LAYANNE CABRAL DA CUNHA ARAUJO

Uncaria tomentosa melhora sensibilidade à insulina e inflamação hepática em modelos de camundongos obesos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências (Fisiologia Humana), do Instituto de Ciências Biomédicas no Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências (Fisiologia Humana)

São Paulo
2018

LAYANNE CABRAL DA CUNHA ARAUJO

Uncaria tomentosa melhora sensibilidade à insulina e inflamação hepática em modelos de camundongos obesos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências, do Instituto de Ciências Biomédicas no Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Carla R. O. Carvalho

Versão Corrigida

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cabral da cunha Araujo, Layanne
Uncaria tomentosa melhora sensibilidade à insulina e inflamação hepática em modelos de camundongos obesos / Layanne Cabral da cunha Araujo; orientadora Carla Roberta de Oliveira Carvalho. -- São Paulo, 2019.
109 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Uncaria tomentosa. 2. Obesidade. 3. Resistência à insulina. 4. Esteatose hepática. 5. Inflamação. I. Roberta de Oliveira Carvalho, Carla , orientador. II. Título.

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas

Candidata: Layanne Cabral Da Cunha Araujo

Título da tese: *Uncaria tomentosa* melhora sensibilidade à insulina e inflamação hepática em modelos de camundongos obesos

Orientadora: Carla Roberta de Oliveira Carvalho

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado em sessão pública realizada a ___/___/____, considerou a candidata:

( ) Aprovada ( ) Reprovada

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinado r(a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Dedicatórias

Aos meus pais, Luiz e Luzia

Agradecimentos

Primeiramente, a força sobrenatural que move esse universo, que eu nomeio como Deus.

À minha orientadora, Carla Carvalho, por ter me dado a oportunidade de trabalharmos juntas. Pessoa que passei a admirar tanto pelo lado profissional quanto pessoal, uma das pessoas mais humana que já tive a oportunidade de conviver. Costumo dizer que não vim aprender com ela apenas técnicas, mas principalmente como devo tratar meus futuros alunos, com respeito, humanidade e reconhecimentos.

Ao Laboratório de Sinalização Intracelular, especialmente a Bruna, Gabi, Flávia, Victor, Marillu.

Ao Laboratório de Biologia Molecular por sempre me acolher nos experimentos de colaboração, especialmente aos Professores Rui Curi, Silvana Bordin e ao técnico Gilson Murata. E a todos da equipe, que passei a conviver no último ano do doutorado, Fran, Takeo, Joice, Gisela, Taniara, Mariana, Laís, Tífany.

Aos meus colaboradores, que contribuíram para o enriquecimento dessa tese, Karla Feitosa, Gilson Murata, Isadora Furigo, Simone Teixeira, Camila Lucena, Luciene (Teca), Joice Bertaglia, Andrey Santos, Dioze Guadaguinini, Marcelo Muscara, Soraia Costa, José Donato, Silvana Bordin, Rui Curi, Mário Saad.

Aos secretários do programa de pós-graduação, José Maria e Paloma, por todo o auxílio e paciência.

As agências de fomento, FAPESP (Processo: 2016/06113-9) e CNPq (Processo/Bolsa: 140170/1015-4; Processo/Bolsa de produtividade em pesquisa: 303543/2014-0), que contribuíram financeiramente para o desenvolvimento dessa tese.

À Hebarium, laboratório farmacêutico, que nos cedeu o extrato da *Uncaria tomentosa* para a realização dos testes.

Aos meus amigos, que vieram do Nordeste, na mesma leva, para fazerem pós-graduação, Theresa Rachel, Sandro Mascena, Vinícius de Morais, Eloi Matias. Eles supriram a saudade da família quando apertava, nos divertimos muito durante esse período. Quero deixar um agradecimento especial a Theresa Rachel, convivemos 3 anos no mesmo apartamento, fizemos laços de irmandade. À Maíra Valle, uma amiga que eu fiz para a vida, que entre tantas conversas e cafés aprendemos muitas coisas juntas. A Gabriela Moreira, amizade que fiz além do lab, conversamos muito da vida, filosofamos, nos apoiamos. A Raquel Queiroz, que dividiu apartamento comigo no meu último ano de doutorado, tempo suficiente para firmar uma amizade.

À minha família, meus pais (Luiz e Luzia), que são minhas preciosidades e meus irmãos (Lucinaldo e Leonardo).

À todos que contribuíram direto ou indiretamente para a realização dessa tese.

Layanne Cabral da C. Araujo

A melhor coisa sobre o futuro é que vem um só dia de cada vez

Abraham Lincoln

RESUMO

RESUMO

Araujo, L.C.C. ***Uncaria tomentosa* melhora sensibilidade à insulina e inflamação hepática em modelos de camundongos obesos.** 2019. 109 p. Tese de doutorado (Ciências – Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O balanço energético corporal é mantido através de alterações na ingestão de calorias e no gasto energético. O prolongado balanço energético positivo, em que a ingestão excede o gasto, promove obesidade. A obesidade resulta do aumento de triacilglicerois no tecido adiposo, que também passa a apresentar inflamação de baixo grau crônica. Como o resultado envolve a redução da capacidade de tamponamento dos ácidos graxos livres (AGL) circulantes e subsequente deposição de gordura em territórios ectópicos como musculatura esquelética e fígado, além de aumentar o risco de desenvolver o diabetes *Mellitus* tipo 2. Assim, a obesidade é um fator de risco importante para doenças metabólicas e suas comorbidades, dentre elas a doença gordurosa hepática não alcoólica. Uma proposta terapêutica para intervir na obesidade e/ou nas comorbidades associadas é o uso de substancias com ação anti-inflamatória. Considerando a possibilidade de novo uso para alguns produtos liberados para uso e com potencial tóxico já avaliado, foi escolhido avaliar o efeito do fitoterápico *Uncaria tomentosa*. Para isso, foram utilizados dois modelos de camundongos: (1) obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DH), camundongos machos C57BL/6, alimentado com DH por 10 semanas, e (2) camundongo geneticamente obeso, ob/ob. A dose e tempo de tratamento escolhidos basearam-se no resultado da tolerância à insulina determinada inicialmente. Os animais receberam via oral o extrato da UT na dose de 50 mg/kg, uma vez ao dia, por 5 dias consecutivos. Seguindo-se ao tratamento, os animais foram submetidos a testes de tolerância a glicose e insulina, análise do coeficiente respiratório e depois a eutanásia, para retirada do fígado e sangue. O tecido hepático foi submetido a técnicas histológicas para verificar a morfologia e quantificação das gotículas de gordura, extração das proteínas celulares e RNAm para realização de western blot típico e reação em cadeia da polimerase (PCR), respectivamente. Também foi utilizada imuno-histoquímica com anticorpo anti-F4/80 para comprovar infiltrado inflamatório. O tratamento com UT reduziu a glicemia de jejum cerca de 15 e 20% nos modelos DH e ob/ob, respectivamente, e a insulinenia para 54% no grupo DH, enquanto no grupo ob/ob houve um aumento de 2 vezes na insulinemia com o uso da UT. Houve uma redução

de 22% no índice de massa corpórea (IMC) acompanhada de maior gasto energético com o tratamento no modelo DH. A esteatose hepática foi reduzida em aproximadamente 30% e a presença de infiltrados inflamatórios em 70% em ambos os modelos. Além disso, o grau de fosforilação do IRS1 no resíduo serina foi reduzido em 25% nos camundongos alimentados com DH após tratamento com UT, acompanhando a maior sensibilidade à insulina desses animais em relação aos obesos não tratados. Diante desses resultados, concluímos que o extrato bruto da *Uncaria tomentosa* melhora a homeostase da glicose e reverte a esteato-hepatite incipiente a estatose benigna. O tratamento com *Uncaria tomentosa* pode ser uma estratégia terapêutica potencial no combate a alterações metabólicas associadas à obesidade como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) de início imediato.

Palavras-chaves: *Uncaria tomentosa*. Obesidade. Resistência à insulina. Esteatose hepática. Inflamação.

ABSTRACT

ABSTRACT

Araujo, L.C.C. ***Uncaria tomentosa improves insulin sensitivity and hepatic inflammation in obese mice models*.** 2019. 109 p. Doctoral thesis (Ciências – Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The body's energy balance is maintained through changes in calorie intake and energy expenditure. The prolonged positive energy balance, in which the intake exceeds the expense, promotes obesity. Obesity results from the increase of triacylglycerols in adipose tissue, which also starts to present chronic low-grade inflammation. The result of this involves the reduction of the buffering capacity of circulating free fatty acids and subsequent fat deposition in ectopic territories such as skeletal muscle and liver, as well as increasing the risk of developing type 2 diabetes mellitus. Thus, obesity is an important risk factor for metabolic diseases and their comorbidities, among them non-alcoholic fatty liver disease. A therapeutic proposal to intervene in obesity and/or associated comorbidities is the use of substances with anti-inflammatory action. Considering the possibility of new use for some products released for use and with toxic potential already evaluated, it was chosen to evaluate the effect of the herbal remedy *Uncaria tomentosa* (UT), popularly known as cat's claw. Two models of mice were used: (1) higt fat diet induced obesity (HFD), male mice C57BL/6, fed HFD for 12 weeks, and (2) genetically obese mice, ob/ob. The dose and time of treatment chosen were based on the initially determined insulin tolerance result. The animals received orally the UT extract at the dose of 50 mg/kg once daily for 5 consecutive days. Following the treatment, the animals were submitted to glucose and insulin tolerance tests, analysis of the respiratory coefficient and then euthanasia, for removal of the liver and blood. Liver tissue was submitted to histological techniques to verify the morphology and quantification of fat droplets, extraction of cellular proteins and mRNA for typical western blot and polymerase chain reaction (PCR), respectively. Immunohistochemistry with anti-F4 / 80 antibody was also used to prove inflammatory infiltrate. Treatment with UT reduced fasting glucose by 15 and 20% in the HFD and ob/ob models respectively, and the insulinemia to 54% in the HFD group, whereas in the ob/ob group there was a 2-fold increase in insulinemia with the use of UT. There was a 22% reduction in body mass index (BMI) accompanied by greater energy expenditure with HFD treatment. Hepatic steatosis was reduced by approximately 30% and the presence of inflammatory infiltrates by 70% in both models. In addition, the

degree of IRS1 phosphorylation at the serine residue was reduced by 25% in the mice fed HFD after treatment with UT, following the higher insulin sensitivity of these animals compared to the untreated obese. In view of these results, we conclude that the crude extract of *Uncaria tomentosa* improves glucose homeostasis and reverts incipient steatohepatitis to benign steatosis. Treatment with *Uncaria tomentosa* can be a potential therapeutic strategy in the action against obesity-related metabolic alterations such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

Key words: *Uncaria tomentosa*. Obesity. Insulin resistance. Hepatic steatosis. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização da insulina.....28

Figura 2 – Crosstalk entre as vias de sinalização da insulina e inflamação.....30

Figura 3 – *Uncaria tomentosa*, unha de gato.....34

Figura 4 – Modelos de camundongos C57BL/6 e geneticamente obesos (ob/ob).... 39

Figura 5 – Protocolo experimental para escolha da 40

Figura 6 – Sistema de monitoramento animal para gasto energético.....42

Figura 7 – Sistema teste com 270 pontos.....43

Figura 8 – Passo-a-passo para quantificar gotículas de gordura.....44

Figura 9 – Teste de tolerância à insulina em animais alimentados com dieta padrão tratados com doses diárias (50, 100 e 200 mg/kg) por 1, 5 e 10 dias consecutivos do extrato de *Uncaria tomentosa*.....54

Figura 10 – Teste de tolerância à insulina em animais alimentados com dieta hiperlipídica tratados com doses diárias (50, 100 e 200 mg/kg) por 5, 10 e 20 dias consecutivos do extrato de *Uncaria tomentosa*.....55

Figura11 – Evolução do teste de tolerância à insulina de 2 a 10 semanas 56

Figura 12 – Glicemia de jejum (12 h), insulinemia e K_{itt} de animais alimentados DH tratados com doses diárias de 50 mg/kg do extrato de *Uncaria tomentosa* durante 5 dias consecutivos. 57

Figura 13 – Glicemia de jejum (6h), K_{itt} e GTT de animais ob/ob tratados com dose de 50 mg/kg do extrato de *Uncaria tomentosa* durante 5 dias consecutivos.....58

Figura 14 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre parâmetros metabólicos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.....59

Figura 15 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre parâmetros metabólicos nos animais ob/ob.....60

Figura 16 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre as enzimas hepáticas de animais alimentados com dieta hiperlipídica em relação a dieta padrão.....61

Figura 17 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre as enzimas hepáticas de animais ob/ob.....62

Figura 18 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre gotículas de gordura, infiltrado inflamatório e deposição de fibras colágenas no fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica em relação a dieta padrão.....63

