli*, *Bacteroides*, *Clostridium cluster XIVa* e *Clostridium cluster IV* foi realizada utilizando *primers* de genes universal (eubacteria) ou específicos para os diferentes filos e gêneros. A sequência de *primers* está descrita na Tabela 3 (Huijsdens et al., 2002; Van Dyke; McCarthy, 2002; Layton et al., 2006; Miranda et al., 2019; Bukina et al., 2020). As diferenças ( $\Delta$ CT) entre os valores do limiar do ciclo (cT) de eubacterias e grupos

bacterianos específicos foram usadas para obter níveis normalizados de cada grupo bacteriano ( $2^{-\Delta CT}$ ). A abundância relativa de cada grupo bacteriano foi obtida após a normalização com os grupos controle.

**Tabela 3** - Sequência de *primers* utilizados para determinação das bactérias da microbiota intestinal de interesse neste estudo.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
Actinobacteria	<b>FP</b> - 5'-TGTAGCGGTGGAATGCGC-3' <b>RP</b> - 5'-AATTAAGCCACATGCTCCGCT-3'
Bacteroidetes	<b>FP</b> - 5'-GTTTAATTTCGATGATACGCGAG-3' <b>RP</b> - 5'-TTAASCCGACACCTCACGG-3'
Firmicutes	<b>FP</b> - 5'-ATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3' <b>RP</b> - 5'-AGCTGACGACAACCATGCAC-3'
Proteobacteria	<b>FP</b> - 5'-CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG-3' <b>RP</b> - 5'-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC-3'
<i>Bacteroides</i>	<b>FP</b> - 5'-GAGAGGAAGGTCCCCAC-3' <b>RP</b> - 5'-CGCTACTTGGCTGGTTCAG-3'
<i>E. coli</i>	<b>FP</b> - 5'-CATGCCGCGTGTATGAAGAA-3' <b>RP</b> - 5'-CGGGTAACGTCAATGAGCAAA-3'
<i>Clostridium cluster XIVa</i>	<b>FP</b> - 5'-CGGTACCTGACTAAGAAGC-3' <b>RP</b> - 5'-AGTTTCATTCTTGCGAACG-3'
<i>Clostridium cluster IV</i>	<b>FP</b> - 5'-TTACTGGGTGTAAAGGG-3' <b>RP</b> - 5'-TAGAGTGCTCTTGCGTA-3'
<i>Eubacteria</i> universal	<b>FP</b> - 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' <b>RP</b> - 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'

FP: forward primer, RP: reverse primer.

## 5.8 Avaliações bioquímicas

O colesterol sérico total (CT) foi analisado por meio da metodologia colorimétrica enzimática através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S. A., Brasil). Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pelo colesterol esterase a ácidos graxos e a colesterol livre, que foi então oxidado pelo colesterol oxidase a colest-4-en-ona e a peróxido de hidrogênio. O fenol e a 4-aminoantipirina foram oxidados, na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, formando a antipirilquinonimina com absorvidade máxima a 500nm, com intensidade da cor vermelha formada na reação final diretamente proporcional à concentração do colesterol da amostra.

Os triglicerídeos (TG) séricos totais foram determinados por meio da metodologia colorimétrica enzimática através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S. A., Brasil). A hidrólise dos triglicerídeos foi realizada pela lipase lipoproteica, liberando o glicerol, que foi convertido em glicerol-3-fosfato, pela gliceroquinase. O glicerol-3-fosfato foi então oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. Posteriormente, foi realizada uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina com absorvância máxima de 505nm, sendo que a intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos da amostra.

A lipoproteína de alta densidade sérica (HDL, do inglês *high-density lipoproteins*) foi determinado por meio da metodologia colorimétrica enzimática através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S. A., Brasil). Neste, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low-density lipoproteins*) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low-density lipoproteins*) foram quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado ao HDL foi determinado no sobrenadante.

Após a precipitação, alíquotas de 10µl foram adicionadas a 1ml de reagente de cor, encubados e então foi feita a leitura em espectrofotômetro. Para o padrão foi usado o reagente fornecido pelo kit.

O LDL sérico foi determinado por meio da metodologia colorimétrica enzimática através de kits comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica S. A., Brasil).

O índice aterogênico (IA) foi calculado de acordo com a fórmula:  $(CT - HDL) / HDL$  (Fassini et al., 2011).

A concentração de insulina sérica dos camundongos foi determinada através do kit Elisa Ultrassensível (*Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA*, Alpco Diagnostics, Salem, USA).

Os resultados de todas as dosagens foram calculados a partir da diferença do resultado da absorvância das amostras, divididas pela absorvância do padrão, conforme recomendações do protocolo.

## 5.9 Análise da expressão gênica

A expressão gênica das citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, MRC-1, Arg-1, TLR-4 e MCP-4 foi realizada por meio de RTq-PCR.

### 5.9.1 Extração de RNA total

Fragments de tecidos hepático, adiposo retroperitoneal e epididimal foram colhidos e imediatamente transferidos para microtubo contendo 1 mL de TRIzol® Reagente (Invitrogen®, cat.: 15596026) e levados para freezer -80°C, onde foram mantidos até o processamento, que foi realizado seguindo instruções do fabricante.

Para o processamento das amostras e extração de RNA, todo material utilizado foi lavado com água tratada com DEPC (do inglês *diethyl pyrocarbonate*, Sigma-Aldrich®, cat.: D5758) “DEPC ativa”, seguida por água “DEPC inativa” (inativação da “DEPC ativa” realizada por autoclavagem).

Para a primeira etapa da extração, maceração mecânica dos fragmentos, foi utilizado pistilo com ponta cônica para atingir a dissociação total do tecido (Figura 7).

**Figura 7** - Pistilo utilizado para dissociação mecânica dos fragmentos de tecido.



Fonte: Loja Net Lab<sup>2</sup>.

O mesmo pistilo foi usado para todo o material, sendo que a cada fragmento macerado o pistilo foi limpo com álcool 70%, seguida de água DEPC ativa e por último, água DEPC inativa, e procurou-se macerar os grupos em dias diferentes para evitar contaminação entre eles, sendo o tubo sempre mantido imerso no gelo para evitar aquecimento da amostra. Após a maceração o tubo seguiu para a próxima etapa da extração de RNA, ou foi acondicionado em freezer -80°C até ser processado.

<sup>2</sup> Disponível em: <[https://static3.tcdn.com.br/img/img\\_prod/503224/pistilo\\_para\\_microtubo\\_de\\_1\\_5ml\\_7482423\\_1\\_20191018111444.jpg](https://static3.tcdn.com.br/img/img_prod/503224/pistilo_para_microtubo_de_1_5ml_7482423_1_20191018111444.jpg)>. Acesso em: nov. 2020.

Na etapa seguinte, cada microtubo contendo 1 mL de macerado recebeu 200  $\mu$ L de clorofórmio (J.T Baker<sup>®</sup>. cat.: 9180-02) gelado e foi misturado com intensa agitação manual por 15 segundos, seguido por centrifugação a 12000 rpm, à 4°C, por 15 min. Após a centrifugação, houve a formação de três fases, fase orgânica (inferior) de coloração rosa, que contém proteínas, lipídios e o DNA; fase interfase (intermediária) de coloração branca, contendo DNA; e a fase aquosa (superior) incolor que contém o RNA. Apenas a fase superior foi transferida para um novo microtubo e a ele adicionado 500  $\mu$ L de isopropanol gelado. Em seguida, o microtubo foi mantido em -80°C por aproximadamente 24h para precipitação do RNA. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, a 4°C, por 10 min, o sobrenadante descartado, e o pellet resultante lavado com 1 mL de álcool 75% gelado, com centrifugação a 7500 rpm, 4°C por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o microtubo vertido sobre gaze estéril com tampa aberta e mantido em temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos para o pellet de RNA secar. Após seco, o pellet do tecido hepático foi ressuspendido em 50  $\mu$ L de água livre de nucleases e o pellet dos tecidos adiposos em 20  $\mu$ L. O RNA extraído foi acondicionado em freezer -80°C.

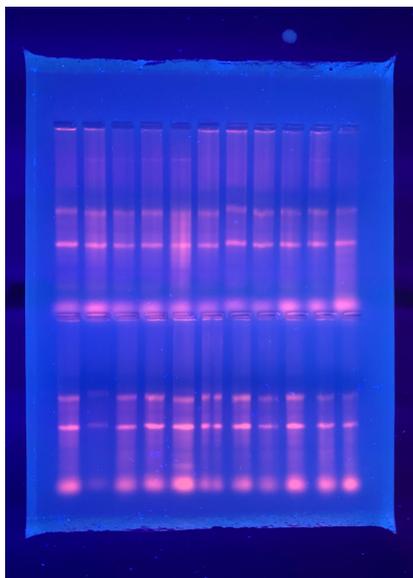
### 5.9.2 Quantificação total e avaliação de integridade do RNA

Após pelo menos um dia da extração, o RNA foi quantificado em NanoVue<sup>®</sup> Plus (GE Health Sciences<sup>®</sup>, Life Sciences, Buckinghamshire, UK) usando 2  $\mu$ L da amostra. Além da quantificação em ng/ $\mu$ L, foram obtidas também as razões 260/280 e 230/280. As amostras são consideradas satisfatórias quando essa razão se mantiver entre 1,6 e 2,2, uma vez que estes valores representam baixa contaminação da amostra com proteínas. Nessa perspectiva, foram utilizadas somente as amostras que se enquadraram nos parâmetros anteriormente citados. Para definir quantidade total de RNA por fragmento, após obter a quantificação, dada em ng/ $\mu$ L, o valor foi multiplicado pelo volume total de cada amostra.

O gel de agarose, para avaliar a integridade do RNA, foi realizado para algumas amostras. O gel foi confeccionado a 1,5%, e utilizando 300 ng de cada amostra + 2  $\mu$ L de xileno cianol + 1  $\mu$ L de gel red, a eletroforese aconteceu sob 70V, por 1 hora. A observação de bandas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e

28S foi considerada indício de não degradação de RNA nas amostras. O resultado foi conferido em transluminador de luz UV (Figura 8).

**Figura 8** - Gel de agarose (1,5%) indicando a integridade de RNA total, através da visualização das bandas ribossomais 18s e 28s.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.9.3 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

O RNA foi tratado com enzima desoxirribonuclease (DNase) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) para garantir que a amostra de RNA não estivesse contaminada com DNA conseqüentemente, sua influência sobre a avaliação da expressão gênica. Seguiu-se o protocolo do kit RQ1 *RNase-Free DNase* (Promega®, USA, cat.: M6101). Para cada 1000ng de RNA foi utilizada 1 unidade de enzima. Após homogeneização da amostra com a enzima e o tampão por pipetagem, o tubo foi incubado por 30 min a 37°C, e logo após cada amostra recebeu 1 µL de solução stop, e foi incubado novamente por 10 min a 65°C.

Após tratamento com DNase, as amostras foram quantificadas novamente em Nanovue®, e 400 ng do RNA das amostras de fígado e 200ng das amostras de tecido adiposo foram utilizados para síntese de cDNA, seguindo orientações do kit *GoScript™ Reverse Transcriptase System* (Promega®, USA, cat.: A5001). O RNA foi inicialmente incubado com 1 µL de *Random Primers*, em um volume final de 5 µL, à temperatura de 70°C por 5min, a este foram adicionados 15 µL de mix contendo 4

μL de tampão [5x], 2,4 μL de MgCl<sub>2</sub> [25mM], 1 μL de mix de nucleotídeos [10mM], 0,5 μL de RNasin [40u/μL], 1 μL de Transcriptase Reversa, e 6,1 μL de água *nuclease-free*. Após homogeneização por pipetagem, o tubo foi incubado a 25°C por 5min, 42°C por 1 hora e 70°C por 15min. Todas as etapas de incubação foram realizadas em termociclador T100 *thermal cycler* da Bio-Rad (BioRad Laboratories®, USA. Cat.: 1861096).

#### 5.9.4 RTq-PCR para a expressão tecidual de citocinas TNF-α, IL-6, IL-10, MRC-1, Arg-1, TLR-4 e MCP-4.

As amostras de cDNA foram submetidas à PCR com *primers* específicos para os genes alvo e endógeno β-actina. A sequência é descrita da Tabela 4:

**Tabela 4** - Sequência de *primers* utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
TNF-α	<b>FP-</b> 5'-AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG-3' <b>RP-</b> 5'-GGCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA-3'	Hammami et al., 2017
IL-6	<b>FP-</b> 5'-AAGAAAGACAAAGCCAGAGTCCT-3' <b>RP-</b> 5'-TTTTACCTCTTGGTTGAAGATATGAA-3'	Carneiro, 2017
IL-10	<b>FP-</b> 5'-AACAAAGGACCAGCTGGACAAC-3' <b>RP-</b> 5'-GCAACCCAAGTAACCCCTTAAAGTC-3'	Fonseca et al., 2020
MRC-1	<b>FP-</b> 5'-CTCTGTTTCAGCTATTGGACGC-3' <b>RP-</b> 5'-TGGCACTCCCAAACATAATTTGA-3'	Zhang et al., 2019
Arg-1	<b>FP-</b> 5'-GTTCCCAGATGTACCAGGATTC-3' <b>RP-</b> 5'-CGATGTCTTTGGCAGATATGC-3'	da Silva et al., 2017
TLR-4	<b>FP-</b> 5'-CCAAGCCTTTCAGGGAATTAAG-3' <b>RP-</b> 5'-GCCAGGTTTTGAAGGCAAGT-3'	de Souza, 2019
MCP-4	<b>FP-</b> 5'-TGACCGACACTGGCAAGATG-3' <b>RP-</b> 5'-CTCTGATGCACGCAGGTCAG-3'	Carlos et al., 2020
β-actina	<b>FP-</b> 5'-CCTTCCTTCTTGGTATGGAAT-3' <b>RP-</b> 5'-TGGCATAGAGGTCTTTACGGAT-3'	Lee et al., 2020

Arg-1: arginase-1, FP: *forward primer*, RP: *reverse primer*, IL-6: interleucina 6, IL-10: interleucina 10, MCP-4: *monocyte chemoattractant protein 4*, MRC-1: *mannose receptor C-type 1*, TLR-4: *toll-like receptor 4*, TNF-α: *tumor necrosis factor alpha*.

As reações foram realizadas com Master Mix SYBR Green (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, USA, cat.: A6002). Onde, 5 μL da amostra foram misturados com 12,5 μL de Master Mix [2x], 0,5 μL de cada *primer* (*sense* e *antisense*) [10 μM] e 6,5 μL de água *nuclease-free*. As amostras de cDNA foram usadas na diluição [1:2].

As amostras foram avaliadas em duplicata e a concentração dos *primers* e da amostra foram definidas após testes.

A reação de PCR foi realizada no termociclador CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (BioRad, sistema CFX96™ Touch, EUA. Cat.: 184-5096) com o seguinte protocolo de ciclagem:

Temperatura inicial de 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, 60°C por 10 segundos e 72°C por 20 segundos. Ao final da última etapa, foi adicionada a curva de *melting*, processada com incrementos de 0,5°C, de 55°C a 95°C.

Em todas as reações foram usados os controles:

a) NTC (do inglês *no template control*) – tubo com todos reagentes da reação para a síntese de cDNA, exceto amostra de RNA;

b) NRT (do inglês *no reverse transcriptase*) – tubo com todos os reagentes da reação de PCR e amostra de RNA que na etapa de síntese de cDNA foi incubado com todos os reagentes da síntese, exceto a enzima transcriptase;

c) Branco – na reação de PCR tubo com todos os reagentes e água no lugar de amostra.

Após o término da reação o arquivo gerado foi exportado para pen drive e analisado no software do aparelho termociclador (Bio-Rad CFX Manager 2.1. 1022.05.23), o *threshold* ajustado e os cT (do inglês *cycle threshold*, limiar do ciclo) das amostras determinados. A amplificação foi considerada positiva quando apresentava curva de amplificação até o cT 40, com TM (temperatura de *melting*) específica para cada alvo.

### 5.9.5 Análise da Expressão Gênica

A expressão gênica foi considerada detectável quando apresentava curva de amplificação com cT até 40 e com TM específica para cada alvo.

O método de Livak e Schmittgen (2001) usando a fórmula  $2^{\Delta\Delta cT}$  foi usado para calcular a expressão gênica relativa. Inicialmente o  $\Delta cT$  foi calculado subtraindo o valor de cT do gene alvo do valor de cT do gene referência ( $\beta$ -actina), e o valor de  $\Delta cT$  obtido aplicado na fórmula  $2^{\Delta\Delta cT}$ .

## 5.10 Análise histológica

Para a análise histológica, amostras hepáticas, pancreáticas e intestinais (secções transversais), foram fixadas em formalina (10%), desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol, impregnadas em parafina e após esse processo, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina. Posteriormente, foram cortados fragmentos com espessura de 5 µm e corados com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) para exame histológico.

A análise foi realizada em 30 campos de alta potência escolhidos aleatoriamente em grande aumento (HPFs; 20x ampliação microscópica) em cada lâmina.

A classificação da gravidade da esteatose hepática foi a seguinte: grau 0, evidência mínima ou inexistente de esteatose 0-5%; grau 1, esteatose leve 6-33%; grau 2, esteatose moderada a grave 34-66%; grau 3, esteatose grave 66-100%. O portal e a inflamação lobular também foram pontuados da seguinte forma: grau 0, mínima ou nenhuma evidência de inflamação; grau 1, inflamação leve; grau 2, inflamação moderada a grave; e grau 3, inflamação grave (Brunt et al., 2011).

As preparações de pâncreas foram avaliadas quanto ao grau de inflamação, degeneração ou outras alterações morfológicas a serem reportadas qualitativamente (Brunt et al., 2011).

As preparações de intestino grosso e delgado foram avaliadas quanto ao grau de inflamação, aumento/diminuição das vilosidades, edema, degeneração ou outras alterações morfológicas a serem reportadas qualitativamente (Brunt et al., 2011).