Figura 19 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre gotículas de gordura, infiltrado inflamatório e deposição de fibras colágenas no fígado de animais ob/ob.....64

Figura 20 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a atividade das proteínas da via de sinalização da insulina no fígado metabólicos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.....66

Figura 21 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a atividade das proteínas da via de sinalização da insulina no fígado de animais ob/ob.....68

Figura 22 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a atividade das proteínas da via de sinalização da inflamação no fígado metabólicos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.....69

Figura 23 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre expressão gênica de marcadores pro (F480 e IL1β) e anti-inflamatório (IL10 e arginase1) no de animais alimentados com dieta hiperlipídica..... 71

Figura 24 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a atividade das proteínas da via de sinalização da inflamação no fígado metabólicos de animais ob/ob.....72

Figura 25 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre expressão gênica de marcadores pro (F480 e IL1β) e anti-inflamatório no fígado (IL10 e arginase1) metabólicos de animais ob/ob.....73

Figura 26 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre infiltração de macrófagos no fígado metabólicos de animais alimentados com dieta hiperlipídica.....74

Figura 27 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre infiltração de macrófagos no fígado metabólicos de animais ob/ob..... 75

Figura 28 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre o estresse oxidativo no sangue e tecido de animais alimentados com dieta hiperlipídica.....76

Figura 29 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre o estresse oxidativo no sangue e tecido de animais ob/ob.....77

Figura 30 – Esquema de conclusão mostrando o efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a via de sinalização da inflamação x via de sinalização da insulina (Adaptado de Fang et al., 2017) 86

LISTA DE ABREVIATURAS

UT	*Uncaria tomentosa*
DH	Dieta hiperlipídica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
PI3-K	Fosfatidil-inositol (PI)-3-cinase
PIP2	Fosfatidil inositol bifosfato
PIP3	Fosfatidil inositol trifosfato
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1
AGL	Ácidos graxos livres
TLR	*Toll-like receptors*
JNK	Cinases Jun N-terminal
AP-1	Proteína ativadora de proteína-1
IκB	Inibidor de NF-κB
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
$O_2^{\bullet -}$	Ânion superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$OH^{\bullet -}$	Radical hidroxil
NO	Óxido nítrico
ONOO-	Peroxinitrito

EHNA	Esteato-hepatite não alcóolica
AG	Ácidos graxos
ob/ob	Camundongo geneticamente obesos (ausência de leptina)
DP	Dieta padrão
K_{itt}	Constante de decaimento da glicose
VO_2	Volume de oxigênio
VCO_2	Volume de gás carbônico
IMC	Índice de Massa Corporal
HE	Hematoxilina e eosina
P_T	Pontos totais
P_I	Ponto individual
N_2	Nitrogênio líquido
ORO	*Oil red O*
TBARs	Reação do ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
MDA	Malondialdeído
BHT	Butil hidroxitolueno
TMP	Tetrametoxipropanol
ITT	Teste de tolerância a insulina
TMP	Tetrametoxipropanol
DP50	Dieta padrão + tratamento com UT (dose 50mg/kg peso corporal)
DP100	Dieta padrão + tratamento com UT (dose 100)
DP200	Dieta padrão + tratamento com UT (dose 200)
DH 50	Dieta hiperlipídica + tratamento com UT (dose 50)
DH 100	Dieta hiperlipídica + tratamento com UT (dose 100)
DH 200	Dieta hiperlipídica + tratamento com UT (dose 200)

DH+UT	Dieta hiperlipídica + tratamento com UT (dose fixada em 50mg/kg de peso corporal)
DP+UT	Dieta padrão + tratamento com UT
ob/ob +UT	ob/ob + tratamento com UT
ob/ob +UT	ob/ob + tratamento com UT
ob/ob +UT	ob/ob + tratamento com UT
RER	*Respiratory Exchange Ratio*
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransaminase
TLR-4	*Toll-like receptors* do tipo 4

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....24

2 REVISÃO DA LITERATURA.....26

2.1 Resistência à insulina.....27

2.1.1 Ligação entre as vias de sinalização da insulina e inflamação.....**28**

2.2 Espécies reativas.....31

2.3 Esteatose hepática.....32

2.4 Plantas medicinais.....33

2.4.1 *Uncaria tomentosa*.....**34**

3 OBJETIVOS.....36

3.1 Geral.....37

3.2 Específicos.....37

4 MATERIAL E MÉTODOS.....38

4.1 Animais.....39

4.2 Tratamento.....40

4.3 Testes de tolerância à insulina (ITT) e glicose (GTT) 40

4.4 Análise da Ingestão alimentar, gasto energético e índice de massa corpórea.....41

4.5 Análises morfológicas.....42

4.5.1 Coloração H & E.....**42**

4.5.2 Coloração Oil Red O (ORO) **43**

4.5.3 Coloração Picrosirius e Tricômio de Masson.....**45**

4.6 Avaliação da expressão e atividade de proteínas - Western Blot.....46

4.7 Avaliação da expressão gênica - Reação em cadeia da polimerase (PCR) 47

4.8 Avaliação da expressão de F4/80 – Imuno-histoquímica (IHC) 48

4.9 Avaliação do estresse oxidativo.....49

4.9.1 Reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs) **.....49**

4.9.2 Análise da expressão de resíduos proteicos de nitrotirosina (NT) e de proteínas carboniladas - Método de SLOT BLOT**.....50**

*4.9.2.1 Análise de proteínas nitradas em resíduos de tirosina***.....51**

*4.9.2.2 Análise de proteínas carboniladas***.....51**

4.10 Análise estatística.....52

5 RESULTADOS.....53

5.1Dieta hiperlipídica promove resistência à insulina.....54

5.2 Dose resposta e efeito tempo dependente de administração de extrato de *Uncaria tomentosa* sobre a sensibilidade à insulina de animais alimentados com dieta padrão e hiperlipídica.....54

5.3 *Uncaria tomentosa* reduz glicemia e insulinemia de jejum e melhora tolerância à glicose em animais alimentados com dieta hiperlipídica e geneticamente obesos.....56

5.4 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre ingestão alimentar, massa corporal, consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e ritmo de troca respiratória (RER).....58

5.5 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre enzimas e morfologia histológica hepáticas.. 60

5.5.1 Enzimas hepáticas - Alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransaminase (AST) **.....60**

5.5.2 Aspectos morfológicos.....**62**

5.5.3 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a expressão proteica dos elementos iniciais da ação insulínica celular.....**65**

5.5.4 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre marcadores inflamatórios em fragmentos hepáticos dos camundongos obesos.....**69**

5.5.4.1 Infiltração de macrófagos no fígado.....**73**

5.5.5 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre parâmetros de estresse oxidativo no soro e fígado dos camundongos obesos e controles.....**75**

5 DISCUSSÃO.....**79**

6 CONCLUSÕES.....**86**

7 REFERÊNCIAS.....**88**

ANEXOS

A Resultados Adicionais

B Artigo publicado da tese

C Artigo publicado de colaboração

D Artigo publicado resultante de colaboração realizada durante o programa do doutorado

E Artigo submetido que foi realizado em paralelo a tese

F Artigos submetidos resultante de colaboração realizada durante o programa do doutorado

G Certificado do Comitê de Ética

1 INTRODUÇÃO

O balanço energético corporal é mantido através de alterações na ingestão de calorias e no gasto energético. O prolongado balanço energético positivo, em que a ingestão excede o gasto, promove obesidade, uma doença caracterizada pelo ganho de peso excessivo. A obesidade é considerada o problema de saúde pública mais comum do século XXI dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (PALOU et al., 2000; BOWERS et al., 2004).

A obesidade está associada a algumas comorbidades como diabetes *Mellitus* tipo 2, acidente vascular cerebral, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e esteatose hepática, e isso vem promovendo uma redução na expectativa de vida e morte prematura. Cerca de 2,8 milhões de pessoas morrem anualmente devido ao excesso de peso ou obesidade (BERETTA et al., 2015; KOBYLIAKET al., 2016).

O diabetes *Mellitus* tipo 2 é uma doença metabólica, cujos mecanismos patogênicos incluem resistência à insulina e disfunção das células β pancreáticas. A obesidade se apresenta como um dos principais fatores predisponentes para a resistência à insulina e o desenvolvimento do diabetes *Mellitus* tipo 2. Além da capacidade de estocar lipídeos, o tecido adiposo é o principal fornecedor de AGL, majoritariamente liberados pelo tecido adiposo subcutâneo adequando as necessidades energéticas do tecido muscular esquelético, coração, fígado e outras células. O excesso de AGL no sangue, nesse contexto de obesidade e DM tipo 2, promove um estado inflamatório, reduz a captação periférica de glicose induzida pela insulina e aumenta a produção hepática de glicose, desta maneira contribuindo para a resistência à insulina e intolerância a glicose (ODEGAARD et al., 2013; WANG et al., 2018).

Esse acúmulo de ácidos graxos no tecido adiposo, além da produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulam a liberação de substâncias bioativas conhecidas como adipocinas, que aumentam a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS). Então, a inflamação e o estresse oxidativo contribuem para a patogêneses de distúrbios metabólicos como a resistência à insulina (LEFRANC et al., 2018).

Além disso, devido a esse excesso de ácidos graxos no tecido adiposo, eles não apenas começam a ser liberados de forma livre na corrente sanguínea, como também passam a ser menos captados e estocados no tecido adiposo, passando a ser estocado em outros tecidos como muscular esquelético e hepático. A ineficiência

desses tecidos em metabolizar esses ácidos graxos induz o acúmulo de gordura ectópica, sendo esse acúmulo no fígado conhecido como esteatose hepática (GUILHERME et al., 2008, BROWN, KLEINER, 2015).

Diante do exposto, testes com medicamentos alopáticos e fitoterápicos existentes no mercado com ações anti-inflamatórias podem ser válidos para determinar seu papel no combate ou controle aos fenômenos descritos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resistência à insulina

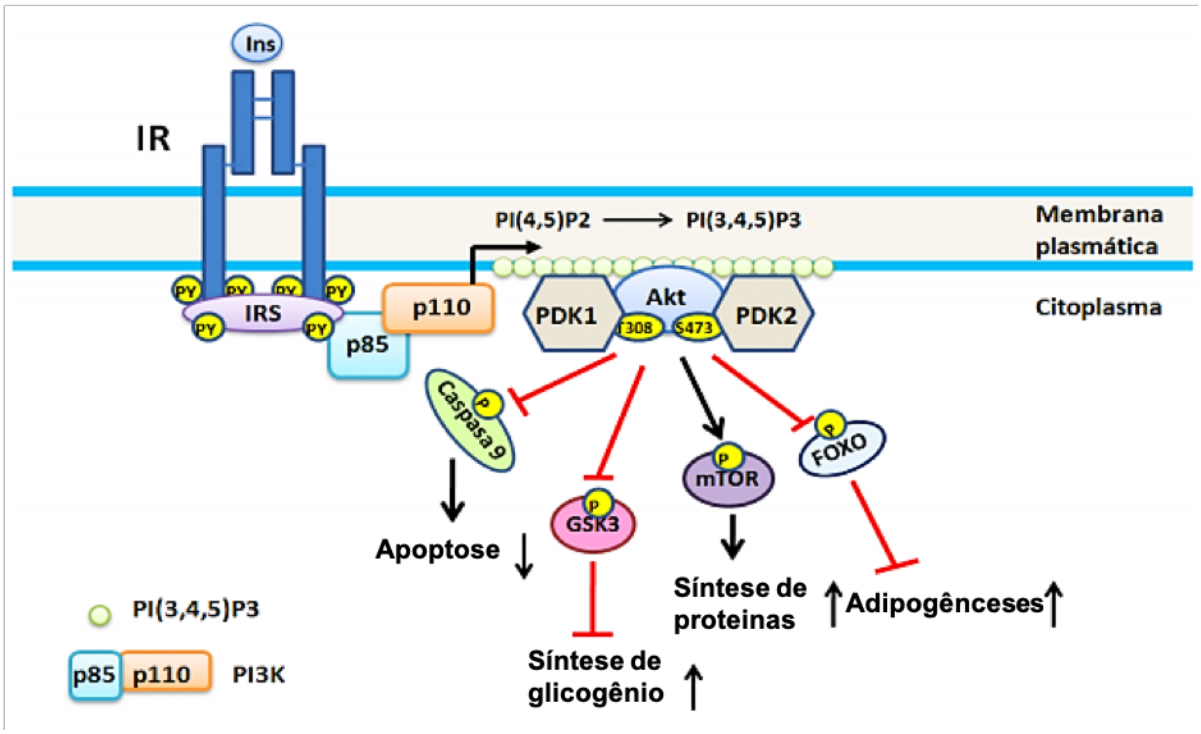
A resistência à insulina é comum em pacientes pré-diabéticos e diabéticos, sendo considerada um fator central no desenvolvimento do DM 2. Essa resistência ocorre nos principais tecidos alvos da ação metabólica desse hormônio, fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. A resistência no fígado tem um papel importante na hiperglicemia de jejum. Essa elevada concentração de glicose sanguínea estimula as células β a uma secreção contínua de insulina, induzindo uma paradoxal hiperinsulinemia concomitante a hiperglicemia. O passo seguinte é uma insuficiência na produção e secreção de insulina e, consequentemente a instalação do DM tipo 2. Assim, pode-se dizer que a resistência à insulina hepática é um estado pré-diabético. (SAH et al., 2016).

O receptor da insulina pertence a subfamília de receptores de membrana celular com atividade de tirosina cinase. Esse receptor é uma glicoproteína heterotetramérica composto por 4 subunidades, duas subunidades extracelular α e duas transmembrana β. Quando a insulina se liga as subunidades α do receptor, há ativação da capacidade cinase, promovendo a autofosforilação das subunidades β em resíduos de tirosina. Isso potencializa a capacidade cinase do receptor de insulina que fosforila proteínas específicas intracelulares, como os IRS-1/2. Uma vez fosforilados em resíduos tirosina dentro de domínios específicos, os IRS-1/2 passam a ser capazes de ligarem a proteínas que apresentam domínio SH2, como a subunidade regulatória p85 da fosfatidil-inositol (PI)-3-cinase (PI3-K), ativando a subunidade catalítica. Em sequencia, a PI3-K ativada fosforila os fosfatidis inositois bifosfatos (PIP2) a fosfatidil inositol trifosfato (PIP3). PIP3 é um alvo para recrutar a proteína cinase B (Akt) para a membrana celular. Além disso, a PI3K ativa a Pdk1, cinase dependente de PI3K, que por sua vez fosforila as 3 isoformas de Akt (cinase serina/treonina). Uma vez ativada a Akt terá papel central para promover síntese de glicogênio, regulação do metabolismo de glicose e lipídeos e translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana citoplasmática permitindo o aumento da captação de glicose nos tecidos muscular estriado e adiposo (MANNING et al., 1995; CANTLEY, 2007; DEFRONZO, 2009) (Figura 1).

Alterações em algum ponto dessa via de sinalização, seja na fosforilação ou

desfosforilação do receptor que possa atingir um sinal a jusante em direção a proteína Akt, pode interferir na ação da insulina e levar a resistência à insulina (WHEATCROFT et al., 2003; SAH et al., 2016). Alguns estudos mostram que defeitos pós-receptor estão associados com prejuízos na sinalização via IRS/ PI3K/Akt na resistência à insulina. Outro mecanismo que pode alterar essa via é a ativação da subunidade p85α, que desloca a p110 do IRS1, e juntamente com a fosforilação da cinase em serina, piora o quadro de resistência à insulina, através da degradação precoce do IRS1, uma vez o IRS fosforilado em serina é alvo do sistema ubiquitina/proteassoma e é degradado mais rapidamente, resultando em redução da expressão dessa proteína (WILCOX, 2005; NAIMI et al., 2007; SHAH et al., 2008; ZAFAR, et al, 2018).

Figura 1 – Via de sinalização da insulina



Ativação da via PI3K/AKT pela insulina (Adaptado de REYES; PLANCARTE, 2008).

2.1.1 Ligação entre as vias de sinalização da insulina e inflamação

Como descrito anteriormente, a resposta da insulina na célula se dá através da sua ligação com o seu receptor, que se autofosforila e ativa o substrato do receptor de insulina (IRS1), promovendo uma sinalização a jusante ou *downstream*. Essa etapa inicial da sinalização pode ser inibida por uma resposta inflamatória e levar a resistência à insulina (WELLEN, HOTAMISLIGIL, 2005).

Os ácidos graxos livres (AGL) provenientes da dieta, especialmente os ácidos graxos saturados, são reconhecidos por receptores do sistema imunológico inato, *Toll-like receptors* (TLR) - TLR2/TLR4, como agentes estranhos, semelhante aos agentes patogênicos bacterianos (TAKEDA et al., 2003; HUANG et al., 2012).

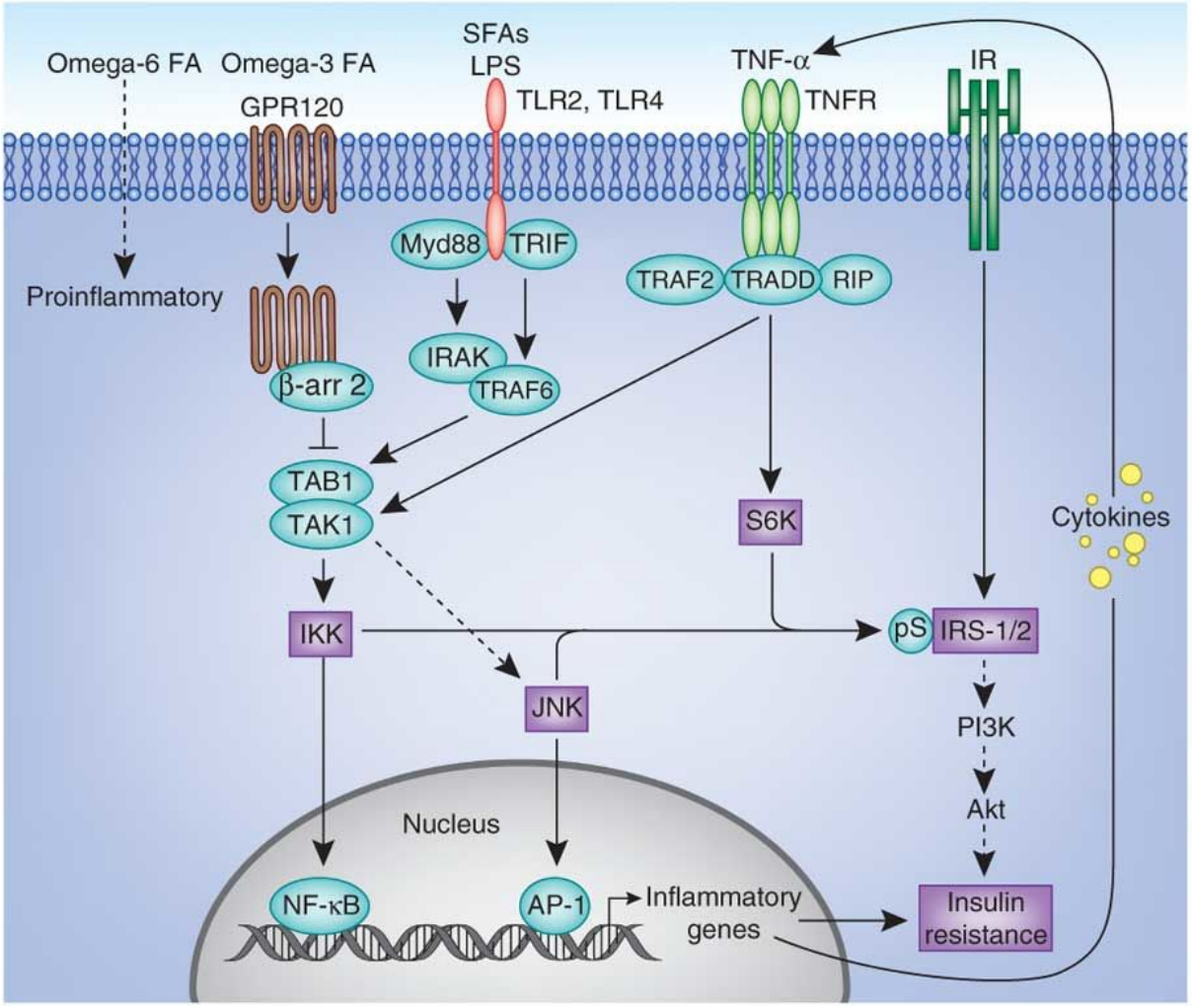
O TLR4 em macrófagos, tecido adiposo e fígado desencadeiam a ativação de proteínas da via de sinalização da inflamação, JNK e IKKβ, que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas proteínas cinases também podem estimular a fosforilação inibitória do IRS-1 em resíduos de serina, que reduz a fosforilção do IRS1 em tirosina e a capacidade do IRS-1 de se associar ao receptor de insulina, e com isso interferindo com a sinalização a jusante da insulina, desencadeando um quadro de resistência insulínica (SHI, 2006; HOTAMISLIGIL, 2008; VINOLO et al., 2012) (Figura 2).

Os três membros do grupo das cinases Jun N-terminal (JNK) serina/treonina, JNK-1, -2 e -3, pertencem a família MAPK. Essas cinases regulam várias funções celulares, através do controle transcricional pela fosforilação da proteína ativadora de proteína-1 (AP-1), incluindo c-JUN e JUNB. Quando ativada, através de estímulos como ácidos graxos, citocinas pró-inflamatórias e estresse de retículo, a JNK fosforila o IRS1 em resíduos de serina, como o Ser^{307}, prejudicando a ação da insulina. Essas cinases tem sido apontadas como um regulador metabólico central no desenvolvimento da resistência a insulina na obesidade, e está elevada no tecido adiposo, músculo e fígado (AGUIRRE et al., 2000; DAVIS, 2000; HIROSUMI et al., 2002).

A IKKβ pode interferir na via de sinalização da insulina de duas formas: primeiro, fosforilando diretamente o IRS1 em resíduos de serina, semelhante ao que ocorre com as JNKs; e segundo, pode inibir o inibidor de NF-κB (IκB) por fosforilação e, consequentemente ativar o NF-κB. Essa proteína é um fator de transcrição, que

estimula a síntese de mediadores inflamatórios, como TNF-α, que por sua vez, atua como retroalimentação positiva ao ligar-se ao seu receptor e ativar IKK e JNK, que irão fosforilar IRS1 em serina (SHOELSON et al., 2003; OSBORN; OLEFSKY, 2012).

Figura 2 - Ligação entre as vias de sinalização da insulina e inflamação



Ativação da via inflamatória via receptor TLR2/TLR4 e receptor do TNFα, que levam a ativação de Ikkβ e JNK, ativando o IRS1/2 em serina, inibindo a sinalização da insulina. Siglas: Myd88 (Fator de diferenciação mielóide 88); TRIF (Ativador de interferon associado a receptor Toll); IRAK (Cinase associada a receptor de interleucina-1); TRAF2 (Fator 2 associado a receptor de TNF); TRAF6 (Fator 6 associado a receptor de TNF); TAB1 (Proteina ligada a TAK1); TAK1 (Cinase 1 ativada por TGF-β); S6K (Cinase S6) (Osborn; Olefsky, 2012. Nature Medicine).

2.2 Espécies reativas

As espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produtos normais do metabolismo oxidativo, da bioenergética mitocondrial e da função do sistema imunológico. As formas de ROS mais frequentes são ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($OH^{\bullet -}$) e peróxido de lipídios, que estão envolvidos no desenvolvimento, morte e diferenciação celular. As RNS são óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO-). Ambas as espécies reativas podem se ligar a ácidos nucleicos, enzimas, lipídios de membrana e proteínas, promovendo alterações nos processos fisiológicos celulares (GRAVES, 2012; RAJENDRAN et al., 2014; ROLEIRA et al.,2015).

O aumento dessas espécies reativas leva ao estresse oxidativo ou nitrosativo, quando promovido pelas ROS ou RNS, respectivamente, causando sérios danos celulares. As ROS podem promover a peroxidação de lipídios, que leva a patogêneses de várias doenças (RAHAL et al., 2014).

O metabolismo normal da glicose promove a produção de espécies reativas, como o ânion superóxido, via cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Isso é um processo fisiológico que ocorre após as refeições pelo aumento da glicose sanguínea, porém é equilibrado pela defesa antioxidante. No entanto, pacientes diabéticos e pré-diabéticos são mais susceptíveis a estresse oxidativo pós-pradial devido ao prolongado período de exposição a hiperglicemia (TUCKER et al., 2008).

Um consumo alimentar excessivo e crônico contribui para obesidade, que promove um estado inflamatório permanente pela hipertrofia do tecido adiposo branco. Esse aumento no número e no tamanho dos adipócitos estimula a secreção de proteína quimiotática de macrófago (MCP-1), que atrai monócitos para o tecido adiposo e são convertidos em macrófagos. Em camundongos e humanos obesos tem sido observado um aumento da infiltração de macrófagos, chegando a 40% do total de células do tecido adiposo (OSBORN; OLEFSKY, 2012).

Na obesidade, a via pro-inflamatória desses macrófagos é altamente ativada, conduzindo a produção de citocinas, que estimulam o aumento de ROS. Essas citocinas podem agir de forma parácrina ou endócrina, atuando em outros órgãos como: fígado e músculo esquelético. Dieta com alto teor de lipídios pode promover inflamação e estresse oxidativo, levando a sérios danos celulares (LEFRANC et al., 2018).