## 5.11 Medição do teor de gordura hepática

Para determinação e quantificação do conteúdo de gordura total hepática, foi utilizado o método de Bligh e Dyer (1959). De forma resumida, aproximadamente 200g de tecido hepático foram homogeneizados em 0,8 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado no homogenato 1 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio e as amostras foram submetidas a vórtex por 1 min. Logo após, foram adicionados 1 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio e as amostras foram agitadas em vórtex por 2 minutos e depois centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos para separar a fase aquosa. Para remover os vestígios de água, a fase de clorofórmio foi transferida

para um tubo contendo 1g de sulfato de sódio. Uma alíquota de 0,5 ml de fase de clorofórmio sem água foi transferida para um tubo de ensaio e incubada em um forno com circulação de ar forçada a 75°C por 12 horas para evaporar todo o clorofórmio, de forma que ficasse somente a gordura no tubo. Após esse intervalo de tempo, o tubo de ensaio foi pesado novamente.

O resultado foi calculado como a diferença entre os tubos sobre a massa hepática inicial (Bligh; Dyer, 1959).

### 5.12 Expressão proteica

A expressão proteica das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 no tecido adiposo epididimal foi quantificada pela técnica de ELISA. A quantificação foi realizada em homogenato de tecido em solução contendo inibidores de protease, utilizando kits específicos para essas dosagens (TNF- $\alpha$  – *catalog number*: DY410, R&D System; IL-17 – *catalog number*: DY421, R&D System; IL-10 – *catalog number*: 431411, BioLegend®), seguindo as recomendações do fabricante.

### 5.13 Análise estatística

Para análise dos dados, a normalidade foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Após o resultado do teste de normalidade, para a microbiota intestinal foi utilizado o teste paramétrico (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e os dados expressos como média e desvio padrão.

Para as demais variáveis, foi utilizado teste não paramétrico (Kruskal-Wallis) seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, pois a condição primordial para a utilização de similares paramétricos não foi satisfeita, ou seja, não houve distribuição normal padrão para os resultados.

Todos os testes de hipóteses desenvolvidos nesse trabalho consideraram uma significância quando p-valor foi menor ou igual a 0,05. O software utilizado nas análises foi o SPSS V20.

Para confecção dos gráficos, foi utilizado o GraphPad Prism 8.

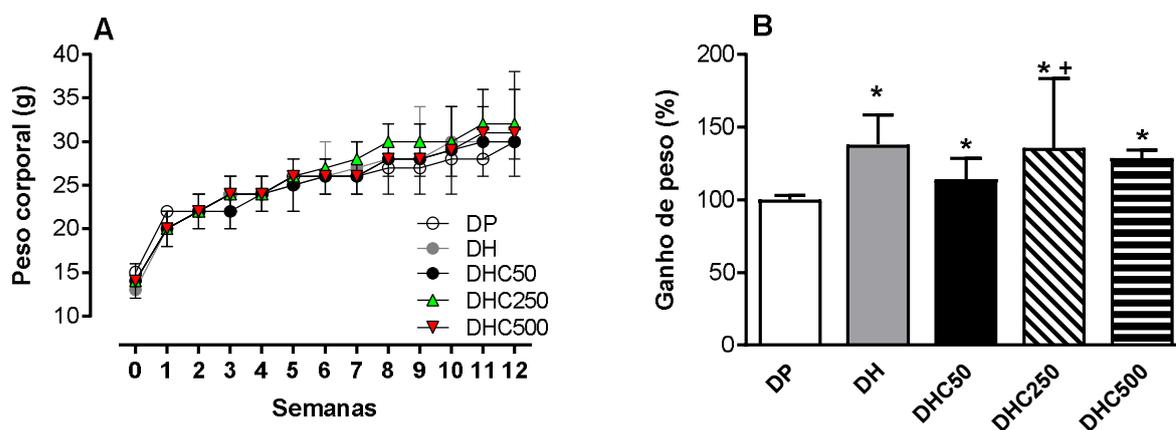
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Peso corporal

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente. Foi possível observar que os animais de todos os grupos partiram de pesos próximos no início do experimento (S0). A partir da S9 foi possível notar que os pesos começaram a diferir, mas sem diferença significativa. Já no final do tratamento (S12), observou-se que o DHC250 apresentou valor maior de peso quando comparado aos grupos DP e DHC50 (Figura 9A).

Para a porcentagem do ganho de peso, notou-se que o grupo DP teve a menor média, sendo este grupo diferente de todos os demais grupos. Outra comparação significativa encontrada nessa variável é entre o grupo DHC50 que teve menor média (~22%) em comparação com o DHC250. Embora não significativo, o grupo DHC50 apresentou uma redução no ganho de peso de aproximadamente 16% quando comparado ao grupo DH (Figura 9B).

**Figura 9** - Peso corporal (g) ao longo do período experimental (A). Porcentagem de ganho de peso ao final do período experimental (B).



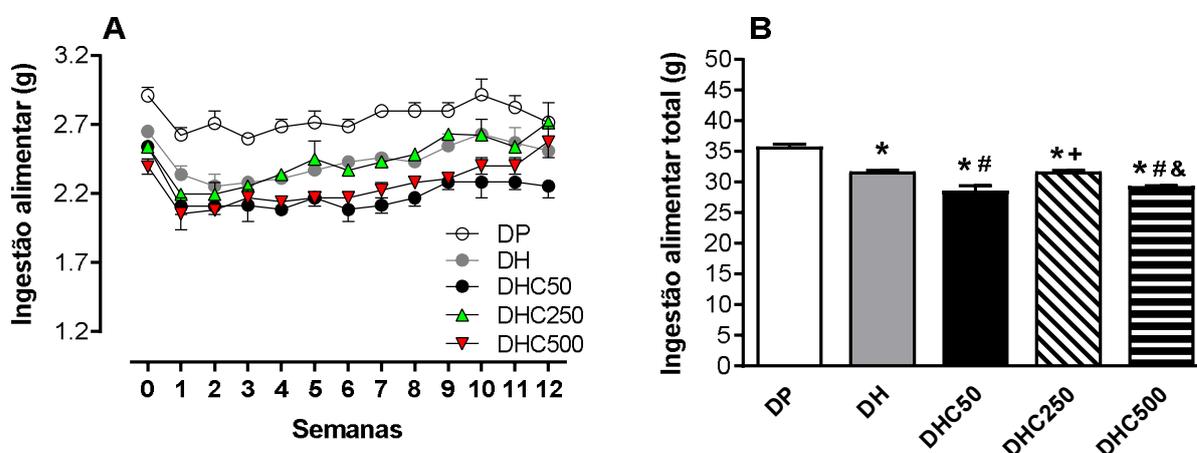
Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil,  $n = 10/\text{grupo}$ ,  $P < 0.05$ . DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. \*diferente de DP, +diferente de DHC50.

## 6.2 Ingestão alimentar

Foi possível observar que o grupo DP foi o grupo que apresentou maiores valores de ingestão ao decorrer de todo experimento. Os grupos DHC50 e DHC500 se comportaram de forma semelhante, diferindo apenas na S12 (final do experimento) (Figura 10A).

Ao analisar a ingestão total (g), notou-se que todos os grupos de DH apresentaram menor consumo quando comparado ao grupo DP. Observou-se também que os grupos DHC50 e DHC500 ingeriram menos do que o grupo DH (~9% e 8% respectivamente). Outras duas comparações significantes nessa variável foram que o grupo DHC250 apresentou maior valor de ingestão (~12%) quando comparado ao grupo DHC50 e o grupo DHC500 apresentou menor valor (~8%) quando comparado ao grupo DHC250 (Figura 10B).

**Figura 10** - Ingestão alimentar (g) ao longo do período experimental (A). Ingestão alimentar total (g) ao final do período experimental (B).



Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil,  $n = 10/\text{grupo}$ ,  $P < 0.05$ . DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. \*diferente de DP, #diferente de DH, +diferente de DHC50, &diferente de DHC250.

### 6.3 Peso dos tecidos

As variáveis peso dos tecidos estão descritas na Tabela 5.

Ao analisar o fígado, as únicas diferenças encontradas foram um aumento dos grupos DHC250 e DHC500 em aproximadamente 15% e 12%, respectivamente, quando comparados ao grupo DHC50.

Quando aferido o peso do pâncreas, todos os grupos de DH se diferiram do grupo DP, sendo esse último, o grupo que apresentou menor peso para esse tecido.

Em relação aos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, observou-se que os grupos de DH se diferiram do grupo DP, sendo esse último, o grupo que apresentou menores pesos para esses tecidos.

E, por fim, quando se examinou o peso do tecido adiposo marrom (TAM), notou-se que os grupos DHC250 e DHC500 apresentaram maiores valores (~43% e 29%, respectivamente) quando comparados ao grupo DH.

**Tabela 5** - Peso dos tecidos\*\* nos diferentes grupos experimentais.

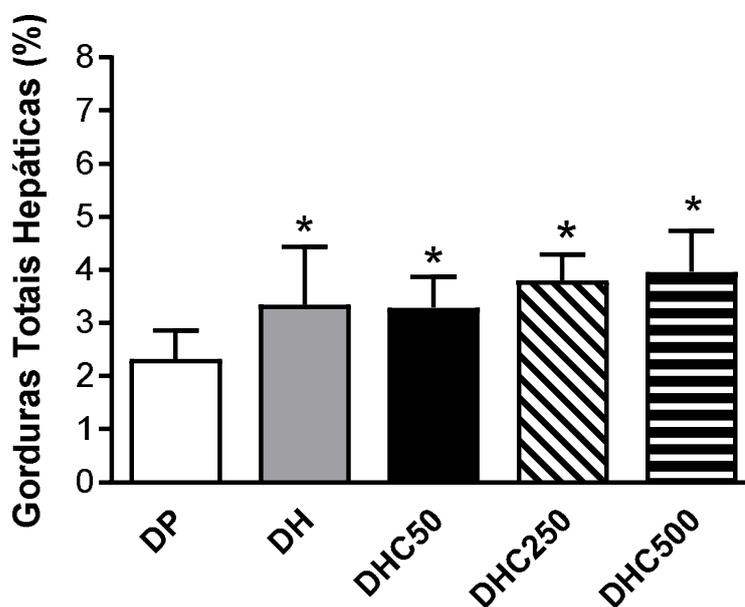
	DP	DH	DHC50	DHC250	DHC500
Fígado (g)	1,04 [0,84;1,14]	1,03 [0,77;1,14]	0,95 [0,80;1,10]	1,09 [0,93;1,26] <sup>+</sup>	1,06 [0,94;1,17] <sup>+</sup>
Pâncreas (g)	0,13 [0,08;0,16]	0,17 [0,13;0,25] <sup>*</sup>	0,16 [0,14;0,20] <sup>*</sup>	0,17 [0,13;0,20] <sup>*</sup>	0,17 [0,13;0,20] <sup>*</sup>
TAR (g)	0,12 [0,04;0,28]	0,28 [0,12;0,60] <sup>*</sup>	0,42 [0,04;0,66] <sup>*</sup>	0,43 [0,20;0,62] <sup>*</sup>	0,36 [0,04;0,78] <sup>*</sup>
TAE (g)	0,50 [0,26;0,92]	0,92 [0,56;1,80] <sup>*</sup>	1,18 [0,14;1,70] <sup>*</sup>	1,41 [0,69;2,13] <sup>*</sup>	1,13 [0,22;2,26] <sup>*</sup>
TAM (g)	0,08 [0,05;0,10]	0,07 [0,04;0,09]	0,08 [0,07;0,71]	0,10 [0,07;0,15] <sup>#</sup>	0,09 [0,08;0,12] <sup>#</sup>

Valores estão representados como mediana, mínimo e máximo, n = 10/grupo, P < 0.05. DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. TAR, tecido adiposo retroperitoneal; TAE, tecido adiposo epididimal; TAM, tecido adiposo marrom. <sup>\*</sup>diferente de DP, <sup>#</sup>diferente de DH, <sup>+</sup>diferente de DHC50. <sup>\*\*</sup>Peso corrigido para g/100g de peso corporal.

### 6.4 Gorduras totais hepáticas

Ao analisar a porcentagem das gorduras totais hepáticas, observou-se que os grupos de DH diferiram-se do grupo DP, sendo esse último, o grupo que apresentou menor valor médio (Figura 11).

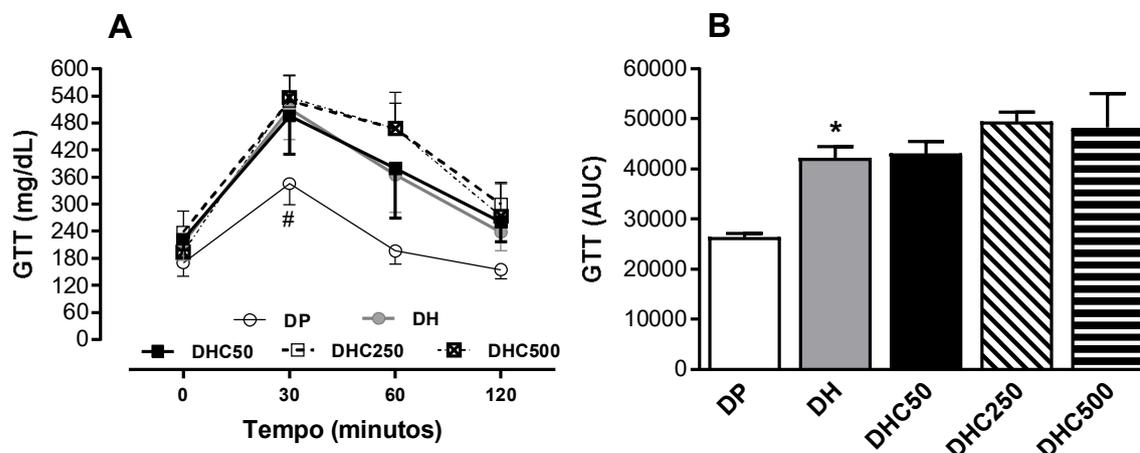
**Figura 11** - Porcentagem das gorduras totais hepáticas analisadas ao final do período experimental.



Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil,  $n = 10/\text{grupo}$ ,  $P < 0.05$ . DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. \*diferente de DP.

### 6.5 Teste de tolerância a glicose (GTT)

Observa-se na figura 12A que as glicemias de jejum no tempo 0' não apresentaram diferença em nenhum dos grupos. Após a sobrecarga de glicose, houve aumento da glicemia em todos os grupos. Ao longo do teste, a única diferença significativa encontrada foi entre os grupos DP e DH no tempo 30', sendo o grupo DH mostrando-se menos tolerante à glicose, com valor ~60% maior. Na figura 12B está representada a AUC, onde foi possível encontrar diferença apenas no grupo DH quando comparado ao grupo DP.

**Figura 12** - Teste de tolerância a glicose (GTT) (A). Área sob a curva (AUC) (B).

Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil,  $n = 10/\text{grupo}$ ,  $P < 0.05$ . DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. GTT, glucose tolerance test; AUC, area under the curve. \*diferente de DP, #diferente de DH.

## 6.6 Análise histológica

Na figura 13, observa-se as lâminas de fígado. (A) grupo DP, (B) grupo DH, (C) grupo DHC50, (D) grupo DHC250 e, (E) grupo DHC500.

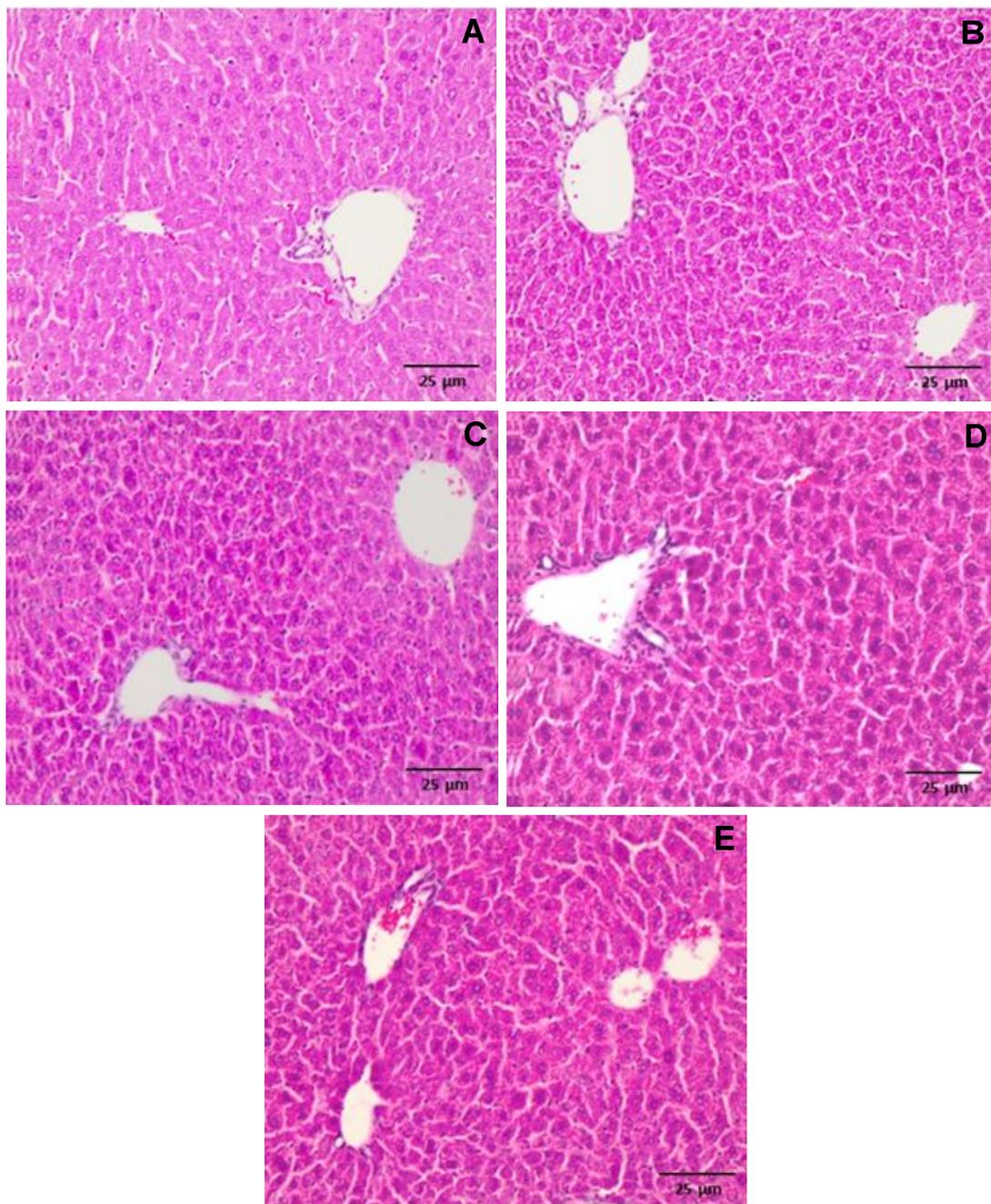
Na figura 14, observa-se as lâminas de pâncreas. (A) grupo DP, (B) grupo DH, (C) grupo DHC50, (D) grupo DHC250 e, (E) grupo DHC500.

Na figura 15, observa-se as lâminas de intestino delgado. (A) grupo DP, (B) grupo DH, (C) grupo DHC50, (D) grupo DHC250 e, (E) grupo DHC500.

E, na figura 16, observa-se as lâminas de intestino grosso. (A) grupo DP, (B) grupo DH, (C) grupo DHC50, (D) grupo DHC250 e, (E) grupo DHC500.

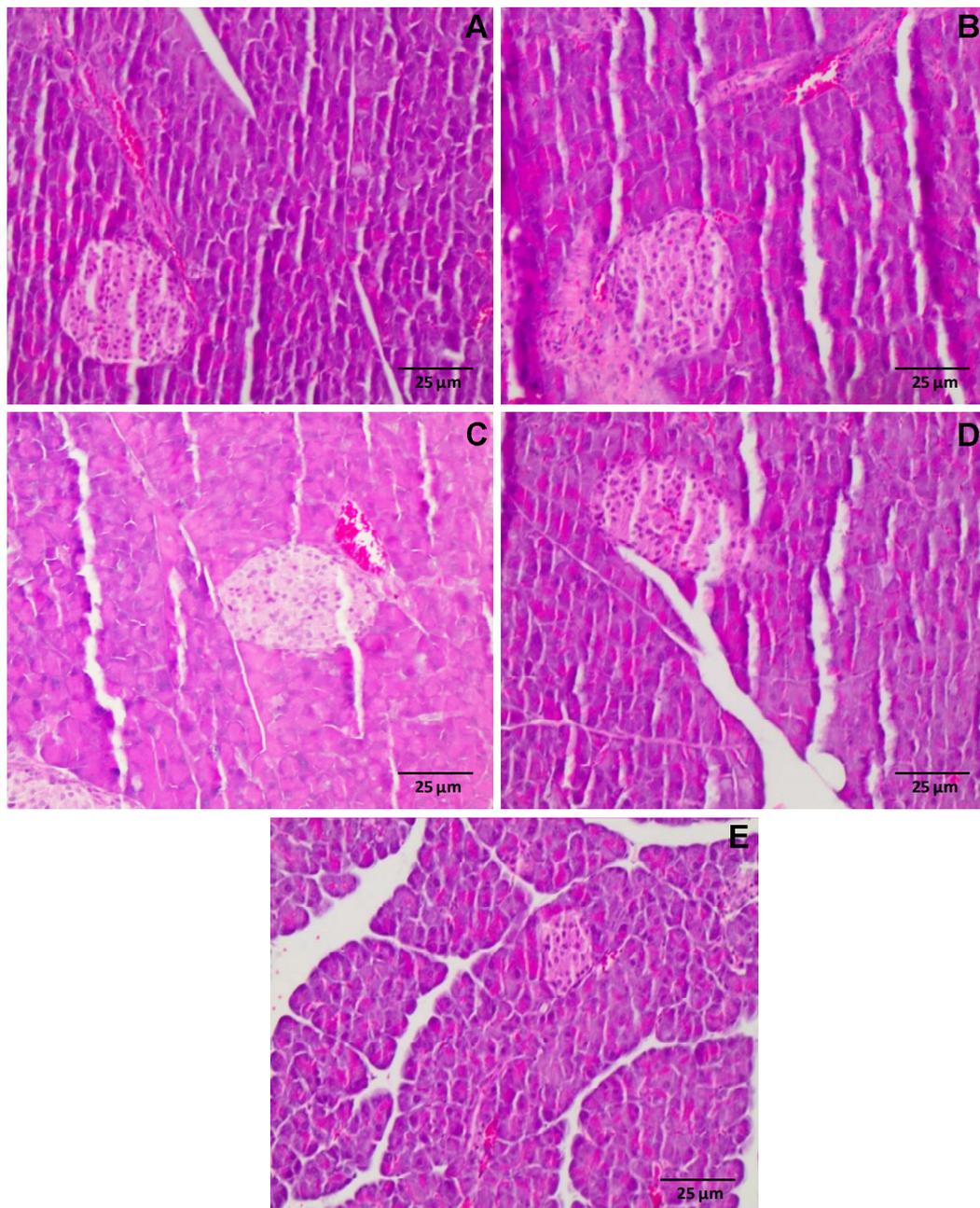
Diante da análise realizada, foi possível observar nenhuma alteração histológica em nenhum órgão em nenhum dos grupos, bem como aparência normal em todos os tecidos.

**Figura 13** - Análise histológica do fígado nos diferentes grupos experimentais.



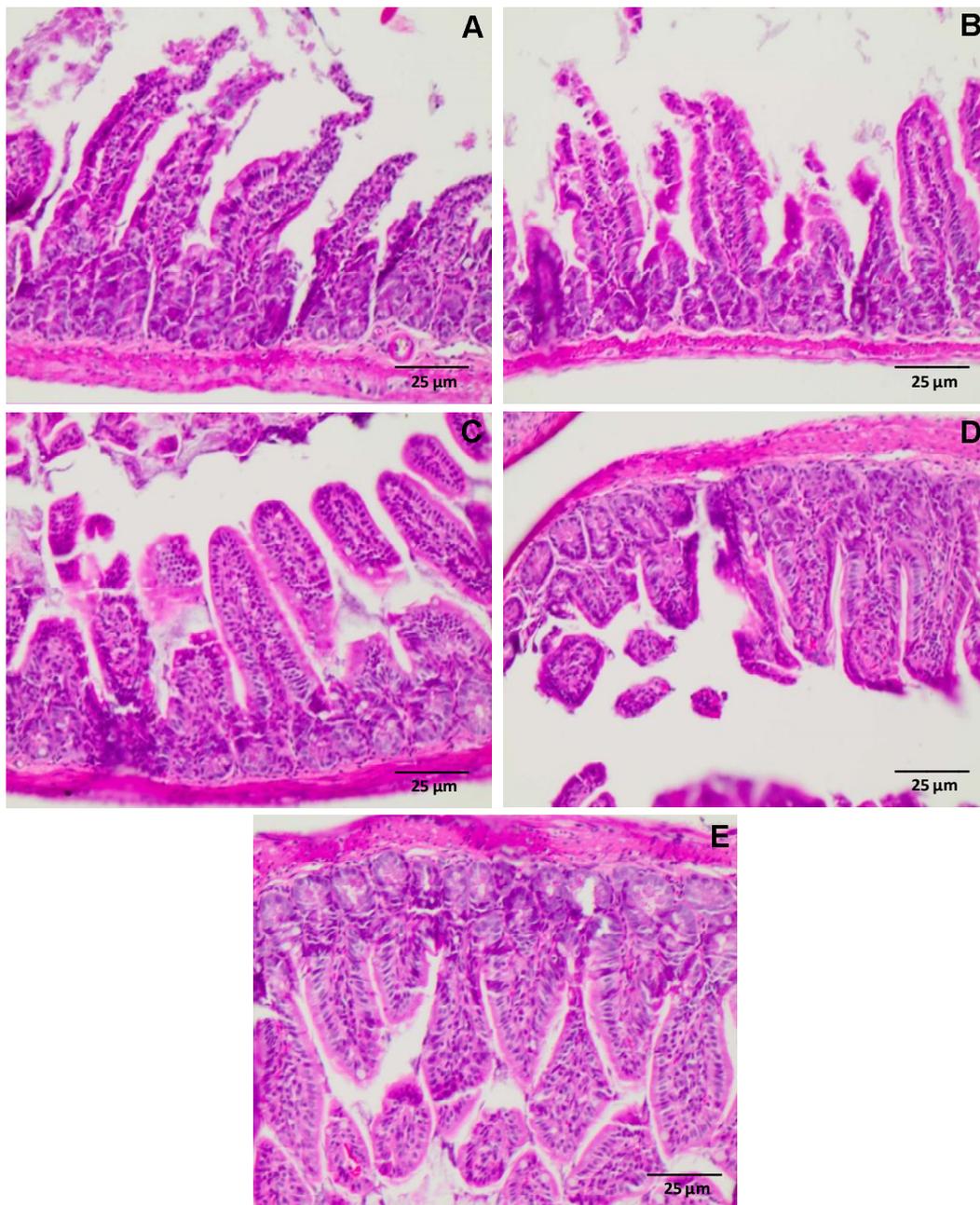
Fotomicrografias do fígado de animais alimentados com: A. dieta padrão (DP), B. dieta hiperlipídica (DH), C. dieta hiperlipídica + 50mg de curcumina/kg de peso (DHC50), D. dieta hiperlipídica + 250mg de curcumina/kg de peso (DHC250), E. dieta hiperlipídica + 500mg de curcumina/kg de peso (DHC500). (HE - Hematoxilina e Eosina, aumento de 20x).

**Figura 14** - Análise histológica do pâncreas nos diferentes grupos experimentais.



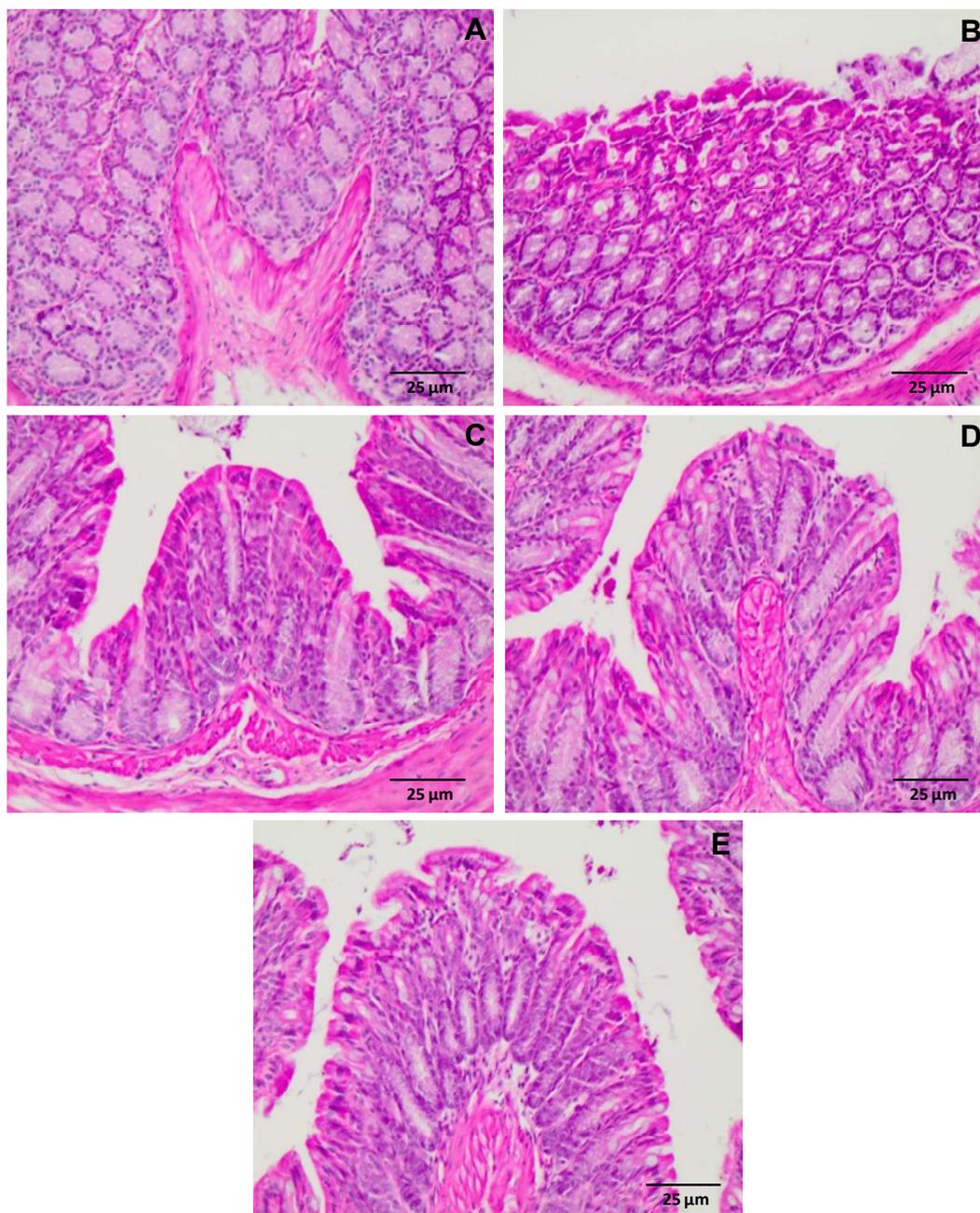
Fotomicrografias do pâncreas de animais alimentados com: A. dieta padrão (DP), B. dieta hiperlipídica (DH), C. dieta hiperlipídica + 50mg de curcumina/kg de peso (DHC50), D. dieta hiperlipídica + 250mg de curcumina/kg de peso (DHC250), E. dieta hiperlipídica + 500mg de curcumina/kg de peso (DHC500). (HE - Hematoxilina e Eosina, aumento de 20x).

**Figura 15** - Análise histológica do intestino delgado nos diferentes grupos experimentais.



Fotomicrografias do intestino delgado de animais alimentados com: A. dieta padrão (DP), B. dieta hiperlipídica (DH), C. dieta hiperlipídica + 50mg de curcumina/kg de peso (DHC50), D. dieta hiperlipídica + 250mg de curcumina/kg de peso (DHC250), E. dieta hiperlipídica + 500mg de curcumina/kg de peso (DHC500). (HE - Hematoxilina e Eosina, aumento de 20x).

**Figura 16** - Análise histológica do intestino grosso nos diferentes grupos experimentais.



Fotomicrografias do intestino grosso de animais alimentados com: A. dieta padrão (DP), B. dieta hiperlipídica (DH), C. dieta hiperlipídica + 50mg de curcumina/kg de peso (DHC50), D. dieta hiperlipídica + 250mg de curcumina/kg de peso (DHC250), E. dieta hiperlipídica + 500mg de curcumina/kg de peso (DHC500). (HE - Hematoxilina e Eosina, aumento de 20x).

## 6.7 Perfil bioquímico

As análises do perfil bioquímico estão descritas na Tabela 6.

Ao analisar o TG, observou-se que todos os grupos de DH se diferiram de DP, sendo esse último, o grupo que apresentou maior valor. Apesar do grupo DHC50 ter apresentado um menor valor em comparação ao grupo DH, não houve diferença.

Quando examinado o CT, notou-se que os grupos DH suplementados diferiram-se do grupo DP, além de que os grupos DHC250 e DHC500 apresentaram valores maiores (~16% e 36%, respectivamente) quando comparado ao DH.

No que se refere ao LDL, não houve diferença entre os grupos de DH, sendo os grupos DHC50 e DHC250 os únicos diferentes quando comparado ao DP. Observou-se que a suplementação de curcumina não foi efetiva em prevenir esse aumento.

Ao analisar o índice aterogênico (IC), nenhuma diferença foi encontrada.

Em relação à insulina, foi possível notar que todos os grupos de DH foram diferentes do grupo DP, sendo esse último grupo o que apresentou menor valor para essa variável. Notou-se também que o grupo DHC250 apresentou maior valor (~40%) quando comparado ao grupo DH.

Para a glicemia, observa-se que os grupos DH, DHC50 e DHC250 apresentaram valores maiores (~21%, ~29% e ~28%, respectivamente) quando comparados ao grupo DP. Observou-se também que o grupo DHC500 apresentou valor menor quando comparado aos grupos DHC50 e DHC250 e apesar de não significativo, o grupo DHC500 apresentou menor valor (~11%) também quando comparado ao grupo DH, sugerindo um possível efeito preventivo da curcumina nessa dose no aumento da glicemia.

**Tabela 6** - Análise do perfil bioquímico realizado ao final do estudo nos diferentes grupos experimentais.

	DP	DH	DHC50	DHC250	DHC500
TG (mg/dL)	170 [108;402]	97 [62;176]*	94 [41;123]*	113 [64;156]*	102 [71;177]*
CT (mg/dL)	125 [91;193]	162 [75;190]	172 [106;260]*	188 [137;297]**	220 [162;245]**
HDL (mg/dL)	83 [64;121]	91 [70;167]	93 [61;151]	108 [45;140]	103 [69;151]
LDL (mg/dL)	89 [62;109]	118 [53;187]	112 [70;208]*	131 [73;226]*	103 [59;185]
IA (%)	0,61 [0,15;1,51]	0,78 [0,07;1,35]	0,95 [0,28;1,61]	0,87 [0,27;2,98]	1,11 [0,21;2,03]
Insulina (ng/mL)	0,20 [0,04;0,60]	0,48 [0,13;0,62]*	0,64 [0,31;1]*	0,67 [0,25;0,99]**	0,63 [0,27;1,20]*
Glicemia (mg/dL)	177 [120;211]	214 [141;276]*	227 [182;250]*	226 [190;329]*	191 [159;223]*&

Valores estão representados como mediana, mínimo e máximo, n = 10/grupo, P < 0.05. DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. TG, triglicérides; CT, colesterol total; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; IA, índice aterogênico. \*diferente de DP, #diferente de DH, \*diferente de DHC50, &diferente de DHC250.