2.3 Esteatose hepática

A obesidade e resistência à insulina, pode resultar em DM tipo 2, dislipidemias e hipertensão, esse quadro é caracterizado como síndrome metabólica. A síndrome metabólica proporciona um aumento de ácidos graxos livres (AGL) na circulação, e a captação desses AGL pelo fígado é proporcional a sua concentração plasmática, por isso a doença do fígado gorduroso não alcoólica (DFGNA) é considerada uma manifestação clínica da síndrome metabólica (MAHLI; HELLERBRAND, 2016).

A DFGNA é uma doença associada a obesidade caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídios no fígado na ausência do consumo significante de álcool, e afeta aproximadamente 1 bilhão de indivíduos no mundo (JIM; VOS, 2015).

O acúmulo de gordura em qualquer tecido exceto o adiposo recebe o nome de esteatose. A esteatose hepática é considerada benigna quando a presença de gotículas intracelulares de gordura é inferior a 5% dos hepatócitos. Esta pode ser classificada de duas formas dependendo do tamanho das vesículas de lipídios presentes nos hepatócitos. Esteatose microvesicular, sendo os lipídeos armazenados em pequenas vesículas, e macrovesicular, as vesículas são de tamanhos maiores, tendendo a ser uma grande gota intracelular. A esteatose hepática pode progredir para esteato-hepatite não alcóolica (EHNA), fibrose, cirrose e carcinoma hepacelular.

Aproximadamente 5 a 20% dos pacientes com DFGNA progride para EHNA, no entanto, a causa pela qual somente alguns pacientes desenvolvem EHNA ainda permanece desconhecida (BURTET al., 1998; NAGLE et al., 2009; CATTA-PRETA, 2011; WEIB et al., 2014; BROWN; KLEINER, 2015).

A identificação de esteatose hepática e esteato-hepatite é feito através da analise histológica do tecido. Na esteatose há presença de gotas de gordura intracelular em numero igual ou maior a 5% dos hepatócitos, sem evidências de lesão hepatocelular na forma de balonização dos hepatócitos. Já na esteato-hepatite há, além da esteatose, infiltrados celulares inflamatórios nos espaços perivasculares, balonização dos hepatócitos, com presença ou não de fibrose (STEFAN et al., 2018).

Pacientes com resistência à insulina tem 4 a 11 vezes mais riscos de desenvolver DFGNA. Porém, a relação da resistência à insulina e o acúmulo de lipídios no fígado ainda não está bem esclarecida sobre quem vem primeiro. A resistência periférica à insulina pode causar um aumento de lipídios hepáticos, devido

ao aumento de ácidos graxos (AG) no plasma, glicose e insulina, que estimula a síntese de lipídios e prejudica a β-oxidação hepática. Por outro lado, uma alimentação com alto teor de lipídios pode causar resistência à insulina hepática antes de uma resistência à insulina sistêmica (NAGLE et al., 2009).

2.4 Plantas medicinais

As plantas medicinais têm sido utilizadas em diversas regiões do mundo ao longo da história, muitos produtos naturais são e foram usados por longos períodos de tempo, sendo portanto, considerados seguros e eficazes. Eles continuam sendo fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas. Entre 25 e 50% dos medicamentos atualmente comercializados devem suas origens aos produtos naturais (CALIXTO, 2005; KINGSTON, 2011; AKRAN et al., 2014).

A fitoterapia é parte integrante do desenvolvimento da civilização moderna, e vários medicamentos fitoterápicos têm sido prescritos para tratar doenças. Alguns fitoterápicos são utilizados como imunomoduladores, que são agentes naturais ou sintéticos que ao modificar o sistema imunológico, promovem um benefício terapêutico. Dentre fitoterápicos com efeito imunomodulador, podemos citar a *Uncaria tomentosa*, ou popularmente conhecida como “unha de gato”, que faz parte da relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) ao SUS (Figura 3) (ABAJO et al., 2004; AKRAN et al., 2014; BARAYA et al., 2017).

Figura 3 – *Uncaria tomentosa*, unha de gato

remediodaterra.com/unha-de-gato-beneficios-e-propriedades

2.4.1 *Uncaria tomentosa*

O gênero *Uncaria* tem sido alvo de descobertas para produtos medicinais naturais há décadas. É uma planta da família Rubiaceae, nativa da Amazônia Peruana, cujas espécies são encontradas também em regiões tropicais como sudeste da Ásia, África e Sul da América. Foram identificadas 34 espécies, sendo as mais conhecidas: *U. tomentosa, U. rhynchophylla* e *U. attenuata* (RISDALE, 1978).

A *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (Rubiaceae), ou popularmente "unha de gato", é muito usada pelas suas propriedades anti-inflamatórias. O extrato contém uma mistura de glicosídeos de ácido quinóvico, polifenóis e alcaloides, como alcaloides oxindólicos tetracíclicos ou pentacíclicos, tais como: pteropodina, isopteropodina, especiofilina, uncarina F, mitrafilina e isomitrafilina. Esses metabólitos secundários são os responsáveis pelo seu efeito anti-inflamatório (AQUINO et al., 1991; SANDOVAL-CHACÓN et al., 1998; DIETRICH et al., 2015).

A *U. tomentosa* tem sido utilizada na medicina tradicional para tratamento de úlcera gástrica, infecções virais, doenças do trato urinário, câncer, artrite e condições inflamatórias gerais. Alguns estudos relatam que a *U. tomentosa* inibe a produção de

citocinas pró-inflamatórias como TNF-α pela inibição das vias AP-1 e NFκB em monócitos (HARDIN, 2007; ALLEN-HALL et al., 2007; ALLEN-HALL et al., 2010; DIETRICH et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar o efeito do extrato seco da *Uncaria tomentosa* sobre a resistência à insulina, inflamação e esteatose hepática em camundongo C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica e geneticamente obesos (ob/ob).

3.2 Específicos

Para tanto foram realizadas as seguintes análises nos animais acordados e, após a eutanásia, nos fígados e sangue correspondentes:

Nos animais acordados foram avaliados:

- Sensibilidade à insulina e tolerância a glicose;
- Ingestão alimentar, calórica e gasto energético.

Nos fígados foram avaliados:

- Expressão e grau de fosforilação de proteínas da via de sinalização da insulina (IR, IRS-1, AKT);
- Expressão e grau de fosforilação de proteínas da via de sinalização da inflamação (IKK-β, JNK, NF-κB, TNF-α);
- Expressão gênica de mediadores pro-inflamatórios (IL-1β, TNF-α e F4/80) e anti-inflamatórios (IL-10 e Arginase-1);
- Análises morfológicas;
- Marcação de infiltrado inflamatório

Nos fígados e sangue foram avaliados:

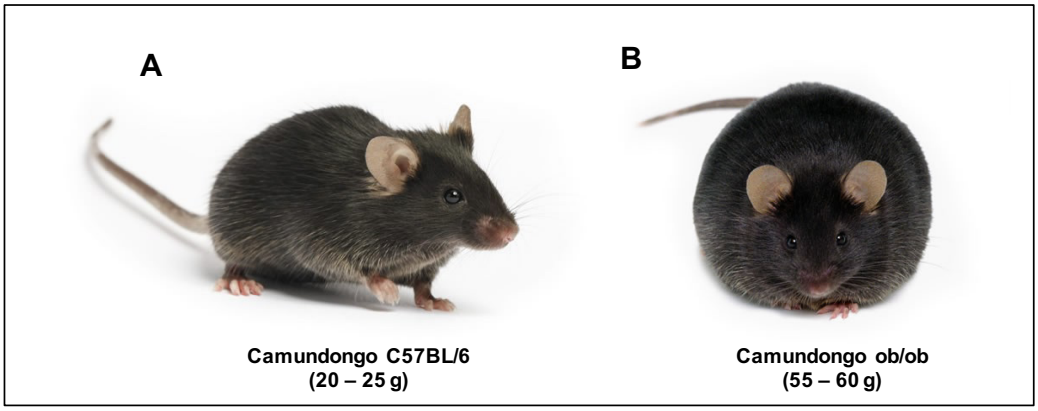
- Estresse oxidativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6 (Figura 4A), pesando 20-25 g (dieta padrão) e 40-45 g (dieta hiperlipídica), foram obtidos do biotério da faculdade de medicina da USP. Os camundongos ob/ob (geneticamente obeso) (Figura 4B), foram obtidos do biotério de camundongos para estudo de neurociência do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pesando 55-60 g. Todos os camundongos foram mantidos em sala com temperatura controlada a 22 ± 2 ºC com acesso *ad libitum* a ração e água, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12h (claro de 6 a.m. – 18h). A dieta padrão (DP) consistiu de ração comercial para roedores (Nuvilab® - CR-1), contendo 19% de proteína, 56% de carboidrato, 3.5% de lipídeos, 5% de celulose e 4.5% de vitaminas e minerais, fornecendo 3.2 kcal/Kg de ração. A composição da dieta hiperlipídica (DH) peletizada correspondeu a 15.8% de proteína, 27% de carboidrato e 57.2% de lipídeos, além de vitaminas e minerais, fornecendo 5.5 kcal/kg de ração (PragSoluções Biociências, Jaú, SP). Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais do *Guidelines for the ethical use of animals in applied etiologys studies* (SHERWIN et al., 2003) e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo: nº 035, nas fls. 30, do livro 03).

Figura 4 – Modelos de camundongos C57BL/6 e geneticamente obesos (ob/ob)

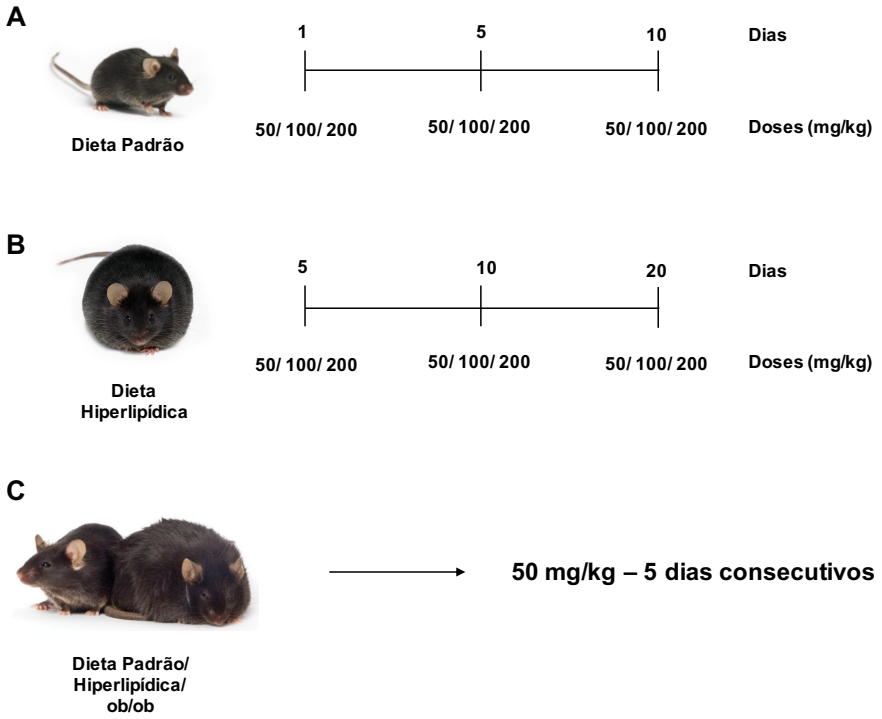


4.2 Tratamento

Inicialmente, foram testadas 3 doses via oral por gavagem (50, 100 e 200 mg/kg ao dia) por 3 períodos distintos (1, 5 e 10 dias consecutivos de tratamento) de *Uncaria tomentosa* (UT) (Herbarium, Paraná, Brasil), nos animais alimentados com DP (Figura 5A). Em seguida foram testadas essas mesmas doses nos tempos de 5, 10 e 20 dias de tratamento com UT em camundongos obesos devido a 12 semanas de dieta hiperlipídica (Figura 5B). A menor dose que teve efeito na melhoria da sensibilidade à insulina foi escolhida para seguir os experimentos (Figura 5C)

A dose de 50mg/Kg corresponde à administrada em humanos (1 comprimidos 3 vezes ao dia, cada um de 100 mg) (REAGAN-SHAW et all, 2007).

Figura 5 – Protocolo experimental para escolha da dose



4.3 Testes de tolerância à insulina (ITT) curto e glicose (GTT)

Os testes foram realizados no período da tarde, após privação de ração, ou jejum, de 6 horas (ANDRIKOPOULOS et al., 2008; AGOUNI, 2010). Foi coletada uma gota de sangue após secção da cauda para mensuração da glicemia basal.