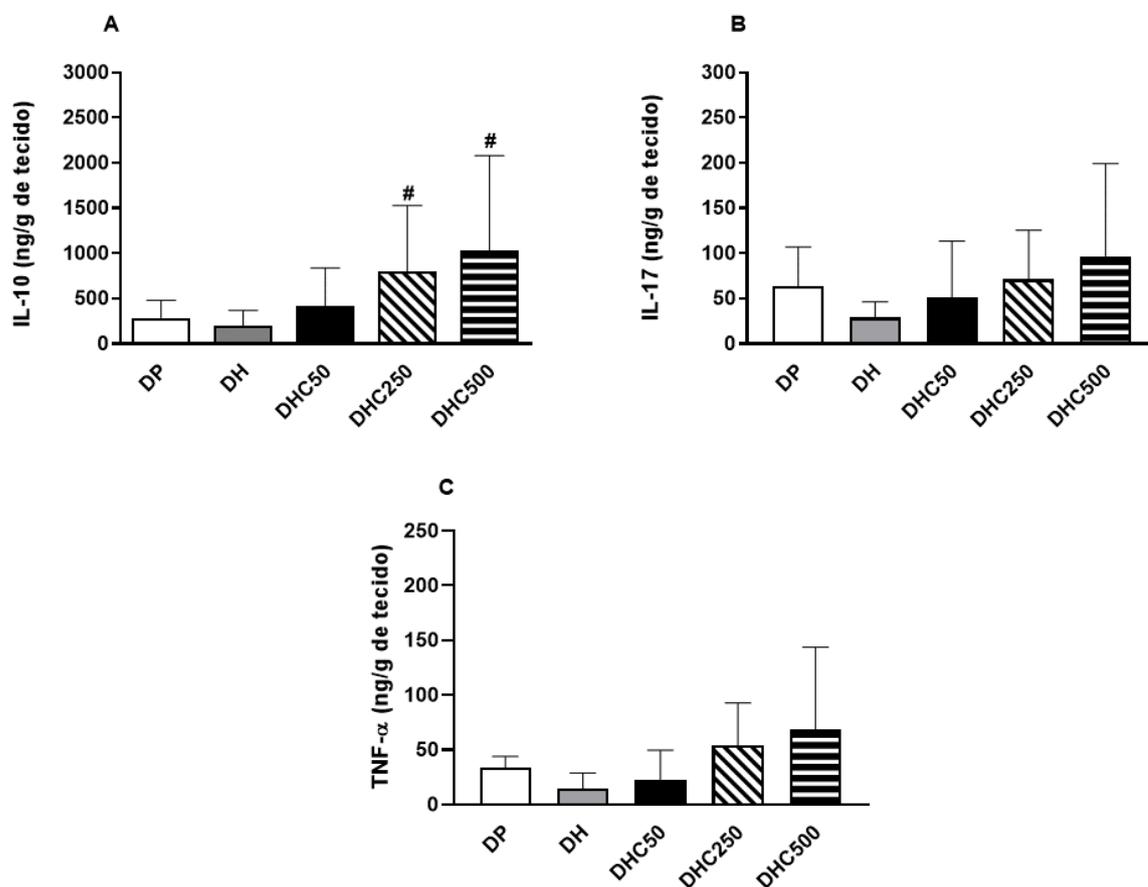
## 6.8 Expressão proteica

A expressão proteica de IL-10, IL-17 e TNF- $\alpha$  foi mensurada no tecido adiposo epididimal.

Ao analisar a expressão de IL-10, as diferenças encontradas foram nos grupos DHC250 e DHC500 quando comparados ao grupo DH, uma vez que esses grupos suplementados apresentaram maiores valores de expressão. Apesar de sem diferença estatística, a expressão dessa citocina no grupo DHC50 estava aumentada em ~106% em comparação ao grupo DH. (Figura 17A).

Quando investiga a expressão de IL-17 e TNF- $\alpha$ , não foi possível encontrar diferenças estatística (Figuras 17B-C).

**Figura 17** - Taxa de expressão proteica no tecido adiposo epididimal de IL-10 (A), IL-17 (B) e TNF- $\alpha$  (C) analisadas ao final do período experimental.



Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil,  $n = 10$ /grupo,  $P < 0.05$ . DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. IL-10: interleucina 10, IL-17: interleucina 17, TNF- $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*. #diferente de DH.

## 6.9 Expressão gênica

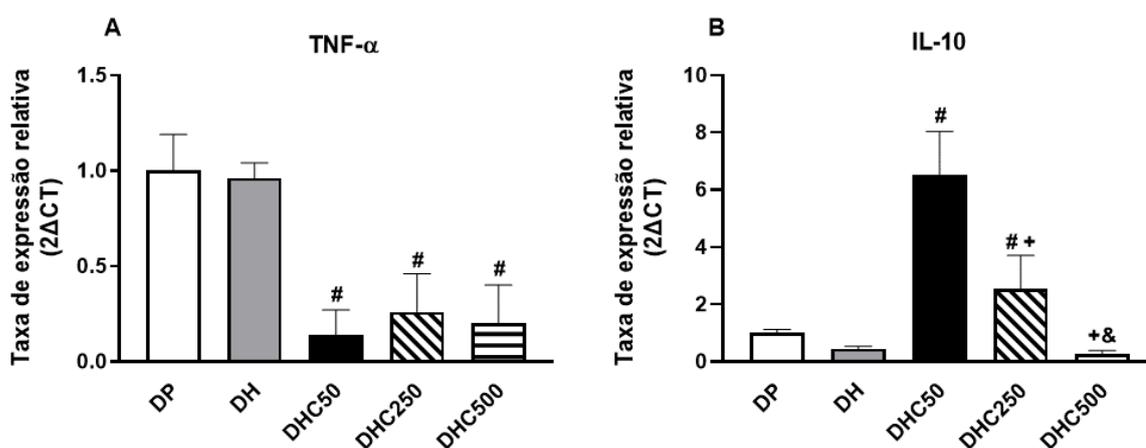
Para as análises da expressão gênica, primeiro serão apresentados os resultados das citocinas expressas no fígado (Figura 18A e 18B), logo após, no tecido adiposo retroperitoneal (Figura 19A e 19B) e por último, no tecido adiposo epididimal (Figura 20A e 20B).

Quando analisada a citocina IL-6, não foi possível detectar nenhuma expressão em nenhum dos tecidos.

No fígado, em relação ao TNF- $\alpha$ , nota-se que as três doses (50 mg, 250mg e 500 mg) reduziram a expressão em aproximadamente 85%, 73% e 79%, respectivamente, quando comparadas ao grupo DH (Figura 18A).

Ao verificar a expressão de IL-10, os grupos DHC50 e DHC250 apresentaram 14x e 5x mais expressão, respectivamente quando comparados ao grupo DH (Figura 18B).

**Figura 18** - Taxa de expressão gênica relativa de TNF- $\alpha$  (A) e de IL-10 (B) no fígado, calculada pelo método  $2\Delta\Delta CT$  a partir de CT obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.

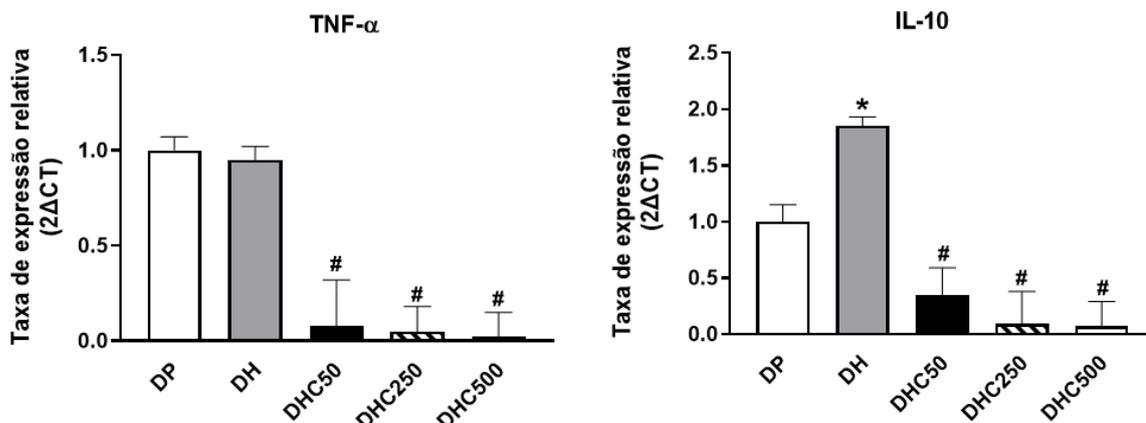


Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil, n = 10/grupo, P <0.05. DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. TNF- $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*, IL-10: interleucina 10. #diferente de DH, +diferente de DHC50 e &diferente de DHC250.

Já no tecido adiposo retroperitoneal, para o TNF- $\alpha$  observou-se uma redução nos grupos DHC50, DHC250 e DHC500 em 92%, 95% e 98%, respectivamente, quando comparados ao grupo DH (Figura 19A).

Quando analisada a expressão de IL-10, um aumento de 85% foi observado no grupo DH quando comparado ao grupo DP. E, reduções de 81%, 95% e 96% foram observadas nos grupos DHC50, DHC250 e DHC500, respectivamente, quando comparadas ao grupo DH (Figura 19B).

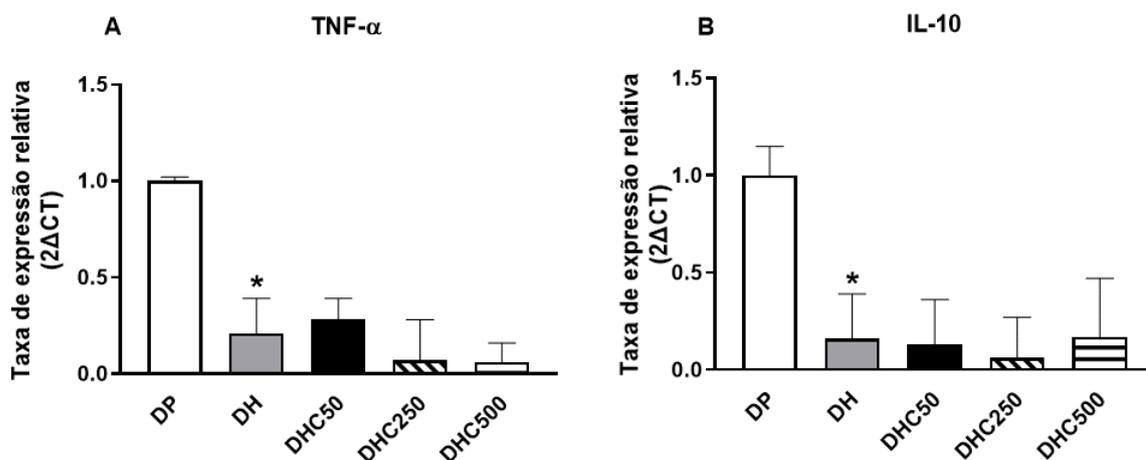
**Figura 19** - Taxa de expressão gênica relativa de TNF- $\alpha$  (A) e de IL-10 (B) no tecido adiposo retroperitoneal, calculada pelo método  $2\Delta\Delta CT$  a partir de CT obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.



Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil, n = 10/grupo, P < 0.05. DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. TNF- $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*, IL-10: interleucina 10. #diferente de DH.

No tecido adiposo epididimal, para o TNF- $\alpha$  notou-se uma redução de 79% e para a IL-10 uma redução de 84% no grupo DH quando comparado ao grupo DP. (Figura 20A e 20B).

**Figura 20** - Taxa de expressão gênica relativa de TNF- $\alpha$  (A) e de IL-10 (B) no tecido adiposo epididimal, calculada pelo método  $2\Delta\Delta CT$  a partir de CT obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.



Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil, n = 10/grupo, P < 0.05. DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. TNF- $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*, IL-10: interleucina 10. \*diferente de DP.

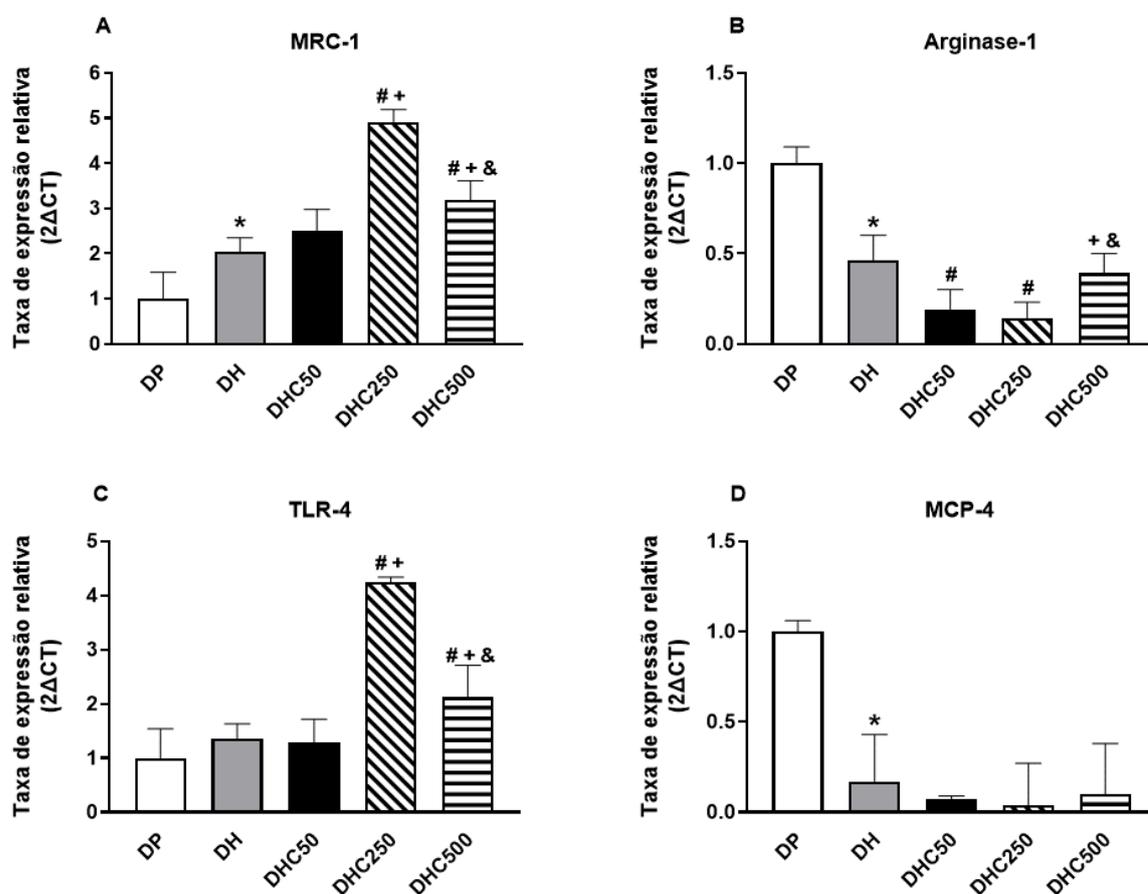
Ainda no tecido adiposo epididimal, ao analisar a expressão gênica do MRC-1, observou-se um aumento de 104% no grupo DH comparado ao DP. Em relação à suplementação, observou-se que os grupos DHC250 e DHC500 tiveram aumento de 140% e 56%, respectivamente quando comparados ao grupo DH. Os grupos DHC250 e DHC500 também aumentaram em 95% e 27%, respectivamente quando comparados ao grupo DH50 (Figura 21A).

Para o gene Arg-1, o grupo DH apresentou redução de 54% quando comparado ao grupo DP. Já os grupos DHC50 e DHC250 reduziram em 59% e 69% quando comparados ao grupo DH. O grupo DHC500, quando comparado aos grupos DHC50 e DHC250, apresentou aumento de 105% e 178%, respectivamente (Figura 21B).

Em relação ao TLR-4, observou-se aumento de 324% e 55% nos grupos DHC250 e DHC500 quando comparados ao grupo DH (Figura 21C).

Ao analisar o gene MPC-4, a única diferença observada foi uma redução de 83% no grupo DH quando comparado ao grupo DP (Figura 21D).

**Figura 21** - Taxa de expressão gênica relativa de MRC-1 (A), de Arginase-1 (B), de TLR-4 (C) e de MCP-4 (D) no tecido adiposo epididimal, calculada pelo método  $2\Delta\Delta CT$  a partir de CT obtidos de RT-PCR, usando o gene  $\beta$ -actina como gene referência.



Valores estão representados como mediana e intervalo interquartil, n = 10/grupo, P < 0.05. DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. MRC-1: *mannose receptor c-type 1*, TLR-4: *toll-like receptor 4*, MCP-4: *monocyte chemoattractant protein 4*. \*diferente de DP, #diferente de DH, +diferente de DHC50 e &diferente de DHC250.

## 6.10 Microbiota intestinal

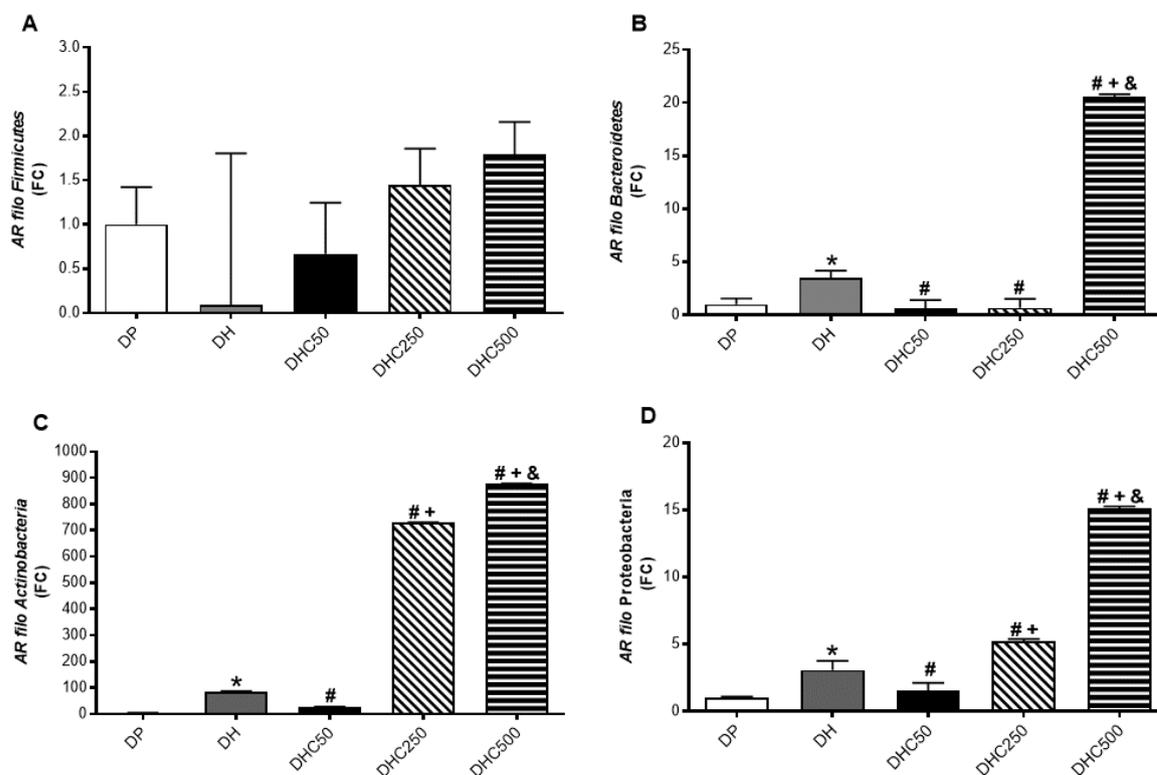
Na figura 22, em A, nota-se a abundância relativa do filo *Firmicutes*. Para esse filo não foi possível encontrar diferenças significativas, apesar do grupo DH ter apresentado uma diminuição (~91%) quando comparado ao grupo DP, e um aumento nos grupos DHC50 (~644%), DHC250 (~1511%) e DHC500 (~1888%), quando comparados ao grupo DH.

Em B, nota-se a abundância relativa do filo *Bacteroidetes*, onde o grupo DH apresentou maior abundância quando comparado ao DP (~251%) e os grupos DHC50 e DHC250 tiveram diminuição na abundância desse filo quando comparado ao DH (~82% e ~81%, respectivamente). Para o grupo DHC500 foi possível encontrar diferenças quando comparado os grupos DH (~485%), DHC50 e DHC250, sendo o grupo DHC500 o que apresentou maior valor.

Em C, nota-se a abundância relativa do filo *Actinobacteria*. Foi possível notar que o grupo DH apresentou maior abundância quando comparado ao grupo DP (~8375%). Além de que o grupo DHC50 teve menor abundância do que o grupo DH (~69%). Já os grupos DHC250 e DHC500, apresentaram valores maiores quando comparados aos grupos DH (~760% e ~935%, respectivamente) e DHC50.

E, em D, nota-se a abundância relativa do filo *Proteobacteria*. Para esse filo, observou-se que o grupo DH apresentou maior abundância quando comparado ao grupo DP (~208%). Já os grupos DHC250 e DHC500, apresentaram valores maiores quando comparados aos grupos DH (~69 e ~391%, respectivamente) e DHC50. O grupo DHC500 apresentou valores maiores do que o grupo DHC250. O principal achado foi que o grupo DHC50 apresentou menor abundância quando comparado ao grupo DH (~49%).

**Figura 22** - Abundância relativa dos filos *Firmicutes* (A), *Bacteroidetes* (B), *Actinobacteria* (C) e *Proteobacteria* (D) expressos na microbiota intestinal.



Valores estão representados como média  $\pm$  DP,  $n = 10/\text{grupo}$ ,  $P < 0.05$ . DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. AR, abundância relativa; FC, *fold change*. \*diferente de DP, #diferente de DH. +diferente de DHC50. &diferente de DHC250.

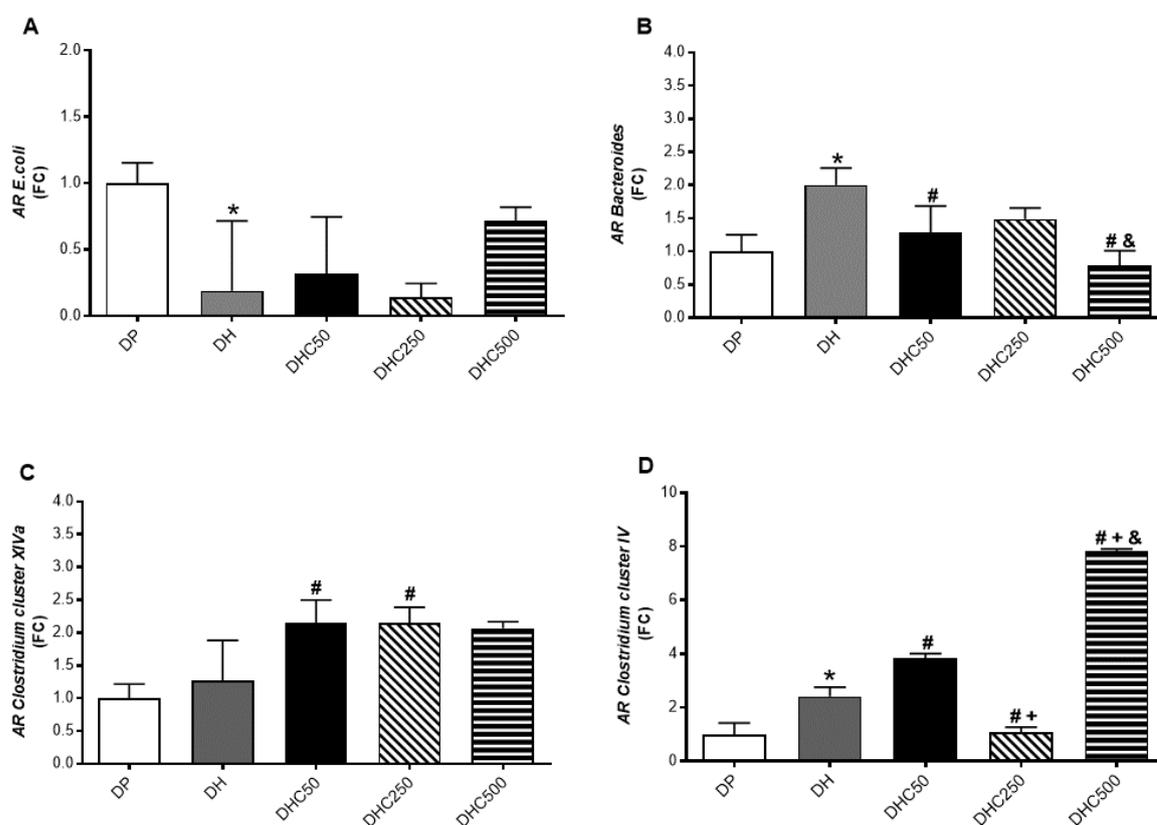
Ao nível de gênero, na figura 23, em A, nota-se a abundância relativa do gênero *E. coli*. Para esse gênero, a suplementação nas diferentes doses não apresentou alteração, sendo observado somente uma redução significativa ( $\sim 81$ ) no grupo DH quando comparado ao grupo DP.

Em B, nota-se a abundância relativa do gênero *Bacteroides*, onde o grupo DH apresentou maior abundância quando comparado ao DP ( $\sim 100\%$ ) e os grupos DHC50 e DHC500 tiveram diminuição na abundância desse gênero quando comparado ao DH ( $\sim 35,5\%$  e  $\sim 60,5\%$ , respectivamente).

Em C, nota-se a abundância relativa do gênero *Clostridium cluster XIVa*. Foi possível notar que as doses de 50 mg e 250 mg promoveram aumento ( $\sim 69\%$  em ambas as doses) na abundância quando comparado ao grupo DH.

E, em D, nota-se a abundância relativa do gênero *Clostridium cluster IV*. Para esse gênero, observou-se que o grupo DH apresentou maior abundância quando comparado ao grupo DP (~141%). Já os grupos DHC50 e DHC500, apresentaram valores maiores quando comparados aos grupos DH (~58,5 e ~224%, respectivamente). O grupo DHC250 apresentou valor menor (~55%) quando comparado ao grupo DH.

**Figura 23** - Abundância relativa dos gêneros *E. coli* (A), *Bacteroides* (B), *Clostridium cluster XIVa* (C) e *Clostridium cluster IV* (D) expressos na microbiota intestinal.



Valores estão representados como média  $\pm$  DP, n = 10/grupo, P < 0.05. DP, dieta padrão; DH, dieta hiperlipídica; DHC50, dieta hiperlipídica + 50 mg de curcumina/kg de peso; DHC250, dieta hiperlipídica + 250 mg de curcumina/kg de peso; DHC500, dieta hiperlipídica + 500 mg de curcumina/kg de peso. AR, abundância relativa; FC, *fold change*. \*diferente de DP, #diferente de DH. +diferente de DHC50. &diferente de DHC250.

## 7 DISCUSSÃO

Considerando a epidemia da obesidade e todas as complicações a ela associadas, são necessários estudos que avaliem estratégias nutricionais que auxiliem na sua prevenção. Sabe-se que a curcumina tem efeitos benéficos para a saúde, e tem despertado a atenção devido à sua relativa segurança e evidência acumulada de propriedades antiobesogênicas, com efeitos antioxidante, hipoglicemiante, anti-inflamatório tanto em animais como em humanos (Tham et al., 2010; Aziz et al., 2013; Jayaraj et al., 2013), além de possuir ação na redução da resistência à insulina, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, acelerando a oxidação de ácido graxo, bem como o aumento da expressão de enzimas antioxidantes (Alappat; Awad, 2010).

Com base nessas afirmações, esse estudo teve como objetivo avaliar os resultados da adição do extrato de curcumina como suplementação na dieta hiperlipídica de camundongos C57BL/6, investigando assim, o seu possível efeito preventivo no ganho de peso, na melhora do perfil lipídico e glicídico, nas expressões de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como o perfil da microbiota intestinal. Para avaliar estes efeitos, foi utilizado a curcumina em doses de 50, 250 e 500mg/kg de peso.

Alguns resultados importantes foram demonstrados no presente estudo: a curcumina suprimiu o aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$  no fígado e no tecido adiposo retroperitoneal e promoveu aumento da expressão gênica de IL-10 no fígado, também melhorou o perfil da microbiota intestinal por meio da redução de bactérias patobiontes e aumento de bactérias benéficas. Aumento na expressão proteica de IL-10 no tecido adiposo epididimal também foi promovido pela curcumina, além de aumentar a expressão gênica do marcador de macrófago M2 (MRC-1). Outros resultados foram diferentes dos encontrados na literatura.

O presente estudo demonstrou que os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram aumento de peso e a suplementação de curcumina não foi efetiva em prevenir esse aumento, apesar do grupo DHC50 ter apresentado uma redução não significativa de aproximadamente 17% quando comparado ao grupo DH. De forma similar, Neyrinck et al. (2013) mostraram que a administração oral de

cúrcuma associada à pimenta não afetou o ganho de peso entre os grupos dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica com cúrcuma.

Da mesma maneira, Kobori et al. (2018) não encontraram redução no ganho de peso corporal em animais que consumiram DH e suplementação de curcumina. De forma controversa, Kim et al. (2019) encontraram que após 16 semanas de tratamento, a curcumina bloqueou significativamente o efeito da DH no ganho de peso. Com o intuito de encontrar a razão para essa não prevenção do ganho de peso, não foi possível encontrar indícios para essa explicação, pois alguns trabalhos encontram efeito positivo no bloqueio do ganho de peso com menos de 12 semanas na dose de 200mg/kg de peso (Maithilikarpagaselvi et al., 2016).

Em relação a ingestão total (g e kcal), notou-se que os grupos DHC50 e DHC500 apresentaram menor ingestão quando comparado ao grupo DH, o que possivelmente explica a propensão a redução no ganho de peso nesses dois grupos. De forma contrária, alguns estudos encontraram que o consumo alimentar de ratos e camundongos alimentados com DH não mudou com a adição de curcumina (Kobori et al., 2018; Zhao et al., 2018; Panzhinskiy et al., 2019).

Ao analisar o peso dos tecidos, a suplementação de curcumina não alterou o peso do fígado quando comparado ao grupo DH, de forma parecida com o observado por Neyrinck et al. (2013) e Kobori et al. (2018).

Para o pâncreas, o que se notou foi que todos os grupos de DH se diferiram do grupo DP, uma vez que a dieta rica em gordura proporcionou o aumento do peso desse órgão e a suplementação de curcumina não gerou modificações, assim como encontrado por Kobori et al (2018). De forma semelhante, Chen e Nyomba (2003) e Ribeiro et al. (2012), encontraram que DH foi capaz de aumentar significativamente o peso do pâncreas em comparação a dieta controle. Sugere-se que esse aumento do peso do pâncreas pela DH ocorre pelo fato desse tipo de dieta causar hipertrofia das ilhotas pancreáticas, associadas ao aumento de células  $\beta$  e não- $\beta$  (Ribeiro et al., 2012).

A respeito dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal (visceral), os grupos de DH apresentaram maiores pesos em relação ao grupo de DP, como era esperado pelo efeito da dieta, mas a suplementação de curcumina não bloqueou esse aumento. Controversamente, Zhao et al. (2018), constataram que o tratamento com curcumina reduziu níveis de gordura visceral nas doses de 100 e 200mg/kg de peso quando comparado ao grupo de DH. Acredita-se que a redução nos pesos

desses tecidos adiposos poderia ser atribuída principalmente à redução peso corporal, o que não se observou no presente estudo, dificultando assim a redução de acúmulo de gordura.

Para o TAM, os grupos suplementados DHC250 e DHC500 foram diferentes do grupo DH, sendo esses grupos suplementados os de maiores valores para esse tecido. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliem a relação entre suplementação de curcumina e peso de TAM. No entanto, estudos em animais mostram que o TAM é importante na regulação do peso corporal, e é possível que a variação individual na termogênese adaptativa possa ser atribuída a variações na quantidade ou atividade desse tecido. Existem indícios de que estimular a termogênese adaptativa (definida como calor produzido em resposta ao frio e dieta) pode servir como um meio de prevenir ou tratar a obesidade (Lowell; Flier, 1997).

Song et al. (2018) encontraram que intervenção com curcumina aumentou o gasto energético e a temperatura do corpo em resposta a um desafio com o frio em camundongos C57BL/6. As investigações *in vivo* e *in vitro* sugeriram que a curcumina aumentou a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1, do inglês *uncoupling protein 1*), que é uma proteína principalmente expressa no TAM e atua na termogênese, regulação do gasto energético e proteção contra o estresse oxidativo, mecanismos associados tanto à patogênese do DM2 como à obesidade (Song et al., 2018).

Ao comparar a porcentagem das gorduras totais hepáticas, encontrou-se que os grupos de DH apresentaram mais gordura em relação ao grupo DP e a adição de curcumina não impediu esse aumento. De forma contrária a esse achado, Maithilikarpagaselv et al. (2016) encontraram que níveis elevados de triacilglicerol no fígado de ratos alimentados com alto teor de frutose foram reduzidos com o tratamento com curcumina (200mg/kg de peso). A rápida lipogênese hepática é observada de maneira frequente em várias alterações metabólicas, como na resistência à insulina, síndrome metabólica e DM2 (Denechaud et al., 2008). Outro mecanismo pelo qual o consumo de DH leva à obesidade e diabetes é o aumento da lipogênese. A proteína de ligação ao elemento responsiva a carboidratos (ChREBP, do inglês *carbohydrate sensitive response element binding protein*) e a proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol (SREBP-1c, do inglês *sterol regulatory element-binding protein 1c*) são dois fatores chave de transcrição para genes que codificam enzimas lipogênicas (Uyeda; Repa, 2006; Postic et al., 2007).

Apesar de um estudo realizado em 2011 ter mostrado que a curcumina inibe a síntese de ácidos graxos nos adipócitos, muito pouco se sabe sobre o efeito dessa substância na lipogênese hepática (Zhao et al., 2011). Trabalho realizado por Shao et al. (2012) encontrou que a curcumina diminuiu o peso do fígado e o conteúdo lipídico intra-hepático e também demonstrou suprimir a expressão de SREBP-1c e ChREBP.

Em relação ao GTT, os dados mostraram que o grupo DP foi o que apresentou menores valores de glicemia ao longo do experimento, porém só foi possível observar diferença entre esse grupo e o grupo DH no tempo 30', uma vez que o grupo DH apresentou uma redução significativa de tolerância à glicose, concordando com o achado de Zhao et al. (2018) e comprovando a eficácia da dieta. O tratamento com curcumina não reduziu os níveis de glicose no sangue e, concordando com esses achados, Lee et al. (2020) encontraram que a DH prejudicou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina e a administração de curcumina (100 mg/kg de peso) por 13 semanas não afetou a tolerância à glicose. De forma geral, é possível notar que os grupos de DH tiveram maiores áreas sob a curva e a suplementação de curcumina não alterou esse aumento. Estes resultados sugerem que o tratamento com curcumina não foi eficaz no aumento da tolerância à glicose.

De forma controversa a esse achado, Zhao et al. (2018) encontraram que o tratamento com curcumina em ratos reduziu de forma significativa os níveis de glicose no sangue em 30 e 120 minutos quando comparado ao grupo DH. A AUC também evidenciou que as concentrações de glicose foram menores nos grupos suplementados com curcumina na dose 200mg/kg de peso quando comparado ao grupo DH. A dose de glicose administrada pelos mesmos autores foi de 2mg/g de peso do animal, enquanto no presente trabalho, de acordo com doses já estabelecidas na literatura, administrou-se 1mg/g de peso do animal, o que poderia possivelmente explicar essa diferença de resultados.

Ao observar os resultados da análise histológica, notou-se que a dieta hiperlipídica não foi capaz de induzir alterações histológicas em nenhum dos órgãos analisados e dessa forma, não houve o que a suplementação de curcumina prevenir.

De forma oposta, Feng et al. (2019) verificaram que no fígado de camundongos alimentados com DH houve um aumento notável de deposição lipídica em comparação aos animais do grupo controle e que a suplementação com

curcumina diminuiu de forma significativa esse acúmulo de gordura. Uma possível explicação para esse resultado pode ser devido ao tempo maior de tratamento, pois a duração do presente estudo foi de 12 semanas, enquanto o estudo de Feng et al. (2019) foi de 16 semanas. A porcentagem de lipídios na dieta acredita-se não ter sido o motivo da diferença, pois no presente estudo a dieta continha 60% de lipídios, enquanto no estudo de Feng et al. (2019) foi de apenas 41%.

Em relação ao pâncreas e o intestino, não foi possível encontrar estudos na literatura que discutissem a relação entre curcumina, DH e análise histológica desses órgãos. Dados de um estudo realizado por Silva et al. (2020) mostraram que a suplementação de cúrcuma (8mg/dia) resultou em uma esteatose macro e microgoticular difusa no pâncreas dos animais dos grupos de dieta controle e hiperlipídica. Já no presente estudo, a suplementação de curcumina não promoveu alteração nesse órgão.

A respeito do perfil lipídico, da glicemia e insulina, a suplementação de curcumina não promoveu melhorias nesses parâmetros quando comparada a dieta hiperlipídica somente. Ao encontro desses resultados, Maithilikarpagaselvi et al. (2016) encontraram que a suplementação de curcumina em uma dieta rica em frutose, não promoveu alterações no CT. Mas, por outro lado, de forma discordante dos dados encontrados no presente estudo, os mesmos autores encontraram melhoras nos níveis de TG e HDL.