Em seguida, os animais alimentados com DP e DH receberam uma dose de 0,75 mU/g do peso de animal, através de injeção intraperitoneal de insulina regular diluída em salina e os animais ob/ob receberam uma dose de insulina de 3U/kg do peso do animal. Amostras de sangue foram coletadas sequencialmente até 120 minutos para determinação da tolerância à insulina (4, 8, 12, 16, 30, 60, 90, 120 minutos). O período de 4 a 16 minutos foi utilizado para calcular a constante de decaimento da glicose (K_{itt}). Para a realização do teste de tolerância à glicose os animais receberam uma solução contendo glicose via intraperitoneal (1 mg/g de peso corporal) (ZHAO et al., 2011) e foram coletadas alíquotas de sangue nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após infusão de glicose. As glicemias foram mensuradas utilizando fitas reativas (Roche®) e aparato de leitura das fitas (Accu-chek Active Roche, Mannheim, Alemanha). A constante de decaimento da glicose foi calculada pela fórmula 0,693/t½, onde t½ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear de decaimento da glicose plasmática detectada nos tempos 4 a 16 minutos após infusão de insulina (BONORA et al., 2000).

A insulina foi medida por kit de Elisa, ELM-insulin-1, conforme recomendações do fabricante (RayBiotech, USA).

4.4 Análises da Ingestão alimentar, gasto energético e índice de massa corpórea

Foi utilizado um sistema de monitoramento animal (Columbus Instruments CLAMS) (Figura 6) para determinar o consumo alimentar e gasto energético. Os animais permaneceram no sistema durante 7 dias, sendo 2 o período de aclimatação e 5, o período de tratamento com *Uncaria tomentosa*, nesses dias foram avaliados o consumo alimentar, de oxigênio (VO_2) e produção de gás carbônico (VCO_2). Depois os animais foram retirados do sistema e foi aferido peso corporal (g) e o comprimento naso-anal (cm) para calcular o Índice de Massa Corporal (IMC=$g.cm^{-2}$).

Figura 6 – Sistema de monitoramento animal para gasto energético

http://www.colinst.com/products/clams-comprehensive-lab-animal-monitoring-system

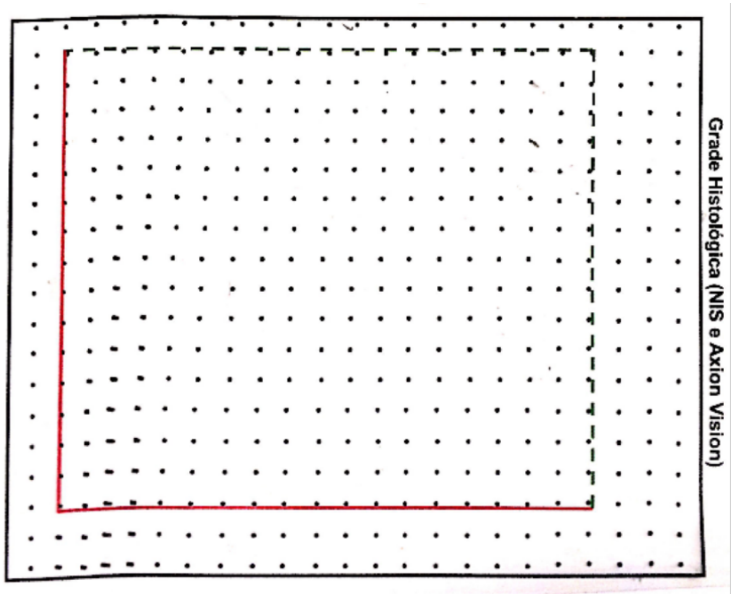
4.5 Análises morfológicas

4.5.1 Coloração H & E

Um fragmento de fígado (lóbulo superior esquerdo) foi fixado em solução de formaldeído 10%, durante 8 horas. Ao término do período de fixação, os fragmentos foram armazenados em cassetes (individuais) e mantidos em solução de álcool 70% *overnight*. Posteriormente, o material foi submetido a uma sequência de banhos com álcool 95%, álcool 100% e xilol. Ao término dos banhos, o material foi incluído em parafina, a uma temperatura de 60ºC. Os cortes foram realizados em micrótomo (Zeiss), com espessura de 5µm. Após disposição em lâminas de microscopia, foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação das gotículas de gordura no fígado, visualização da arquitetura do tecido e presença de infiltrados

celulares inflamatórios nos espaços vasculares. As imagens (20 de cada animal) foram obtidas utilizando um microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 20X, com câmera digital Nikon DS-Ri1 e NIS-Elements BR 3.1 software. As imagens foram projetadas em um monitor LCD de alta resolução, um sistema teste com 270 pontos (P_T) (Figura 7) foi fixado no monitor, cada ponto individual (P_I) que ficava sobre as gotículas de gordura era contado. Após essa contagem foi feita uma relação de P_I/P_T, essa relação gerou uma densidade de volume de esteatose hepática (Adaptado de CATTA-PRETA, 2011).

Figura 7 – Sistema teste com 270 pontos

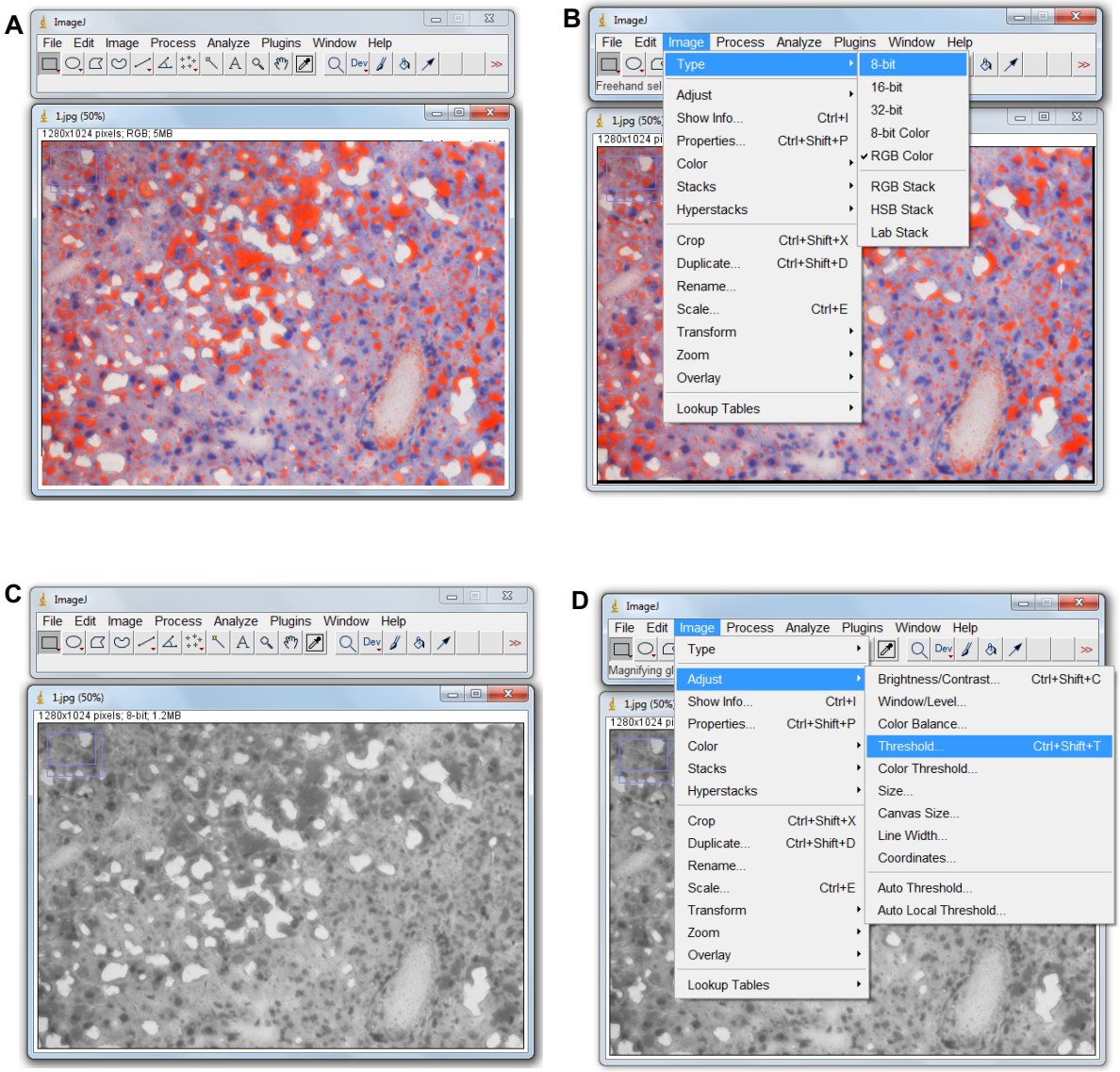


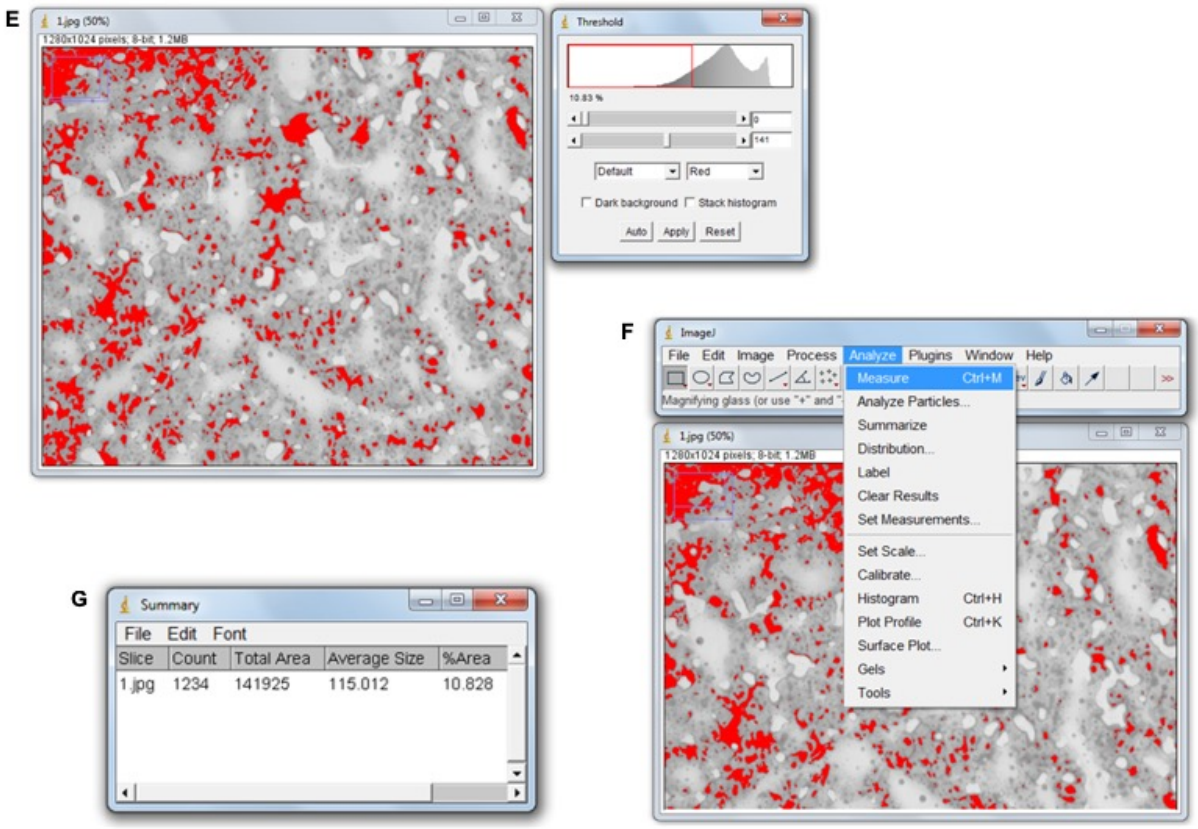
4.5.2 Coloração OilRed O (ORO)

Fragmento de fígados foram embebidos em um molde com *tissue-tek* (Thermo Scientific), imediatamente após foi colocado em um recipiente contendo álcool isopropanol e congelado em nitrogênio líquido (N_2). Depois foi cortado no criostato (Microm H560). Foram feitos cortes de 12 µm e acomodados três cortes, de diferentes partes do tecido, por lâmina (duas lâminas por animal). As lâminas foram coradas com ORO (5 minutos), em seguida lavadas em água corrente (30 minutos), e contra coradas com hematoxilina de Harrys (5 minutos), depois lavadas em água corrente (5

minutos). As imagens (10 de cada animal) foram obtidas utilizando um microscópio Nikon Eclipse Ti-U na objetiva de 20X, com câmera digital Nikon DS-Ri1 e NIS-Elements BR 3.1 software. Essas imagens foram projetadas em um monitor LCD de alta resolução. A quantificação do acúmulo de gordura no tecido foi realizada através do programa Image J (Figura 8)

Figura 8 – Passo-a-passo para quantificar gotículas de gordura





A imagem foi aberta no programa (**A**), convertida em escala de cinza 8-bit (*Image → type → 8-bit*) (**B** e **C**). Depois foi realizada a seguinte sequência: *Image → Adjust → Threshold* (**D** e **E**); *Analyse → Set measurements* (**F**), quando esse recurso foi aberto apareceu uma caixa, que foi marcado limite do *Threshold*, área e densidade integrada. Os resultados foram obtidos através de *Analyse → Measure* (Mehlemet al., 2013). Foram utilizados como resultado os valores das áreas, que correspondia a quantidade de gordura no tecido (**G**).