A curcumina aparenta promover melhoras no perfil lipídico por meio de diversas vias moleculares. A diminuição nos níveis de colesterol, por exemplo, pode ser explicada pela ação na redução da absorção intestinal de colesterol e ácidos graxos na dieta hiperlipídica mediante a supressão da expressão das proteínas NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) no intestino e nos hepatócitos e pelo aumento da atividade da enzima colesterol -7 alfa-hidrolase, elevando a excreção fecal de colesterol e ácidos biliares (Feng; Ohlsson; Duan, 2010).

Zhao et al. (2018) também obtiveram resultados diferentes, uma vez que a suplementação de curcumina diminuiu significativamente as concentrações de TG e LDL quando comparados ao grupo DH. E, de forma concordante ao presente estudo, não encontraram diferenças para o HDL.

É sabido que a RI tem sido associada ao excesso de tecido adiposo, pois há um aumento de várias adipocitocinas, como exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-6, resistina, proteína estimuladora de acilação e leptina (Yamauchi et al., 2001). Um enorme número de

evidências clínicas e experimentais propõe que a curcumina pode atuar como forma de tratamento alternativo para prevenir e tratar as desordens do DM2. Estudos utilizando modelos de RI e diabetes em ratos e camundongos, evidenciaram que a curcumina aumenta a sensibilidade à insulina, e dessa forma, melhora a sinalização da mesma (Murugan; Pari; Rao, 2008; Panzhinskiy et al., 2014; Song et al., 2015).

Mecanismos propostos indicam que a curcumina atua através de diferentes maneiras, incluindo a regulação da sinalização da insulina através da ativação de uma gama de moléculas, como os receptores hormonais, fatores de transcrição, fatores de crescimento, citocinas e adipocinas, as quais trabalham de forma sinérgica para sustentar a homeostase da glicose (Jimenez-Osorio; Monroy; Alavez, 2016).

De forma semelhante aos resultados do presente estudo, Kobori et al. (2018) também não encontraram efeitos da suplementação de curcumina nos níveis de CT, TG e insulina. Já para a glicemia, de forma não concordante, notaram efeito benéfico da suplementação de curcumina em reduzir esses níveis. No presente trabalho, apesar de sem diferença estatística, houve uma redução no grupo DHC500 (~11%) quando comparado ao grupo DH.

Alguns mecanismos moleculares poderiam explicar esses resultados benéficos que foram encontrados nos estudos citados, mas não no presente estudo. A RI é a doença básica subjacente no DM2 e na síndrome metabólica.

Neerati, Devde e Gangi (2014) evidenciaram que a curcumina poderia suprimir a RI por meio da ligação da curcumina com PPAR- $\gamma$  como agonista, e assim a curcumina pode ter uma função de prevenção na RI induzida pela dieta (Jayakumar; Ahmed; Ebenezar, 2016).

Além disso, diversos estudos evidenciaram que a curcumina eleva a expressão do receptor do LDL, além de aumentar também a atividade de captação dos receptores de LDL (Dou et al., 2008; Kim; Kim, 2010; Tai et al., 2014) promovendo assim um aumento na depuração dos níveis de colesterol corporal. Como ela interage com vários alvos, incluindo o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR- $\alpha$ , do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), PPAR $\gamma$ , proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP, do inglês *cholesteryl ester transfer protein*) e lipoproteína lipase, a curcumina provavelmente pode exercer um papel na redução dos níveis de triglicerídeos (Sahebkar, 2014a; Sahebkar, 2014b, Sahebkar, 2014c). Além disso, acredita-se que a curcumina esteja

relacionada a efeitos sensibilizadores à insulina e a melhorias nas adipocinas e efeitos anti-inflamatórios. Ademais, é esperado que a curcumina afete tanto a síntese quanto o catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (Sahebkar, 2014a; Sahebkar, 2014b, Sahebkar, 2014c). Assim, a suplementação dessa substância pode acarretar em diminuição das concentrações plasmáticas de triglicerídeos e colesterol, mitigando as expressões dos genes lipogênicos (Sahebkar, 2014b, Sahebkar, 2014c; Sahebkar; Chew; Watts, 2014).

Outro possível mecanismo de modulação do efeito anti-lipídico e os principais componentes bioativos responsáveis principalmente pelo potencial efeito, incluem a inibição seletiva da 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 ou cortisona redutase (11 $\beta$ -HSD1, do inglês *11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*) (Hu et al., 2013), diminuição da absorção do colesterol e aumento da atividade de colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilase (Kim; Kim, 2010).

Ainda que os estudos citados relatem um efeito hipolipídico e hipoglicemiante da curcumina, os resultados encontrados no presente trabalho foram inconsistentes com os achados da literatura.

Quanto ao índice aterogênico, opostamente ao presente estudo, Maithilikarpagaselvi et al. (2016) encontraram que dieta rica em frutose aumentou esse índice em comparação ao grupo controle e a suplementação de curcumina suprimiu esse aumento. Ainda de forma discordante, dieta hiperlipídica com curcumina também reduziu significativamente o índice aterogênico em 48% em comparação com a dieta hiperlipídica sozinha (Kim; Kim, 2010).

Com relação a expressão proteica, notou-se um aumento significativo na produção de IL-10 no tecido adiposo epididimal dos grupos DHC250 e DHC500 em comparação ao grupo DH. De forma conexa a esse achado, encontrou-se uma redução na glicemia no grupo DHC500 quando comparado ao grupo DH e um aumento nos níveis de insulina no grupo DHC250 quando comparado também ao grupo DH, sugerindo então uma possível melhora nos parâmetros inflamatórios e metabólicos nos animais desses grupos suplementados (250 e 500mg/kg) após o tratamento.

Já é bem estabelecido que a IL-10 é caracterizada como uma citocina anti-inflamatória, inibindo a inflamação por meio da redução de por exemplo o TNF- $\alpha$ , interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6 entre outros (Locati; Mantovani; Sica, 2013). Paralelo a isso, a curcumina pode induzir a expressão e produção de IL-10 intensificando sua

ação em vários tecidos (Kant et al., 2014; Abd Allah; Gomaa, 2015; Singh et al., 2015).

A respeito dos marcadores pró e anti-inflamatórios ao nível de expressão gênica, observou-se que a expressão do TNF- $\alpha$  no fígado e no tecido adiposo retroperitoneal dos animais do grupo DH estava significativamente aumentada em 12 vezes quando comparado ao grupo DP. De forma benéfica, notou-se que nas 3 doses (DHC50, DHC250 e DHC500) houve redução da expressão quando comparadas ao grupo DH. Esses resultados são apoiados pelos de Kelany, Hakami e Omar (2017), uma vez que observaram que uma dieta rica em frutose por 8 semanas foi capaz de aumentar os níveis séricos de TNF- $\alpha$  e suplementação de curcumina (200mg/kg de peso) promoveu diminuição desse nível (Kelany; Hakami; Omar, 2017). Também de forma semelhante, Maithilikarpagaselvi et al. (2016) encontraram que a dieta hiperlipídica por 10 semanas aumentou níveis de marcadores inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  e a suplementação de curcumina (200mg/kg de peso) promoveu redução nesses níveis (Maithilikarpagaselvi et al., 2016). Outro estudo realizado em 2011, similarmente encontrou que uma dieta rica em gordura promoveu aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e a suplementação de curcumina (80mg/kg de peso) suprimiu esse aumento (El-Moselhy et al., 2011).

Tem sido investigado de forma ampla, como a curcumina regula negativamente a expressão de TNF- $\alpha$  em diferentes tipos de células e em resposta a uma variedade de estímulos. O mecanismo pelo qual a curcumina promove esses efeitos anti-inflamatórios em animais é que essa substância pode suprimir a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$ , atenuar a secreção de MCP-1 e a permeação de macrófagos no tecido adiposo, inibindo assim a secreção de citocinas pró inflamatórias (Chan,1995; Singh; Aggarwal, 1995). A partir dessas descobertas, diversos mecanismos pelos quais a curcumina pode exercer atividade anti-inflamatória têm sido propostos. Estudos sugerem que a administração oral de curcumina regula a expressão de TNF- $\alpha$  tanto no soro quanto no tecido dos animais (Ung et al., 2010; El-Moselhy et al., 2011; Gutierrez et al., 2012). A redução dos níveis de TNF- $\alpha$  promovida pela curcumina também foi observada em camundongos (Leyon; Kuttan, 2003). Na grande maioria desses estudos, as doses de curcumina utilizadas foram de 50 a 500 mg/kg/dia. Alguns estudos também constataram que a endotoxina induz o choque séptico em animais, em parte, por meio da produção de

TNF- $\alpha$ , e a curcumina foi capaz de reverter essa condição (Chen et al., 2008; Huang et al., 2008; Nishida et al., 2010).

A suplementação de curcumina nas 2 doses (50mg e 250mg/) foi capaz de promover aumento da expressão gênica de IL-10 no fígado quando comparadas ao grupo DH. Estudos realizados por Yue et al. (2019) e Zhao et al. (2017) também encontraram efeito benéfico da curcumina em aumentar a expressão de IL-10.

Ainda a respeito de inflamação, os macrófagos são amplamente classificados em dois fenótipos de polarização, M1 (que secreta principalmente fatores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ ) e M2 (que secreta principalmente fatores anti-inflamatórios, como MRC-1 e IL-10). Verificou-se, nos últimos anos, que os macrófagos desempenham um papel importante na inflamação crônica do tecido adiposo obeso (Ide et al., 2011; Glass; Olefsky, 2012).

Evidências também mostram que, no tecido adiposo, a diminuição de M2 está relacionada à obesidade e distúrbios metabólicos associados à inflamação. Vários estudos revelaram que os macrófagos M2 foram associados a menor inflamação do tecido adiposo e distúrbios metabólicos associados à obesidade no tecido adiposo humano e de camundongos (Aron-Wisnewsky et al., 2009; Fujisaka et al., 2009).

Apesar da suplementação não ter exercido um efeito positivo no marcador de macrófago M1 (TLR-4), quando analisada a expressão gênica de MRC-1 (marcador de macrófago M2) no tecido adiposo, os resultados demonstraram que o aumento da expressão proteica dose-dependente de IL-10 foi associado à elevada expressão gênica de MRC-1. Além disso, de maneira concordante com Islam et al. (2021), uma redução na expressão do gene Arg-1 (marcador de macrófagos M2) foi observada pela suplementação, o que é debatido na literatura, uma vez que macrófagos M1 também podem expressar Arg-1 (Murray, 2017).

A respeito da MI, sabe-se que essa está diretamente associada com padrões alimentares, além de estar ligada a múltiplas funções fisiológicas do hospedeiro, como imunomodulação e nutrição e metabolismo, desempenhando assim, crucial função na manutenção da saúde (Machado; Moreira; Rosa, 2015).

Já em relação a influência da MI na nutrição e no metabolismo, considera-se que as bactérias intestinais são os fundamentais reguladores da digestão ao longo do trato gastrointestinal; as bactérias comensais exercem função importante na extração, síntese e absorção de muitos nutrientes e metabólitos, incluindo ácidos biliares, lipídios, aminoácidos, vitaminas e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A

MI tem uma atribuição imune importante contra a colonização de bactérias patogênicas, vetando seu crescimento, consumindo os nutrientes disponíveis e/ou produzindo bacteriocinas e também previne a invasão de bactérias, por meio da manutenção da integridade do epitélio intestinal (Khosravi; Mazmanian, 2013).

Nos últimos 9 anos, houve um aumento nos estudos mostrando que as alterações na composição da MI estão relacionadas a uma vasta gama de doenças, incluindo doenças relacionadas ao fígado, obesidade, diabetes, câncer, inflamação intestinal, entre outras (Harris et al., 2012; Cammarota et al., 2015; Doulberis et al., 2017; Shen; Liu; Ji, 2017). Desse modo, a MI tem sido bastante considerada como um alvo terapêutico promissor para essas doenças associadas (Brunkwall; Orholm; Melander, 2017; Wiest et al., 2017; Woodhouse et al., 2018).

Dentre os microorganismos que compõem a microbiota intestinal, a grande maioria são bactérias, sendo os filos com maior abundância: *Firmicutes* (compreende os gêneros gram-positivos *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, entre outros), *Bacteroidetes* (compreende os gêneros gram-negativos *Bacteroides*, *Prevotella*, entre outros), *Actinobacteria* (compreende o gênero gram-positivo *Bifidobacterium*) e *Proteobacteria* (compreende o gênero *Enterobacteriaceae* com *Escherichia coli* como o representante mais predominante), os quais foram escolhidos para esse trabalho devido sua representatividade na MI, pois correspondem a mais de 90% de toda a comunidade bacteriana (Robles-Alonso; Guarner, 2013). Vale ressaltar que, embora esses filos estejam presentes na MI de todos os indivíduos, há uma variação inter e intrapessoal na abundância de cada um deles. Assim, os fatores que influenciam fortemente a composição bacteriana e conseqüentemente as funções da MI humana são diversos, como por exemplo a genética do hospedeiro, o estado nutricional, o tipo de dieta, a prática de exercício físico e a ingestão de determinados nutrientes (Cho; Blaser, 2012).

Simultaneamente a isso, como já mencionado, o intestino é envolvido no metabolismo da curcumina, sugerindo esse órgão um dos principais alvos dessa substância, com potenciais efeitos reguladores (Jurenka, 2009; Prasad; Tyagi; Aggarwal, 2014). Após a administração oral, a curcumina se acumula principalmente no trato gastrointestinal em grandes quantidades, onde, após digestão microbiana, pode se transformar em metabolitos biologicamente ativos (Manach et al., 2005; Williamson; Clifford, 2017; Di Meo et al., 2019). Assim, é coerente inferir que a

curcumina pode exercer efeitos reguladores diretos na MI. Isso pode ser um mecanismo importante subjacente aos seus benefícios terapêuticos (Shen; Ji, 2016) e poderia explicar o paradoxo entre a baixa biodisponibilidade sistêmica da curcumina e suas atividades farmacológicas amplamente divulgadas.

A curcumina no intestino favorece o crescimento de cepas de bactérias benéficas, como *Bifidobacteria* e *Lactobacilli*, com redução de cepas patogênicas (McFadden et al., 2015; Shen; Liu; Ji, 2017). Além disso, descobriu-se que o tratamento com curcumina diminui a riqueza e a diversidade microbiana, com uma redução específica de espécies como *Prevotellaceae* e *Bacteroidaceae*, frequentemente associadas ao aparecimento de doenças sistêmicas (Shen; Liu; Ji, 2017).

Dessa forma, neste estudo analisou-se a influência da dieta hiperlipídica, bem como o efeito da suplementação de curcumina na modulação da MI.

Com relação ao filo *Firmicutes*, nem a dieta e nem a curcumina promoveram modificações na abundância relativa. Apesar de não ter sido encontrada diferença nesse filo, notou-se que a abundância desse filo estava aumentada nas 3 doses em comparação a DH e o efeito parece ter sido dose-dependente. Dentro desse filo, há tanto gêneros com atividade imunomodulatória benéfica, mas também gêneros relacionados a indução da inflamação. A classe *Clostridia*, a ordem *Clostridiales* e as famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* são as mais abundantes. A classe *Clostridia* abrange os *clusters* IV e XIVA, compostos principalmente, por bactérias benéficas capazes de produzir butirato (AGCC), tais como, *Faecalibacterium*, *Eubacterium* e *Roseburia* (Hold et al., 2003; Eckburg et al., 2005). Elevar o número de bactérias gram-positivas que produzem butirato, como Firmicutes, pode ser uma estratégia na regulação das diversas cascatas de sinalização associadas com metabolismo de lipídios e glicose (Tilg; Moschen, 2014). De forma concordante, um estudo realizado recente encontrou que a curcumina não teve impacto significativo na abundância relativa de Firmicutes (Islam et al., 2021).

Já para o filo *Bacteroidetes*, de modo geral, a DH aumentou a abundância e todos os tratamentos reduziram, com exceção da dose de 500mg que aumentou muito. Similarmente, Han et al. (2021) encontraram que o tratamento com curcumina diminuiu significativamente a abundância relativa de *Bacteroidetes*. *Bacteroidetes* são o maior filo de bactérias gram-negativas que habitam o trato gastrointestinal e têm sido atribuídos papéis específicos a alguns gêneros desse filo no

desenvolvimento de desregulação imunológica, doenças sistêmicas como a síndrome metabólica e também distúrbios neurológicos (Gibiino et al., 2018), além de exercem potencial mais patogênico e inflamatório (Pérez et al., 2019).

Para o filo *Actinobacteria*, esse foi menos expresso na dose de 50mg e mais expresso nas doses de 250 e 500mg quando comparados ao grupo DH. Esse filo é composto de espécies de *Bifidobacterium*, bactéria que, assim como o *Lactobacillus*, vem sendo utilizada como probiótica devido aos seus benefícios a saúde do hospedeiro desde o nascimento até a fase idosa (Rivière et al., 2016). Da mesma forma, um estudo realizado por Feng et al. (2017) encontrou que a actinobacteria aumentou de forma acentuada no grupo suplementado com curcumina.

No filo *Proteobacteria*, notou-se que a DH foi capaz que aumentar a quantidade desse filo e a dose de 50mg foi eficaz em reduzir quando comparado ao DH. Já as doses de 250 e 500mg tiveram efeito contrário. Esse filo é composto de enterobactérias, como por exemplo, *Escherichia coli* e *Bilophila wadsworthia*, conhecidas por serem bactérias patogênicas, com maior potencial de indução a processo inflamatório (Marchesi et al., 2016; Pérez et al., 2019). Outros estudos (Rizzatti et al., 2017; Bai; Ru; Bruner, 2018) confirmaram o papel de Proteobacteria na obesidade, produzindo moléculas pró-inflamatórias, como lipopolissacarídeos, ajudando a coletar energia e aumentar o armazenamento de gordura do hospedeiro (Rizzatti et al., 2017).

Ao nível de gênero, efeito benéfico da curcumina em aumentar a abundância de bactérias produtoras de butirato (*Clostridium cluster XIVa e IV*) foi observado. As espécies de *Clostridium XIVa e IV* produzem AGCC, especialmente o butirato (que pode desempenhar papel primordial na melhoria da disfunção da barreira intestinal), e desempenham um papel indispensável na homeostase intestinal, além de apresentarem um grande potencial como probióticos (Nagano; Itoh; Honda, 2012; Elamin et al., 2013). Estudo realizado por Han et al. (2021) observou também que similarmente, curcumina também aumentou a abundância relativa de *Clostridium cluster XIVa*.

Observou-se também efeito da curcumina em reduzir a abundância de *Bacteroides*, um gênero relativamente complexo e que engloba diversas espécies e que, apesar do seu potencial papel na promoção da saúde do hospedeiro, seus efeitos adversos não devem ser ignorados (Ley et al., 2008). Como por exemplo, o polissacarídeo capsular A (PSA) de *B. fragilis*, que também possui propriedades

indutoras de abscesso (Surana; Kasper, 2012). Há relatos também da capacidade de metabolização de polissacarídeos de *B. thetaiotaomicron* em facilitar o crescimento da bactéria patogênica *C. difficile*, em aumentar a expressão do gene de virulência em *E. coli*, e em exacerbar infecção por *C. rodentium* (Curtis et al., 2014).

Um outro estudo realizado por Sreng et al. (2019), mas de forma menos semelhante ao presente estudo, objetivou investigar o efeito do resveratrol e da curcumina de forma isolada ou em associação no controle da glicemia e na microbiota intestinal. Os autores encontraram que os dois polifenóis em conjunto afetam a ecologia microbiota intestinal de animais alimentados com DH. De forma similar aos achados do presente estudo, também encontraram que comparado a dieta controle, os animais do grupo DH tiveram um aumento na abundância de proteobacteria.

Estudos prévios têm demonstrado que a curcumina exerce efeitos benéficos em modelos animais, com diversas atividades farmacológicas e potencial terapêutico contra muitas doenças (Panzhinskiy et al., 2019; Ghosh et al., 2020; Jafari Khataylou et al., 2020), mas seu efeito sobre a MI ainda não foi totalmente investigado.

Algumas discrepâncias encontradas nos resultados, podem ser atribuídas a diferenças de literatura a respeito das condições experimentais, como diferentes períodos de seguimento (variando de 4 dias a 16 semanas) (Neyrinck et al., 2013; Maithilikarpagaselvi et al., 2016; Zhao et al., 2018; Kim et al., 2019) e diferentes doses (variando de 40mg/kg de peso a 1,4g/kg de peso) (Neyrinck et al., 2013; Ding et al., 2016), as quais devem ser consideradas como limitações mesmo com estatística adequada para tentar homogeneizar os resultados. Outro fator que requer mais estudos aprofundados é o que se associa à biodisponibilidade, pois, apesar da curcumina ter múltiplos benefícios medicinais, a sua baixa disponibilidade oral continua sendo uma dificuldade no desenvolvimento de formulações para eficácia clínica.

Por outro lado, acreditamos que esses não sejam os principais motivos dessas discordâncias, pois alguns trabalhos encontraram resultados benéficos em tempo menor de tratamento, outros em maior tempo, alguns com doses maiores, e outros menores, como o caso do presente trabalho no que diz respeito à dose de 50 mg/kg de peso.

Apesar da heterogeneidade dos dados da literatura, o presente estudo apresentou benefícios em bloquear a inflamação por meio da inibição da expressão

gênica de TNF- $\alpha$  no fígado e no tecido adiposo retroperitoneal, aumentar a expressão proteica de IL-10 no tecido adiposo e gênica no fígado, além de promover um aumento na expressão gênica do marcador de macrófago M2 (MRC-1) e melhorar o perfil da microbiota intestinal, especialmente na dose de 50 mg/kg de peso em 12 semanas de intervenção.

## 8 CONCLUSÃO

Embora a suplementação de curcumina não exerça alterações relacionadas à prevenção do ganho de peso em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura, independentemente da dose administrada, observamos efeitos benéficos na resposta inflamatória, evidenciada pela redução da expressão gênica de TNF- $\alpha$  no fígado e tecido adiposo retroperitoneal e aumento da expressão proteica de IL-10 no tecido adiposo e gênica no fígado, além de promover um aumento na expressão gênica do marcador de macrófago M2 (MRC-1). Melhora no perfil da microbiota intestinal também foi observada, preferencialmente quando a curcumina foi administrada na dose de 50 mg/kg de peso.

Com base nesses achados, propomos que são necessários estudos de acompanhamento com doses mais baixas (50 mg/kg até 250 mg/kg) para elucidar sobre uma possível dose-resposta relacionada a melhora dos parâmetros metabólicos e inflamatórios.

Além disso, o presente estudo pode fornecer novos *insights* sobre como a curcumina pode melhorar as complicações associadas à obesidade e consequente inflamação.

**REFERÊNCIAS<sup>3</sup>**

Abd Allah ES, Gomaa AM. Effects of curcumin and captopril on the functions of kidney and nerve in streptozotocin-induced diabetic rats: role of angiotensin converting enzyme 1. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015;40(10):1061-7.

Adiwidjaja J, McLachlan AJ, Boddy AV. Curcumin as a clinically-promising anti-cancer agent: pharmacokinetics and drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13(9):953-972.

Alappat L, Awad AB. Curcumin and obesity: evidence and mechanisms. *Nutr Rev*. 2010;68(12):729-38.

Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A, et al. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4619-23.

Arslan N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(44):16452.

Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, et al. Role of antioxidants and natural products in Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:1–15.

Aziz MT, El Ibrashy IN, Mikhailidis DP, Rezaq AM, Wassef MA, Fouad HH, et al. Signaling mechanisms of a water soluble curcumin derivative in experimental type 1 diabetes with cardiomyopathy. *Diabetol Metab Syndr*. 2013;5-13.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(44):15718-23.

Bai J, Hu Y, Bruner DW. Composition of gut microbiota and its association with body mass index and lifestyle factors in a cohort of 7-18 years old children from the American Gut Project. *Pediatr Obes*. 2019;14(4):e12480.

Baliga MS, Joseph N, Venkataranganna MV, Saxena A, Ponemone V, Fayad R. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: Preclinical and clinical observations. *Food Funct*. 2012;3(11):1109-17.

---

<sup>3</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule From a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules*. 2011;16(6):4567-98.

Blaser MJ. The microbiome revolution. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4162-5.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-7.

Bouter KE, van Raalte DH, Groen AK, Nieuwdorp M. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Gastroenterology*. 2017;152(7):1671-1678.

Bray GA, Heisel WE, Afshin A, Jensen MD, Dietz WH, Long M, et al. The science of obesity management: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev*. 2018;39(2):79-132.

Brunkwall L, Orho-Melander M. The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: from current human evidence to future possibilities. *Diabetologia*. 2017;60(6):943-951.

Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology*. 2011;53:810-20.

Bukina Y, Thyhonovska M, Koval M, Marushchak M, Krynytska I, Kamyshnyi A. The effect of immunoregulatory bacteria on the transcriptional activity of Foxp3 and ROR $\gamma$ t genes in the gut-associated lymphoid tissue with Salmonella-induced inflammation in the presence of vancomycin and *Bacteroides fragilis*. *Iran J Microbiol*. 2020;12(3):231-241.

Bulló M, Casas-Agustench P, Amigó-Correig P, Aranceta J, Salas-Salvadó J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutr*. 2007;10(10A):1164-72.

Camatari FO. Determinação de curcuminoides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de extratos de curcuma longa e constituintes isolados. 2017. 147 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2017.

Cammarota G, Ianiro G, Cianci R, Bibbò S, Gasbarrini A, Currò D. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: potential for therapy. *Pharmacol Ther*. 2015;149:191-212.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(6):729-34.

Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(6):729-34.

Cani PD, Dewever C, Delzenne NM. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br J Nutr*. 2004;92(3):521-6.

Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM, Burcelin R. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*. 2006;55:1484-1490.

Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-drive improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58(8):1091-103.

Carlos D, Pérez MM, Leite JA, Rocha FA, Martins LMS, Pereira CA, et al. NOD2 Deficiency Promotes Intestinal CD4+ T Lymphocyte Imbalance, Metainflammation, and Aggravates Type 2 Diabetes in Murine Model. *Front Immunol*. 2020;11:1265.

Carneiro NK. Modulação da resposta imune contra *Paracoccidioides brasiliensis* pelas vias canônica e não canônica do inflamassoma: participação da IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-1 $\alpha$  no controle da infecção. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. São Paulo, 190p. 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17147/tde-08062017-093404/publico/NATALIAKETELUTCARNEIRO.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2020.

Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol*. 1995;49(11):1551-6.

Chen D, Nie M, Fan MW, Bian Z. Anti-inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmacology*. 2008;82(4):264-9.

Chen L, Nyomba BL. Glucose Intolerance and Resistin Expression in Rat Offspring Exposed to Ethanol in Utero: Modulation by Postnatal High-Fat Diet. *Endocrinology*. 2003;144(2):500-8.

Cho I, Blaser MJ. The Human Microbiome: At the Interface of Health and Disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):260-70.

Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher FM, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(3):740-7.

Curtis MM, Hu Z, Klimko C, Narayanan S, Deberardinis R, Sperandio V. The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. *Cell Host Microbe.* 2014;16(6):759-69.

da Silva TA, Zorzetto-Fernandes ALV, Cecílio NT, Sardinha-Silva A, Fernandes FF, Roque-Barreira MC. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Sci Rep.* 2017;7(1):7083.

Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.* 2008;582(1):68-73.

Deogade S, Ghate S. Curcumin: Therapeutic applications in systemic and oral health. *Int. J. Biol. Pharm.* 2015;6(4):281–290.

de Souza, DMS. Papel imunoregulador das dietas ricas em ácidos graxos em tecidos adiposo e cardíaco de camundongos infetados *pelo trypanosoma cruzi*. 2019. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.

Devassy JG, Nwachukwu ID, Jones PJ. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutr Rev.* 2015;73(3):155-65.

DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut Microbiota and Its Possible Relationship With Obesity. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(4):460-9.

Di Meo F, Margarucci S, Galderisi U, Crispi S, Peluso G. Curcumin, Gut Microbiota, and Neuroprotection. *Nutrients.* 2019;11(10):2426.

Ding L, Li J, Song B, Xiao X, Zhang B, Qi M, et al. Curcumin rescues high fat diet-induced obesity and insulin sensitivity in mice through regulating SREBP pathway *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;304:99-109.

Dou XB, Fan CL, Wo L, Yan J, Qian Y, Wo XD. Curcumin up-regulates LDL receptor expression via the sterol regulatory element pathway in HepG2 cells. *Planta Med.* 2008;74: 1374-9.

- Doulberis M, Kotronis G, Gialamprinou D, Kountouras J, Katsinelos P. Non-alcoholic fatty liver disease: An update with special focus on the role of gut microbiota. *Metabolism*. 2017;71:182-197.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8.
- Ejaz A, Wu D, Kwan P, Meydani M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J Nutr*. 2009;139(5):919-25.
- El-Moselhy MA, Taye A, Sharkawi SS, El-Sisi SF, Ahmed AF. The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF- $\alpha$  and free fatty acids. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(5):1129-40.
- Elamin EE, Masclee AA, Dekker J, Pieters HJ, Jonkers DM. Short-chain fatty acids activate AMP-activated protein kinase and ameliorate ethanol-induced intestinal barrier dysfunction in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*. 2013;143(12):1872-81.
- Eshaghian A, Khodarahmi A, Safari F, Binesh F, Moradi A. Curcumin attenuates hepatic fibrosis and insulin resistance induced by bile duct ligation in rats. *Br J Nutr*. 2018;120(4):393-403.
- Everard A, Geurts L, Caesar R, Van Hul M, Matamoros S, Duparc T, et al. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. *Nat Commun*. 2014;5:5648.
- Fassini PG, Noda RW, Ferreira ES, Silva MA, Neves VA, Demonte A. Soybean Glycinin Improves HDL-C and Suppresses the Effects of Rosuvastatin on Hypercholesterolemic Rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10:165.
- Feng D, Ohlsson L, Duan R-D. Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids in Health and Disease*. 2010;9(1):40.
- Feng D, Zou J, Su D, Mai H, Zhang S, Li P, Zheng X. Curcumin prevents high-fat diet-induced hepatic steatosis in ApoE  $-/-$  mice by improving intestinal barrier function and reducing endotoxin and liver TLR4/NF- $\kappa$ B inflammation. *Nutr Metab*. 2019;16:79.
- Feng W, Wang H, Zhang P, Gao C, Tao J, Ge Z, et al. Modulation of gut microbiota contributes to curcumin-mediated attenuation of hepatic steatosis in rats. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2017;1861(7):1801-1812.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12:3117–32.

Filho C, Bernardes A, Souza RJ, Braz LT, Tavares M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Cienc. Rural*. 2000;30(1):171-177.

Fonseca MM, Davoli-Ferreira M, Santa-Cecília F, Guimarães RM, Oliveira FFB, Kusuda R, et al. IL-27 Counteracts Neuropathic Pain Development Through Induction of IL-10. *Front Immunol*. 2020;10:3059.

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.

Gangarapu V, Yıldız K, Ince AT, Baysal B. Role of gut microbiota: obesity and NAFLD. *Turk J Gastroenterol*. 2014;25(2):133-40.

Garcea G, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer*. 2004;90(5):1011-5.

Genth-Zotz S, von Haehling S, Bolger AP, Kalra PR, Wensel R, Coats AJ, et al. Pathophysiologic quantities of endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha release in whole blood from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2002;90(11):1226-30.

Gérard P. Gut microbiota and obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73:147–162.

Ghorbani Z, Hekmatdoost A, Mirmiran P. Anti-hyperglycemic and Insulin Sensitizer Effects of Turmeric and Its Principle Constituent Curcumin. *Int J Endocrinol Metab*. 2014;12(4):e18081.

Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol* 2015;83:111–24.

Ghosh SS, Bie J, Wang J, Ghosh S. Oral supplementation with non-absorbable antibiotics or curcumin attenuates western diet-induced atherosclerosis and glucose intolerance in LDLR<sup>-/-</sup> mice--role of intestinal permeability and macrophage activation. *PLoS One*. 2014;9(9):e108577.

Ghosh SS, Wang J, Yannie PJ, Sandhu YK, Korzun WJ, Ghosh S. Dietary Supplementation with Galactooligosaccharides Attenuates High-Fat, High-Cholesterol Diet-Induced Glucose Intolerance and Disruption of Colonic Mucin Layer in C57BL/6 Mice and Reduces Atherosclerosis in Ldlr<sup>-/-</sup> Mice. *J Nutr*. 2020;150(2):285-293.

Gibiino G, Lopetuso LR, Scaldaferri F, Rizzatti G, Binda C, Gasbarrini A. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Dig Liver Dis*. 2018;50(7):635-639.

Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(8):491-502.

Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012;15(5):635-45.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE (GBD) 2015 Obesity Collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N Engl J Med*. 2017; 377:13–27.

Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(4):787-809.

Goossens GH. The metabolic phenotype in obesity: fat mass, body fat distribution, and adipose tissue function. *Obesity facts*. 2017;10(3): 207–215.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-64.

Gutierrez VO, Pinheiro CM, Assis RP, Vendramini RC, Pepato MT, Brunetti IL. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. *Br J Nutr*. 2012;108(3):440-8.

Hammami A, Abidin BM, Charpentier T, Fabié A, Duguay AP, Heinonen KM, et al. HIF-1 $\alpha$  Is a Key Regulator in Potentiating Suppressor Activity and Limiting the Microbicidal Capacity of MDSC-like Cells During Visceral Leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 2017;13(9):e1006616.

Han Z, Yao L, Zhong Y, Xiao Y, Gao J, Zheng Z, et al. Gut microbiota mediates the effects of curcumin on enhancing Ucp1-dependent thermogenesis and improving high-fat diet-induced obesity. *Food Funct*. 2021;12(14):6558-6575.

Harakeh SM, Khan I, Kumosani T, Barbour E, Almasaudi SB, Bahijri SM, et al. Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:95.

Harris K, Kassis A, Major G, Chou CJ. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes.* 2012;2012:879151.

He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation and chronic diseases: how are they linked? *Molecules.* 2015;20(5):9183-213.

Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. The Importance of Energy Balance. *Eur Endocrinol.* 2013;9(2):111-115.

Hold GL, Schwiertz A, Aminov RI, Blaut M, Flint HJ. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(7):4320-4.

Hu GX, Lin H, Lian QQ, Zhou SH, Guo J, Zhou HY, et al. Curcumin as a potent and selective inhibitor of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1: improving lipid profiles in high-fat-diet-treated rats. *PLoS One.* 2013;8(3):e49976.

Huang WT, Niu KC, Chang CK, Lin MT, Chang CP. Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE<sub>2</sub> in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. *Eur J Pharmacol.* 2008;593(1-3):105-11.

Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SG, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4423-7.

Ide J, Gagnon A, Molgat AS, Landry A, Foster C, Sorisky A. Macrophage-conditioned medium inhibits the activation of cyclin-dependent kinase 2 by adipogenic inducers in 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Physiol.* 2011;226(9):2297-306.

Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production. *Cancer Res.* 2001;61(3):1058-64.

Islam T, Koboziev I, Albracht-Schulte K, Mistretta B, Scoggin S, Yosofvand M, et al. Curcumin Reduces Adipose Tissue Inflammation and Alters Gut Microbiota in Diet-Induced Obese Male Mice. *Mol Nutr Food Res.* 2021;65(22):e2100274.

Jayakumar V, Ahmed SS, Ebenezer KK. Multivariate analysis and molecular interaction of curcumin with PPAR $\gamma$  in high fructose diet induced insulin resistance in rats. *Spring*. 2016;5:1732.

Jayaraj RL, Tamilselvam K, Manivasagam T, Elangovan N. Neuroprotective effect of CNB-001, a novel pyrazole derivative of curcumin on biochemical and apoptotic markers against rotenone-induced SK-N-SH cellular model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*. 2013;51:863-70.

Jimenez-Osorio AS, Monroy A, Alavez S. Curcumin and insulin resistance: Molecular targets and clinical evidences. *Biofactors*. 2016;42(6):561-80.

Jin T, Song Z, Weng J, Fantus IG. Curcumin and other dietary polyphenols: potential mechanisms of metabolic actions and therapy for diabetes and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2018;314(3):E201-E205.

Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. 2009;14(2):141-53.

Kalpana C, Rajasekharan KN, Menon VP. Modulatory effects of curcumin and curcumin analog on circulatory lipid profiles during nicotine-induced toxicity in Wistar rats. *J Med Food*. 2005;8: 246–250.

Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan SK, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Immunopharmacol*. 2014;20(2):322-30.