4.5.3 Coloração Picrosirius e Tricômio de Masson

As lâminas foram submetidas as colorações Picrosirius e Tricômio de Masson para identificar fibras colágenas. Os cortes foram corados com Picrosirius (30 minutos) e depois lavadas com água correntes, a coloração vermelha representava a deposição de colágeno. A coloração com Tricômio de Masson foi realizada com um kit comercial da EasyPath (São Pailo, Brasil) e seguindo as informações fornecidas pelo fabricante. O kit contém 5 reagentes: A e B – hematoxilina férrica de Weigert (10 minutos), C – Fucsina (2 minutos), D – Ácido fosfomolíbdico (5 minutos), E – Azul de anilina (5 minutos). Os resultados eram interpretados de acordo com a coloração, núcleo foi

corado de preto, citoplasma de vermelho e colágeno de azul.

Foram visualizadas 25 imagens (campos), 3 cortes diferentes de animais por grupo (n=5), usando objetiva de 20x. A presença de fibras colágenas foi identificada nos espaços porta-hepáticos e feito um cálculo dos espaços-portas que apresentaram a deposição de colágeno em relação a quantidade de espaço-porta total de cada animal por grupo. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.6 Avaliação da expressão e atividade de proteínas - Western Blot

Depois do tratamento e realização do ITT, os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg/kg) e, após confirmação da anestesia foram submetidos à eutanásia por decapitação. A coleta de amostras para análise da intensidade do grau de fosforilação de proteínas induzido pela insulina foi realizada em animais anestesiados antes da eutanásia. Nestes casos, após abertura da cavidade abdominal, foi retirado um fragmento do fígado, que correspondeu a amostra basal ou não estimulada com o hormônio (-), em seguida foi injetada uma dose de insulina (10^{-5} M) na veia porta-hepática, e após 30 segundos foi retirado outro fragmento, que foi identificado como amostra estimulada (+). O fígado do animal foi retirado e homogeneizado em tampão contendo Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml utilizando Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, USA). Os homogenatos teciduais foram centrifugados a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após centrifugação, os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo proteico quantificado utilizando o reagente de Bradford (BioRad, USA) e receberam tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1 (V:V). Cinquenta µg de proteínas totais foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10% e 6,5%) no aparelho para minigel BioRad (USA). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, por meio de um aparelho (BioRad, USA) por 2 h a 120 V, como descrito por Towbin et al. (1992). A ligação inespecífica de proteínas na

membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) em temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação. Estas membranas foram incubadas com anticorpos específicos para as proteínas da via de sinalização da insulina, IR (3025S, Cell Signaling); P-insulin receptor B (3026s, Cell Signaling); IRS-1 (06-248, Upstate); pTyr (9411s, Cell Signaling); AKT (126811, Abcam); AKTp (7985-R, Santa Cruz); IRS1pSer^{307} (07-247, Upstate); inflamação, JNK (252355, R&D Systems); JNKp (6254, Santa Cruz); Ikkβ (725818, R&D Systems); Ikkβp (5176, Cell Signaling); NFkB p65 (8242S, Santa Cruz); NFkBp (3031S, Cell Signaling); TNFα (3707s, Cell Signaling) em solução bloqueadora (3% de BSA) durante a noite a temperatura de 4ºC. As membranas foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por uma hora a temperatura ambiente seguida de solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit comercial. A emissão de luz foi detectada e captada pelo sistema de detecção Amersham Imager 600 (Life Science, USA) e as intensidades das bandas na revelação foram determinadas através da leitura por densitometria óptica das imagens utilizando-se o programa Image J 1.43u (National Institute of Health, USA) (imagej.net/Downloads).

4.7 Avaliação da expressão gênica - Reação em cadeia da polimerase (PCR) – qPCR

Cinquenta mg do fragmento hepático extraído foi homogeneizado em 1 mL de Trizol (Life Technologies) para extração do RNAm. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente (25ºC) o homogenato foi acrescido de 200 µL de clorofórmio, deixado em repouso por 15 min a temperatura ambiente e subsequentemente centrifugado por 15 min a 2ºC a 12000 rpm. A fase aquosa, que contém o RNA, foi separada, acrescida de 500 µL de isopropanol e armazenada no freezer a -20ºC por 1 h. Após essa etapa a amostra foi submetida a centrifugação por 10 min a 4ºC a 12000 rpm e submetida a um processo de lavagem. Resumidamente, o sobrenadante foi descartado, ao precipitado foi adicionado 1 mL de álcool 75%, centrifugado por 10 min a 4ºC a 12000 rpm, repetindo-se essa etapa duas vezes. O precipitado foi dissolvido/suspenso em 50 µL de água livre de RNAse. A leitura da concentração de RNA foi avaliada a 260 nm e a pureza a partir da relação 260/280 nm no aparelho Nanodrop (DeNovix). A partir dessa extração, foi preparado o cDNA através da reação

de transcrição reversa utilizando-se kit comercial (High-Capacityc DNA kit, Applied Biosystems). Foi preparado uma mistura contendo os componentes: tampão RT 10x, mixdNTP 25x 100 Mm, *primers* RT 10x, transcriptase reversa, inibidor de RNAse, água livre de RNAse, e adicionado a amostra, conforme orientação do fornecedor do kit comercial. A amostra foi levada ao termociclador. A expressão gênica foi analisada por PCR em tempo real quantitativa a partir dos valores de $\Delta\Delta$ct (Rotor Gene Q - Qiagen) (Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix UDG, Invitrogen). O constitutivo utilizado foi o beta-2-microglobulina (B2M).

As sequências de *primers* utilizadas foram:

Arginase 1	*sense*	5'GGAAGAGTCAGTGTGGTGGTGC3'
	anti-sense	5'CAGGAGAAAGGACACAGGTTGC3'
B2M	*sense*	5'CCCCACTGAGACTGATACATACG3'
	anti-sense	5'CGATCCCAGTAGACGGTCTTG3'
IL 10	*sense*	5'TGCCAAGCCTTATCGGAAATG3'
	anti-sense	5'AAATCGATGAGAGCGCCTCAG3'
IL 1β	*sense*	5'GGCAGCTACCTGTGTCTTTCCC3'
	anti-sense	5'ATATGGGTCCGACAGCACGAG
F4/80	*sense*	5'CCTGAACATGCAACCTGCCAC3'
	anti-sense	5'GGGCATGAGCAGCTGTAGGATC3',

As análises da expressão gênica foram realizadas usando um método descrito por Livak e Schmittgen (2001) e Pfaffl (2001).

4.8 Avaliação da expressão de F4/80 – Imuno-histoquímica (IHC)

O fígado foi fixado em solução de formaldeído a 10%, durante 8 horas. Ao término do período de fixação, os fragmentos foram armazenados em cassetes individuais e mantidos em solução de álcool 70% *overnight*. Posteriormente, o material foi submetido a uma sequência de banhos com álcool 95%, álcool 100% e xilol. Ao término dos banhos, o material foi incluído em parafina, a uma temperatura de 60ºC. Os cortes foram realizados em micrótomo (Zeiss), com espessura de 5µm e desparafinizados em xilol e reidratados em etanol (100-75%). A recuperação antigênica foi realiza por aquecimento (98 ºC) em tampão citrato de sódio 10 mM

contendo Tween 20 0,05% (pH 6.0, 10 min) e a peroxidase endógena foi bloqueada por H_2O_2 1% (v/v) em tampão PBS (22 ºC, 45 min). Cada uma das etapas posteriores foi seguida por lavagem das amostras em tampão PBS (100 mL, 5 minutos), exceto antes da incubação com o anticorpo primário, feito em câmara úmida. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com o soro de cabra (doador do anticorpo secundário) diluído em PBS (1:1) contendo 10% de albumina do soro bovino (Sigma, St. Louis, MO) por 1 h à temperatura ambiente (22ºC). Em seguida, os cortes foram incubados durante toda a noite com o anticorpo primário policlonal anti-F4/80 (Bio-Rad AbD Serotec, UK) diluído em PBS (1:200) contendo 0,3% de Tween 20 a 4ºC. Adiante, os cortes foram incubados por 1 h com o anticorpo secundário de coelho conjugado com imunoperoxidase (1:1000) (Sigma-Aldrich, USA) diluído em PBS, em temperatura ambiente. Afim de amplificar a reação de imunoperoxidase, foi feita incubação com o complexo estreptavidina de um kit comercial (Vectastin ABC Kit; Vector Laboratories, USA) por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada uma gota de 3-3'-diaminobenzidina 0,3% (Pierce, Rockford, EUA) em PBS com H_2O_2 (0,03%, v/v), deixado incubar por 3 min e os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratadas e dispostas sob as lâminas. As imagens foram selecionadas e fotografadas com o auxílio de microcópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japão) acoplado à câmera digital Olympus DP-72 (Olympus, Japão). A área imunomarcada foi analisada com o programa de imagem *Image Pro Plus 4.5* (Media Cybernetics Co., Bethesda, MD, EUA). Pelo menos 5 áreas por lâmina foram selecionadas. Para garantir a comparação entre as secções, todas a configurações para obtenção das imagens (tempo de exposição e iluminação) foram mantidas constantes. A expressão de F4/80 foi calculada da seguinte maneira: a área total da imagem foi demarcada e medida. A área ocupada por células expressando F4/80 foi quantificada dentro da área delimitada. Um filtro de cores pré-estabelecidas foi aplicado à área selecionada. O resultado foi expresso como porcentagem de área positiva em relação à área total.

4.9 Avaliação do estresse oxidativo

4.9.1 Reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs)

A determinação dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) determina a quantidade de peroxidação lipídica mediante a quantificação dos aldeídos formados pela degradação de hidroperóxidos, incluindo o malondialdeído (MDA). O método empregado foi de acordo com Conti e colaboradores (1991) que utiliza uma curva padrão de MDA e leitura realizada em fluorímetro com λexc 530nm e λem 590 nm.

As amostras de fígado foram pesadas (~50 mg) em microtubo de 1,5 mL e homogeneizadas em 200 µL de solução de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,4 contendo butil hidroxitolueno 2 mM (BHT). Para as amostras de soro, uma alíquota de 20 µl foi misturada a 180 µl de tampão fosfato + BHT. Em seguida, 400 µL de solução ácida (contendo TBA 0,37%, ácido tricloroacético 15% e ácido clorídrico 0,25 N) foram adicionados em cada tubo e então incubados em estufa à 90°C durante 45 minutos. No final da incubação, os tubos foram colocados em gelo por 5 min e 300 µL da reação foram transferidos para outro tubo contendo 300 µL de butanol e 30 µL de solução saturada de NaCl. Os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 30 segundos e em seguida, centrifugados a 10.000 g durante 5 minutos. Finalmente, 200 µL dos sobrenadantes (fase superior orgânica) foram pipetados em microplaca escura e a leitura de fluorescência foi realizada em λexc 530nm e λem 590 nm. Em paralelo, uma curva padrão foi feita pela hidrólise do composto 1,1,3,3, tetrametoxipropano (TMP) com concentrações de 0,003 a 25 uM em tampão fosfato contendo BHT. Os resultados foram expressos como nmol de equivalentes de MDA/mg de tecido ou por ml de soro.

4.9.2 Análise da expressão de resíduos proteicos de nitrotirosina (NT) e de proteínas carboniladas - Método de SLOT BLOT

As amostras de fígado (~50 mg) foram homogeneizadas em 500 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de PMSF e em seguida, centrifugadas a 1000g e 4°C por 5 minutos. Amostras de soro foram diluídas 1:100 com o mesmo tampão. A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada através do método de Bradford (1976) e em seguida, foram então diluídas em tampão de homogeneização para a concentração de proteínas de 12,5 µg/ml.

4.9.2.1 *Análise de proteínas nitradas em resíduos de tirosina*

Duas e meio µg de proteína total dos homogenatos teciduais (ou 200 µL do soro) foram aplicadas em membrana de nitrocelulose através do sistema Slot Blot (BIO DOT SF – BioRad) utilizando-se vácuo. As membranas foram então coradas com solução de vermelho de Ponceau e fotografadas a fim de verificar-se a eficiência da transferência. As membranas foram descoradas em tampão TBS-t (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl, pH 7,4, contendo 0,2% de Tween-20) e em seguida incubadas com solução de albumina de soro bovino em TBS-t (BSA 3%) para bloqueio de sítios inespecíficos, por uma hora, sob agitação contínua. Após este período, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-nitrotirosina (camundongo) na diluição de 500 ng/mL em BSA 3%, durante 16 hs sob agitação contínua a 18°C. As membranas foram lavadas com TBS-t e incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 em BSA 1,5% por duas horas. As membranas foram posteriormente lavadas com TBS-t e as bandas imunoreativas foram reveladas por quimiluminescência e detectadas num sistema Image Doc (Bio Rad, EUA). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria, empregando-se o software Image J 1.43u (National Institute of Health, USA) (imagej.net/Downloads). Os resultados foram normalizados pela densitometria das respectivas bandas quando coradas com Ponceau.

4.9.2.2 Análise de proteínas carboniladas

Duas e meio µg de proteína total dos homogenatos teciduais (ou 200 µL do soro) foram aplicados em membrana de PVDF através do sistema Slot Blot (BIO DOT SF – BioRad) utilizando-se vácuo. A membrana de PVDF foi previamente ativada com 10 mL de metanol durante 1 min e em seguida, em solução metanol 20% + TBS 80% (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4) por 5 min. Após a transferência das amostras, a membrana foi lavada em metanol durante 1 min e em seguida foi corada com vermelho de Ponceau e fotografadas. A membrana foi lavada 3 x em solução metanol 20% + TBS 80% para retirar o corante de Ponceau. Em seguida, a membrana foi incubada com HCl 2N por 5 min e a reação de derivatização iniciada pela adição de solução de DNPH 0,1 mg/mL (2,4- dinitrophenylhydrazine previamente preparada em HCl 2N) por exatamente 5min. Depois, foi lavada 3 vezes em HCl 2N por 5 min; 3

vezes em metanol 100% por 5 min e finalmente bloqueada com BSA 3% em TBS-t (TBS contendo 0,2% tween-20) por 1 h. A incubação com anticorpo primário anti-DNP foi realizada “overnight” a 18°C (1:25.000 em tampão de bloqueio, Abcam, UK). A seguir, a membrana foi lavada com TBS-t e incubada com o anticorpo secundário anti coelho conjugado com peroxidase (Bio Rad, EUA) na diluição de 1:10.000 em BSA 1,5% por duas horas. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS-t e as bandas imunoreativas foram reveladas por quimiluminescência e detectadas em sistema Image doc (Bio Rad, EUA). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria, empregando-se o software Image J 1.43u (National Institute of Health, USA) (imagej.net/Downloads). Os resultados foram normalizados pela densitometria das respectivas bandas quando coradas com Ponceau. Em paralelo, uma membrana foi processada sem a reação de derivatização (não foi incubada com DNPH, somente com o HCl 2N) para excluir qualquer marcação inespecífica (ROBINSON et al., 1999).

4.10 Análise Estatística

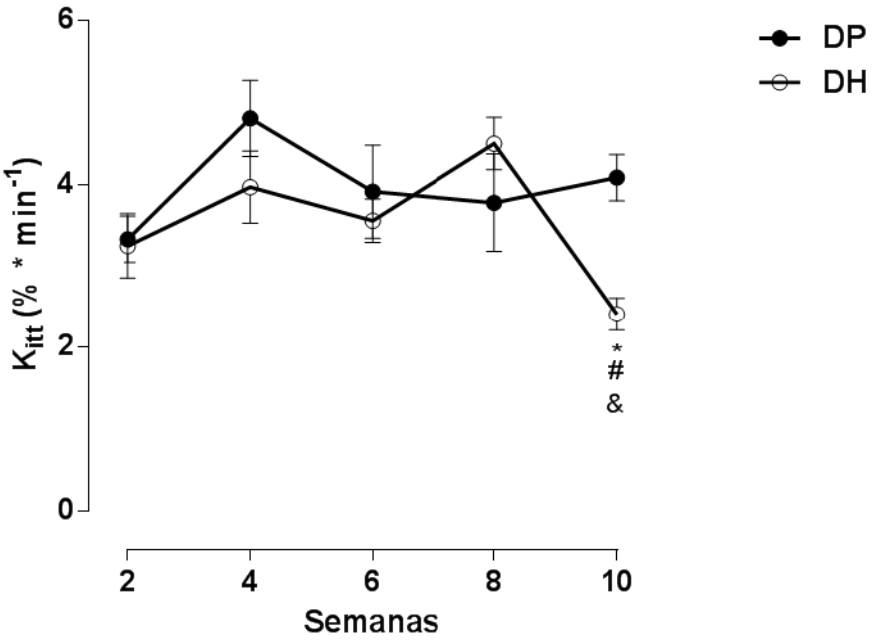
Os resultados foram analisados por meio do programa *GraphPad Prism versão 6.0®* (*GraphPad Software*, La Jolla-CA, USA). O tamanho amostral mínimo por grupo para cada parâmetro analisado foi definido através do *n* suficiente para realização da análise da distribuição das amostras através do *D’Agostino and Pearson omnibus normality test* recomendado pelo programa GraphPad Prism versão 6.0®. Todas as variáveis estudas nessa tese tiveram as amostras avaliadas quanto à distribuição normal e em seguida submetidas à análise estatística de variância ANOVA *one-way* ou *two-way*. Quando o teste apresentou diferença significativa foi seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni (Bonferroni Multiple Comparison Test), conforme sugerido pelo próprio programa ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (M ± EPM).

5 RESULTADOS

5.1 Dieta hiperlipídica promove resistência à insulina

A fim de confirmar a resistência à insulina, camundongos alimentados com a dieta hiperlipídica (DH) tiveram medidas as constantes de decaimento da glicose (K_{itt}) após 2, 4, 6, 8 e 10 semanas do inicio da dieta. Enquanto os animais alimentados com a DP mantiveram esse índice semelhante ao longo dessas 10 semanas (média de 4,0 ± 0,2% *min^{-1}), os alimentados com a DH apresentaram redução do K_{itt} a partir de 10 semanas (3,5 ± 0,3% *min^{-1}) (Figura 9).

Figura 9 – Evolução da tolerância à insulina medida pelo Kitt em camundongos alimentados por dieta hiperlipídica (DH) e a correspondente dieta padrão (DP). Os animais tinham idade inicial de 8 semanas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (DP2 *vs.* DH10), $^{\#}p < 0,05$ (DH2 *vs.* DH10), $^{\&}p < 0,001$ (DH4 *vs.* DH10), (n = 5).

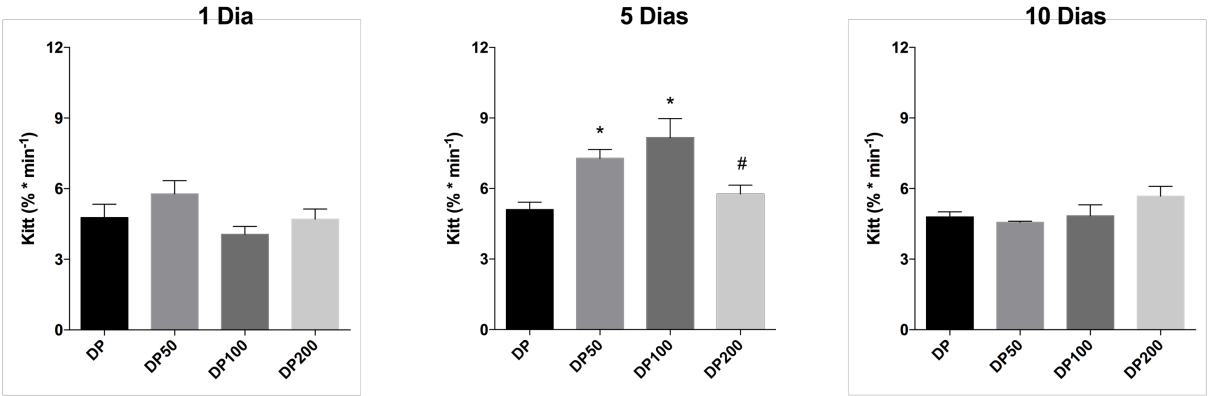
5.2 Dose resposta e efeito tempo dependente de administração de extrato de *Uncaria tomentosa* sobre a sensibilidade à insulina de animais alimentados com dieta padrão e hiperlipídica

Foram avaliadas 3 doses de extrato de *Uncaria tomentosa,* 50, 100 e 200 mg/kg de massa corporal, uma vez ao dia via oro-gástrica (gavagem). Além disso, avaliamos 3 períodos de tratamento, 24 horas após a última dose. Nos controles foram avaliados

após: um dia (dose única), 5 dias e 10 dias consecutivos de administração. Os animais com resistência à insulina induzida pela dieta foram avaliados após 5, 10 e 20 dias de tratamento com as mesmas doses do extrato.

O K_{itt} dos animais alimentados com dieta padrão (DP) foi de 4,8 ± 0,6 % * min^{-1}. A administração em dose única do extrato não induziu modificação nesse índice para qualquer uma das 3 doses avaliadas (DP50: 5,8 ± 0,5 % *min^{-1}; DP100: 4,1 ± 0,3 % *min^{-1} e DP200: 4,7 ± 0,4 % *min^{-1}) (Figura 10A). Por outro lado, o tratamento por 5 dias consecutivos induziu aumento de aproximadamente 55% ($p<0,05$) do K_{itt} com as doses de 50 e 100 mg/kg quando comparadas ao grupo controle, sem diferença com a dose de 200 mg/kg (Figura 10B). No entanto, o tratamento por tempo maior, 10 dias consecutivos não modificou essa constante (Figura 10C).

Figura 10 – Teste de tolerância à insulina em animais alimentados com dieta padrão tratados com doses diárias (50, 100 e 200 mg/kg) por 1, 5 e 10 dias consecutivos do extrato de *Uncaria tomentosa.*



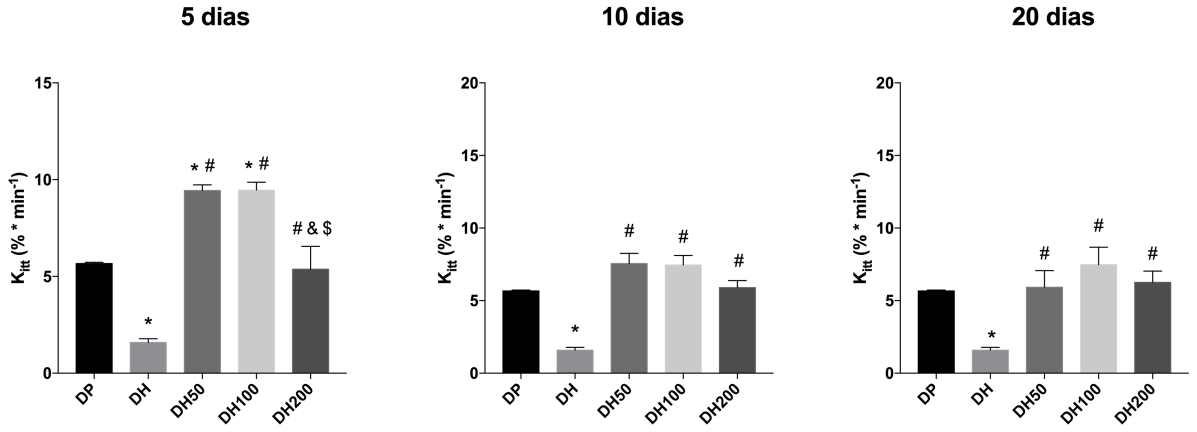
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados a DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparado a DP200), (n = 5).

Nos animais com resistência à insulina devido a DH (K_{itt}: 1,6 ± 0,2% *min^{-1}) , o uso do extrato foi capaz de aumentar a sensibilidade ao hormônio para aproximadamente 3 e 6 vezes ($p<0,05$) o detectado em todos os tempos de tratamento (Figura 11).

A partir desses dados foi escolhida a dose 50 mg/kg de massa corporal do fitoterápico por 5 dias consecutivos. Essa dose corresponde a menor que fez efeito

em menor tempo de tratamento.

Figura 11 – Teste de tolerância à insulina em animais alimentados com dieta hiperlipídica tratados com doses diárias (50, 100 e 200 mg/kg) por 5, 10 e 20 dias consecutivos do extrato de *Uncaria tomentosa*



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "one-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados a DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparados a DH), $^{\&}p < 0,05$ (comparado a DH50), $^{\$}p < 0,05$ (comparado a DH100) (n = 5).