Kelany ME, Hakami TM, Omar AH. Curcumin improves the metabolic syndrome in high-fructose-diet-fed rats: role of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(2):140-150.

Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7(10):e47713.

Kim M, Kim Y. Hypocholesterolemic effects of curcumin via up-regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase in rats fed a high fat diet. *Nutr Res Pract*. 2010;4(3):191-5.

Kim Y, Rouse M, González-Mariscal I, Egan JM, O'Connell JF. Dietary curcumin enhances insulin clearance in diet-induced obese mice via regulation of hepatic

PI3K-AKT axis and IDE, and preservation of islet integrity. *Nutr Metab (Lond)*. 2019;16:48.

Khosravi A, Mazmanian SK. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. *Curr. Opin. Microbiol*. 2013;16:221–227.

Kobori M, Takahashi Y, Takeda H, Takahashi M, Izumi Y, Akimoto Y, et al. Dietary Intake of Curcumin Improves eIF2 Signaling and Reduces Lipid Levels in the White Adipose Tissue of Obese Mice. *Sci Rep*. 2018;8(1):9081.

Korecka A, Arulampalam V. The Gut Microbiome: Scourge, Sentinel or Spectator? *J Oral Microbiol*. 2012;4.

Krishnaswamy K. Traditional Indian spices and their health significance. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008;1:265-8.

Kumar A, Ahuja A, Ali J, Baboota S. Conundrum and therapeutic potential of curcumin in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2010;27(4):279-312.

Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *Br. J. Pharmacol*. 2017;174:1325–1348.

Kushner RF. Weight loss strategies for treatment of obesity. *Progress in cardiovascular diseases*. 2014;56(4):465-72.

Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4(71).

Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of Lipids in Human White Adipocyte. *Diabetes Metab*. 2004;30(4):294-309.

Layton A, McKay L, Williams D, Garrett V, Gentry R, Saylor G. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(6):4214-24.

Lee ES, Kwon MH, Kim HM, Woo HB, Ahn CM, Chung CH. Curcumin Analog CUR5-8 Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice With High-Fat Diet-Induced Obesity. *Metabolism*. 2020;103:154015.

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-5.

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008;320(5883):1647-51.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.

Leyon PV, Kuttan G. Studies on the role of some synthetic curcuminoid derivatives in the inhibition of tumour specific angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2003;22(1):77-83.

Little TJ, Feinle-Bisset C. Effects of dietary fat on appetite and energy intake in health and obesity--oral and gastrointestinal sensory contributions. *Physiol Behav*. 2011;104(4):613-20.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol*. 2013;120:163-84.

Lowell BB, Flier JS. Brown Adipose Tissue, Beta 3-adrenergic Receptors, and Obesity. *Annu Rev Med*. 1997;48:307-16.

Ludwig DS, Aronne LJ, Astrup A, de Cabo R, Cantley LC, Friedman MI, et al. The carbohydrate-insulin model: a physiological perspective on the obesity pandemic. *Am J Clin Nutr*. 2021;114(6):1873-85.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.

Machado ABF, Moreira APB, Rosa DD. Microbiota gastrintestinal - evidências da sua influência na saúde e na doença. 1.ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2015.

Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, Sripradha R. Preventive effect of curcumin on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in high-fat fed obese rats. *J Complement Integr Med*. 2016;13(2):137-43.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1 Suppl):230S-242S.

Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*. 2016;65(2):330-9.

Mata AR, Nelson DL, Afonso RJCF, Glória MBA, Junqueira RG. Identification volatile compounds of turmeric using solid phase microextraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Sci Technol*. 2004;24(1):151–157.

Mazzocchi G. Body composition: Where and when. *European journal of radiology*. 2016;85(8):1456-60.

McFadden RM, Larmonier CB, Shehab KW, Midura-Kiela M, Ramalingam R, Harrison CA, et al. The Role of Curcumin in Modulating Colonic Microbiota During Colitis and Colon Cancer Prevention. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(11):2483-94.

Minemura M, Shimizu Y. Gut microbiota and liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2015;21(6):1691-1702.

Miranda MCG, Oliveira RP, Torres L, Aguiar SLF, Pinheiro-Rosa N, Lemos L, et al. Frontline Science: Abnormalities in the gut mucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. *J Leukoc Biol*. 2019;106(3):513-529.

Miyazawa T, Nakagawa K, Kim SH, Thomas MJ, Paul L, Zingg JM, et al. Curcumin and piperine supplementation of obese mice under caloric restriction modulates body fat and interleukin-1 $\beta$ . *Nutr Metab (Lond)*. 2018;15:12.

Moran CP, Shanahan F. Gut microbiota and obesity: role in aetiology and potential therapeutic target. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(4):585-97.

Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res*. 2011;21(1):103-15.

Müller MJ, Lagerpusch M, Enderle J, Schautz B, Heller M, Bosy-Westphal A. Beyond the body mass index: tracking body composition in the pathogenesis of obesity and the metabolic syndrome. *Obesity Reviews*. 2012;2:6-13.

Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:541-566.

- Murugan P, Pari L, Rao CA. Effect of tetrahydrocurcumin on insulin receptor status in type 2 diabetic rats: studies on insulin binding to erythrocytes. *J Biosci.* 2008;33(1):63-72.
- Nagano Y, Itoh K, Honda K. The induction of Treg cells by gut-indigenous *Clostridium*. *Curr Opin Immunol.* 2012;24:392-7.
- Neerati P, Devde R, Gangi AK. Evaluation of the effect of curcumin capsules on glyburide therapy in patients with type-2 diabetes mellitus. *Phytother Res.* 2014;28:1796-800.
- Neyrinck AM, Alligier M, Memvanga PB, Névrumont E, Larondelle Y, Pr at V, et al. Curcuma Longa Extract Associated with White Pepper Lessens High Fat Diet-Induced Inflammation in Subcutaneous Adipose Tissue. *PLoS One.* 2013;8(11):e81252.
- NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317-23.
- Nishida M, Nishiumi S, Mizushina Y, Fujishima Y, Yamamoto K, Masuda A, et al. Monoacetylcurcumin strongly regulates inflammatory responses through inhibition of NF-kappaB activation. *Int J Mol Med.* 2010;25(5):761-7.
- Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S. A review of therapeutic effects of curcumin. *Curr Pharm Des.* 2013;19(11):2032-46.
- Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials.* 2014;35(10):3365-83.
- Okeke F, Roland BC, Mullin GE. The role of the gut microbiome in the pathogenesis and treatment of obesity. *Glob Adv Health Med.* 2014;3(3):44-57.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:85-97.
- Panzhinskiy E, Bashir R, Bagchi D, Nair S. Effect of Curcumin and  $\alpha$ -Lipoic Acid in Attenuating Weight Gain and Adiposity. *J Am Coll Nutr.* 2019;38(6):493-498.
- Panzhinskiy E, Hua Y, Lapchak PA, Topchiy E, Lehmann TE, Ren J, et al. Novel curcumin derivative CNB-001 mitigates obesity-associated insulin resistance. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;349(2):248-57.

Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*. 2012;142(5):1100-1101.

Pérez MM, Martins LMS, Dias MS, Pereira CA, Leite JA, Gonçalves ECS, et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor axis elicits intestinal neutrophil migration, restrains gut dysbiosis and lipopolysaccharide translocation in high-fat diet-induced metabolic syndrome model. *Immunology*. 2019;156(4):339-355.

Pistelli GC, Costa CEM. Bactérias intestinais e obesidade. *Revista Saúde e Pesquisa*. 2010;3:115-116.

Pi-Sunyer X. The medical risks of obesity. *Postgraduate medicine*. 2009;121(6):21-33.

Postic C, Dentin R, Denechaud PD, Girard J. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:179-92.

Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol Adv*. 2014;32(6):1053-64.

Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat*. 2014;46(1):2-18.

Ràfols ME. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr*. 2014;61(2):100-12.

Raybould HE. Gut microbiota, epithelial function and derangements in obesity. *J Physiol*. 2012;590(3):441-6.

Remely M, Aumueller E, Jahn D, Hippe B, Brath H, Haslberger AG. Microbiota and epigenetic regulation of inflammatory mediators in type 2 diabetes and obesity. *Benef Microbes*. 2014;5(1):33-43.

Ribeiro RA, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, Cotrim BB, Molioli DD, Boschero AC, et al. Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic  $\beta$ -cells. *Amino Acids*. 2012;43(4):1791-801.

Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013;341(6150):1241-1244.

Rivera-Mancía S, Trujillo J, Chaverri JP. Utility of curcumin for the treatment of diabetes mellitus: evidence from preclinical and clinical studies. *J Nutr Intermed Metab.* 2018;14:29-41.

Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol.* 2016;7:979.

Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9351507.

Robles-Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr.* 2013;109(2):21-6.

Rubino F, Puhl RM, Cummings DE, Eckel RH, Ryan DH, Mechanick JI, et al. Joint international consensus statement for ending stigma of obesity. *Nat Med.* 2020;26(4):485-497.

Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistanc. *Physiology.* 2016;31(4):283-93.

<sup>a</sup> Sahebkar A. Are curcuminoids effective C-reactive protein-lowering agents in clinical practice? Evidence from a meta-analysis. *Phytother Res.* 2014;28:633–42.

<sup>b</sup> Sahebkar A. Curcuminoids for the management of hypertriglyceridaemia. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11:123.

<sup>c</sup> Sahebkar A. Low-density lipoprotein is a potential target for curcumin: novel mechanistic insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014;114:437–8.

Sahebkar A, Chew GT, Watts GF. Recent advances in pharmacotherapy for hypertriglyceridemia. *Prog Lipid Res.* 2014;56:47–66.

Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity.* 2010;18(1):190-5.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews.* 2010;90(3):859-904.

Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533.

- Shao W, Yu Z, Chiang Y, Yang Y, Chai T, Foltz W, et al. Curcumin prevents high fat diet induced insulin resistance and obesity via attenuating lipogenesis in liver and inflammatory pathway in adipocytes. *PLoS One*. 2012;7(1):e28784.
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer*. 2005;41(13):1955-68.
- Shehzad A, Lee YS. Curcumin: Multiple molecular targets mediate multiple pharmacological actions – A review. *Drugs Fut*. 2010;35:113–119.
- Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*. 2013;34(1):39-58.
- Shen L, Ji HF. Intestinal microbiota and metabolic diseases: pharmacological Implications. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37:169–171.
- Shen L, Liu L, Ji HF. Regulative effects of curcumin spice administration on gut microbiota and its pharmacological implications. *Food Nutr Res*. 2017;61(1):1361780.
- Silva CB, Fassini PG, Ramalho LNZ, da Conceição EC, Zordan AJCM, Carlos D, et al. Curcuma Supplementation in High-Fat-Fed C57BL/6 Mice: No Beneficial Effect on Lipid and Glucose Profile or Prevention of Weight Gain. *Eur J Nutr*. 2020;59(1):93-102.
- Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem*. 1995;270(42):24995-5000.
- Singh V, Rana M, Jain M, Singh N, Naqvi A, Malasoni R, et al. Curcuma oil attenuates accelerated atherosclerosis and macrophage foam-cell formation by modulating genes involved in plaque stability, lipid homeostasis and inflammation. *Br J Nutr*. 2015;113(1):100-13.
- Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V, et al. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:499–505.
- Song Z, Revelo X, Shao W, Tian L, Zeng K, Lei H, et al. Dietary Curcumin Intervention Targets Mouse White Adipose Tissue Inflammation and Brown Adipose Tissue UCP1 Expression. *Obesity (Silver Spring)*. 2018;26(3):547-558.

- Song Z, Wang H, Zhu L, Han M, Gao Y, Du Y, et al. Curcumin improves high glucose-induced INS-1 cell insulin resistance via activation of insulin signaling. *Food Funct.* 2015;6(2):461-9.
- Sreng N, Champion S, Martin JC, Khelaifia S, Christensen JE, Padmanabhan R, et al. Resveratrol-mediated glycemic regulation is blunted by curcumin and is associated to modulation of gut microbiota. *J Nutr Biochem.* 2019;72:108218.
- Stanić Z. Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge - A Review. *Plant Foods Hum Nutr.* 2017;72(1):1-12.
- Sudheer AR, Chandran K, Marimuthu S, Menon VP. Ferulic acid modulates altered lipid profiles and prooxidant/antioxidant status in circulation during nicotine-induced toxicity: A dose-dependent study. *Toxicol Mech Methods.* 2005;15(6):375-81.
- Surana NK, Kasper DL. The yin yang of bacterial polysaccharides: lessons learned from *B. fragilis* PSA. *Immunol Rev.* 2012;245(1):13-26.
- Tai MH, Chen PK, Chen PY, Wu MJ, Ho CT, Yen JH, et al. Curcumin enhances cell-surface LDLR level and promotes LDL uptake through downregulation of PCSK9 gene expression in HepG2 cells. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58:2133-45.
- Tham CL, Liew CY, Lam KW, Mohamad AS, Kim MK, Cheah YK, et al. A synthetic curcuminoid derivative inhibits nitric oxide and proinflammatory cytokine synthesis. *Eur J Pharmacol.* 2010;628:247-54.
- Thota RN, Acharya SH, Garg ML. Curcumin and/or omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation reduces insulin resistance and blood lipids in individuals with high risk of type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Lipids Health Dis.* 2019;18(1):31.
- Tilg H, Moschen AR. Microbiota and diabetes: an evolving relationship. *Gut.* 2014;63(9):1513-1521.
- Tringe SG, von Mering C, Kobayashi A, Salamov AA, Chen K, Chang HW, et al. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science.* 2005;308(5721):554-7.
- Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol.* 2013;1(1):448-56.

Tsuda T. Curcumin as a functional food-derived factor: degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives. *Food Funct.* 2018;9:705–14.

Tsukumo DM, Carvalho BM, Carvalho-Filho MA, Saad MJ. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(2):139-44.

Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2008;3(4):213-23.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007;449(7164):804-10.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-31.

UBC - UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA ANIMAL CARE GUIDELINES: Oral Dosing (Gavage) in Adult Mice and Rats SOP. Vancouver: UBC Animal Care and Use Program, 2012. Disponível em: [https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/ACC-2012-Tech09%20Oral%20Dosing%20%28Gavage%29%20in%20the%20Mouse%20and%20Rat%29%20Updated%20Feb%202015%20final\\_cc%2C%20ka.pdf](https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/ACC-2012-Tech09%20Oral%20Dosing%20%28Gavage%29%20in%20the%20Mouse%20and%20Rat%29%20Updated%20Feb%202015%20final_cc%2C%20ka.pdf). Acesso em: 13 nov. 2020.

Ung VY, Foshaug RR, MacFarlane SM, Churchill TA, Doyle JS, Sydora BC, et al. Oral administration of curcumin emulsified in carboxymethyl cellulose has a potent antiinflammatory effect in the IL-10 gene-deficient mouse model of IBD. *Dig Dis Sci.* 2010;55(5):1272-7.

Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am.* 2018;102(1):13-33.

Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab.* 2006;4(2):107-10.

Van Dyke MI, McCarthy AJ. Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(4):2049-53.

- Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1978;43(2):86-92.
- Wang J, Ghosh SS, Ghosh S. Curcumin Improves Intestinal Barrier Function: Modulation of Intracellular Signaling, and Organization of Tight Junctions. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;312(4):438-445.
- Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;15(12):1867-76.
- Wiest R, Albillos A, Trauner M, Bajaj JS, Jalan R. Targeting the gut-liver axis in liver disease. *J Hepatol*. 2017;67(5):1084-1103.
- Williamson G, Clifford MN. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 2017;139:24-39.
- Woodhouse CA, Patel VC, Singanayagam A, Shawcross DL. Review article: the gut microbiome as a therapeutic target in the pathogenesis and treatment of chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(2):192-202.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2018). Fact sheet no. 311: obesity and overweight. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 22 nov. 2019.
- Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking Long-Term Dietary Patterns With Gut Microbial Enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-8.
- Xu XY, Meng X, Li S, Gan RY, Li Y, Li HB. Bioactivity, health benefits, and related molecular mechanisms of curcumin: current progress, challenges, and perspectives. *Nutrients*. 2018;10:pii:E1553.
- Xu Y, Hu N, Jiang W, Yuan HF, Zheng DH. Curcumin-carrying nanoparticles prevent ischemia-reperfusion injury in human renal cells. *Oncotarget*. 2016;7(52):87390-87401.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med*. 2001;7(8):941-6.

Yeh WJ, Hsia SM, Lee WH, Wu CH. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: a review of recent findings. *J Food Drug Anal.* 2017;25:84–92.

Yue W, Liu Y, Li X, Lv L, Huang J, Liu J. Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via regulation of autophagy and intestinal immunity. *Turk J Gastroenterol.* 2019;30(3):290-298.

Zhang M, Liu F, Zhou P, Wang Q, Xu C, Li Y et al. The MTOR signaling pathway regulates macrophage differentiation from mouse myeloid progenitors by inhibiting autophagy. *Autophagy.* 2019;15(7):1150-1162

Zhao HM, Han F, Xu R, Huang XY, Cheng SM, Huang MF, et al. Therapeutic effect of curcumin on experimental colitis mediated by inhibiting CD8+CD11c+ cells. *World J Gastroenterol.* 2017;23(10):1804-1815.

Zhao J, Sun XB, Ye F, Tian WX. Suppression of fatty acid synthase, differentiation and lipid accumulation in adipocytes by curcumin. *Mol Cell Biochem.* 2011;351(1-2):19-28.

Zhao NJ, Liao MJ, Wu JJ, Chu KX. Curcumin Suppresses Notch-1 Signaling: Improvements in Fatty Liver and Insulin Resistance in Rats. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):819-826.

## ANEXO

## ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP (CEUA-FMRP)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS





## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*O efeito da suplementação de cúrcuma na microbiota intestinal e pâncreas de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica*”, registrado com o número **089/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Vivian Marques Miguel Suen**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 02 de agosto de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 50 camundongos C57Bl 6 machos pesando 20g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 02/08/2017 a 07/12/2017.

We certify that the Protocol *nº 089/2017*, entitled “*The effect of curcuma supplementation in the intestinal microbiota and pancreas of C57BL / 6 mice fed a highfat diet*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *08/02/2017*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 50 male C57Bl 6 mice weighing 20g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 12/07/2017.

Ribeirão Preto, 02 de agosto de 2017



**Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro**  
Vice-Presidente da CEUA-FMRP – USP,  
em exercício

---

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil -14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br