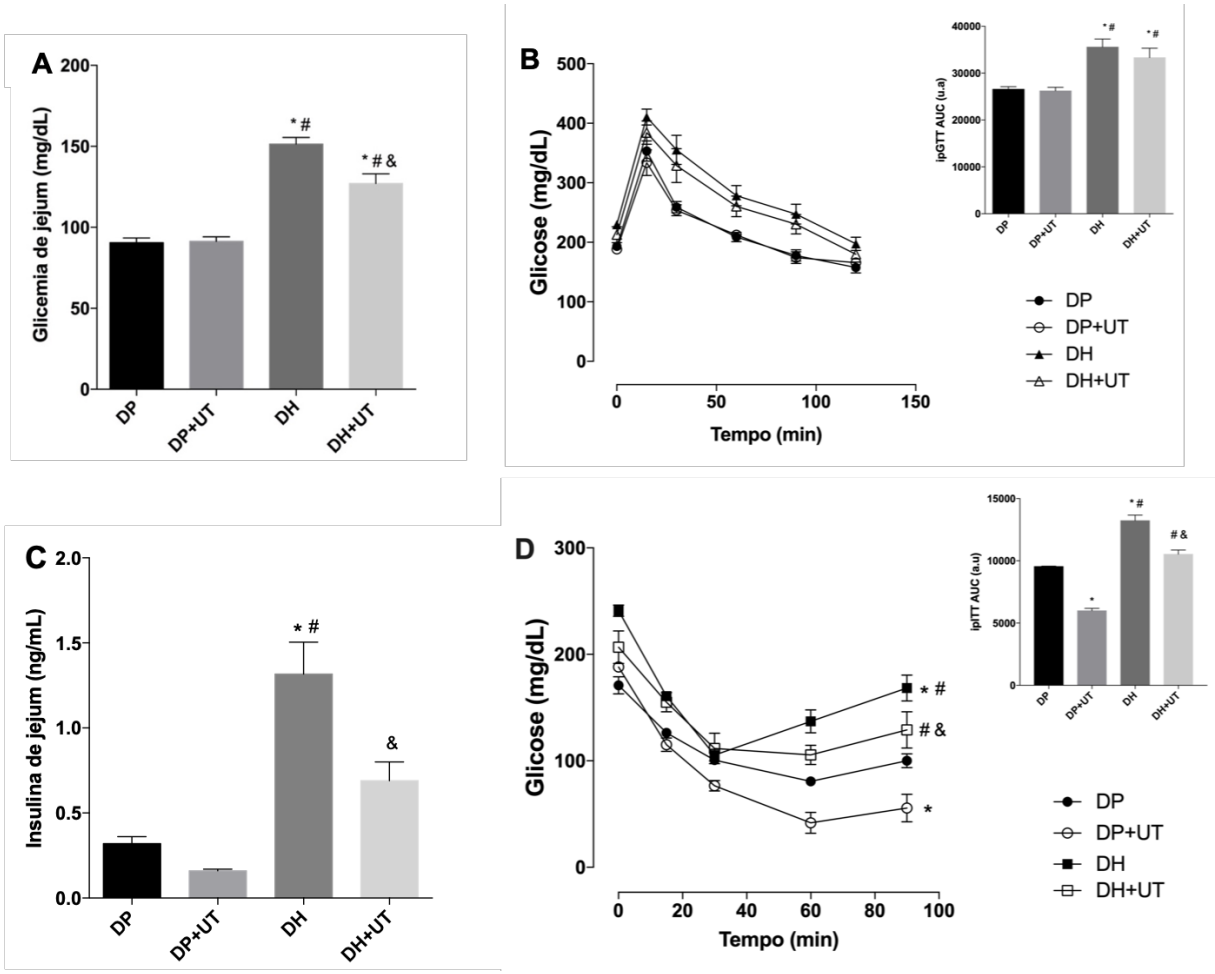
5.3 *Uncaria tomentosa* reduz glicemia e insulinemia de jejum e melhora tolerância à glicose em animais alimentados com dieta hiperlipídica e geneticamente obesos

A glicemia de jejum dos animais alimentados com DH (151 ± 4 mg/dL) foi reduzida em cerca de 15% após o tratamento com a *Uncaria tomentosa* (127 ± 6 mg/dL, p<0,05) (Figura 12A). Ademais, a elevada insulinemia desses mesmos (DH: 1,3 ± 1,2 ng/mL *vs.* DP: 0,2 ± 0,04 ng/mL, p<0,05) foi reduzida para 54% (0,7 ± 0,1 ng/mL, p<0,05) (Figura 12C).

A reduzida tolerância à glicose do grupo DH, representada pelo aumento da área sobre a curva (DH: 34354 ± 1358 *vs.* DP: 26361 ± 875 e DP+UT: 25231 ± 755, p<0,05) não foi modificada após o uso do fitoterápico (DH+UT: 34735 ± 1748) (Figura 12B).

A sensibilidade à insulina medida pelo teste tolerância a insulina (ITT) confirmou os dados observados na dose resposta (Figuras 10 e 11), ou seja, o uso do fitoterápico reduz a glicemia tanto nos controles (DP) quanto nos alimentados com a DH (Figura 12D).

Figura 12 – Glicemia de jejum (12 h), GTT, insulinemia e ITT de animais alimentados DH tratados com doses diárias de 50 mg/kg do extrato de *Uncaria tomentosa* durante 5 dias consecutivos.



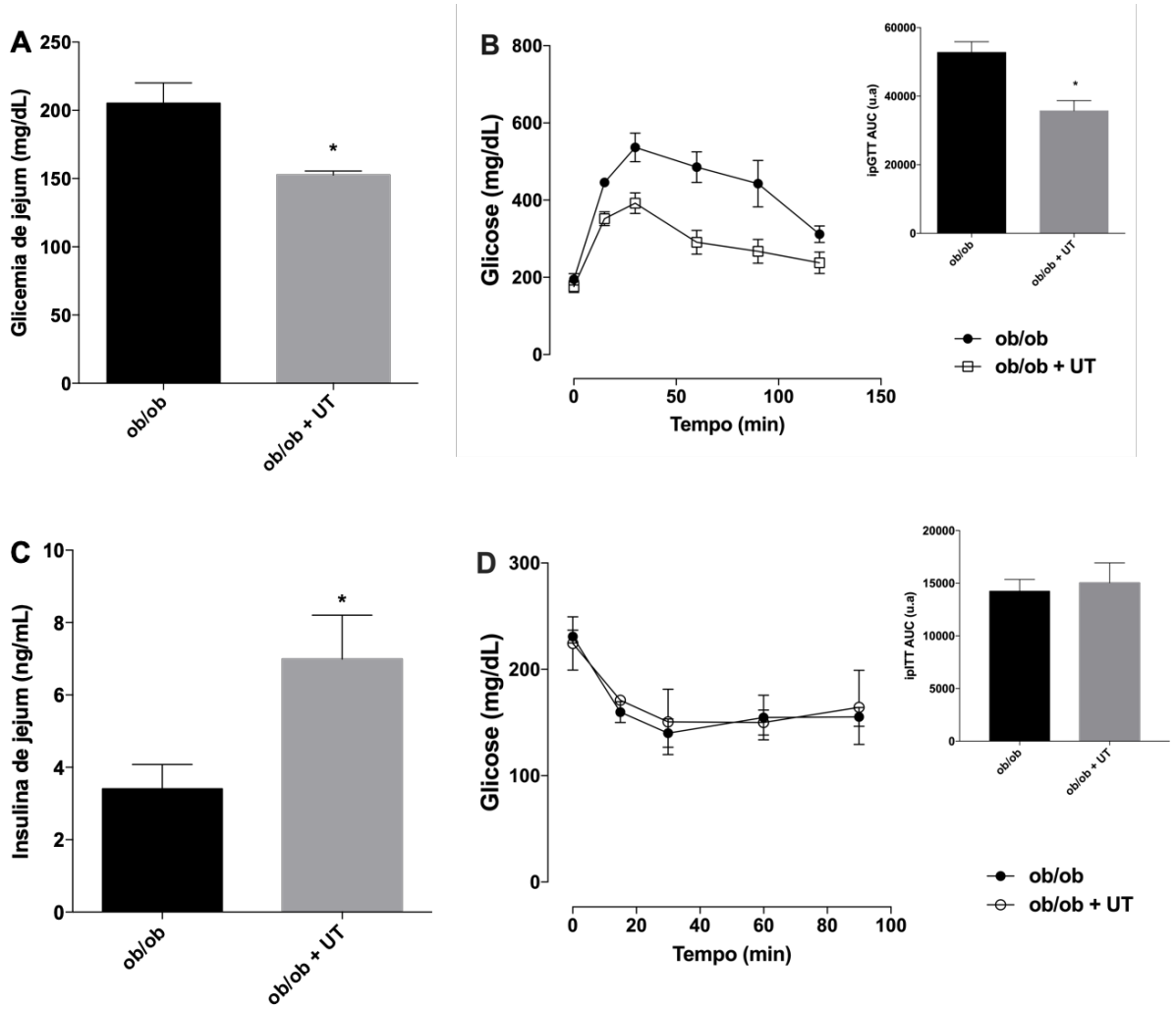
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados a DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparados a DP+UT), $^{\&}p < 0,05$ (comparados a DH), (n = 10).

Nos animais hiperglicêmicos ob/ob o tratamento com UT induziu redução da glicemia (205 ± 15 *vs.* 164 ± 11 mg/dL, p<0,05) (Figura 13A). Essa modificação foi acompanhada de aumento da insulinemia (3,4 ± 0,7 *vs.* 7,0 ± 1,2 ng/mL, p<0,05) (Figura 13 C).

A tolerância à glicose foi aumentada nos animais ob/ob tratados com o fitoterápico, representada pela redução da área sob a curva do GTT (35730 ± 2969 *vs.* 52759 ± 3120, p<0,05) (Figura 13B).

A sensibilidade à insulina medida pelo ITT não mostrou diferença estatística significante entre os grupos (Figuras 13D).

Figura 13 – Glicemia de jejum (6h), GTT, insulinemia e ITT de animais ob/ob tratados com dose de 50 mg/kg do extrato de *Uncaria tomentosa* durante 5 dias consecutivos.



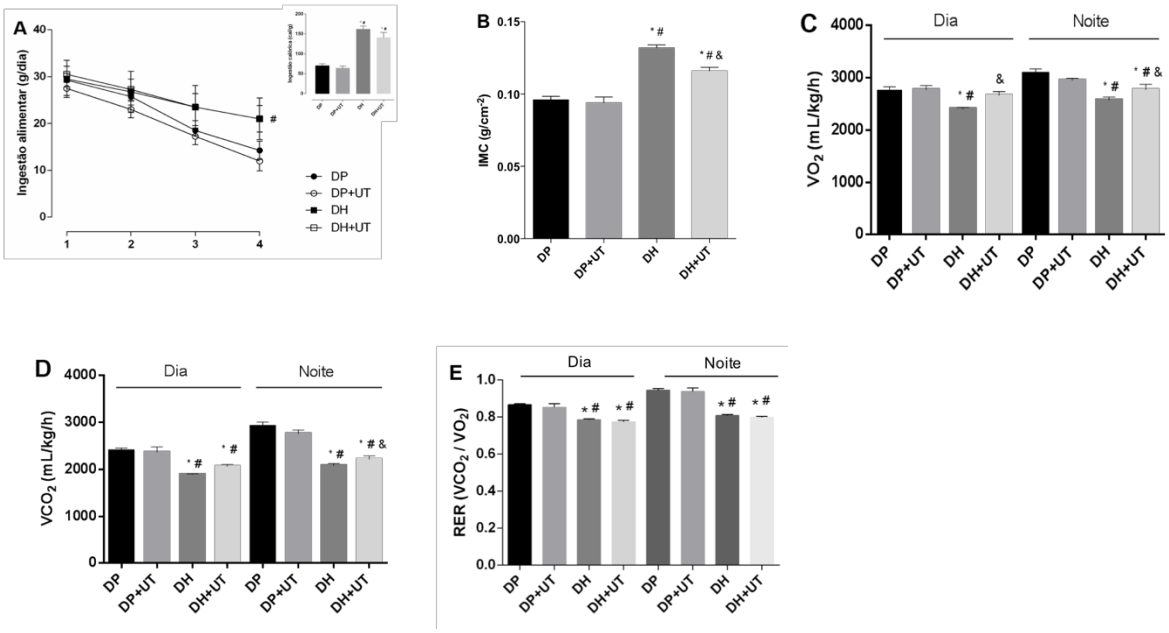
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. *Teste t*, $^{*}p < 0,05$ (ob/ob *vs.* ob/ob +UT), (n = 4 - 5).

5.4 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre ingestão alimentar, massa corporal, consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e ritmo de troca respiratória (RER)

O consumo alimentar foi aumentado no grupo DH (29,4 ± 1,5 g) em relação ao grupo DP+UT (19,9 ± 1,8 g) ($p<0,05$), porém não diferiu do grupo DP (21,9 ± 1,5 g) (Figura 14A), o grupo DH+UT não teve diferença significante do DH. Acompanhando esse efeito, a ingestão calórica do grupo DH foi maior do que o grupo DP ($p<0,05$). O tratamento com UT não induziu diferença significante com o grupo DH (162 ± 8,1 vs.

141 ± 12,9 cal/g). Como esperado, o índice de massa corpórea (IMC) foi maior no grupo DH (0,13 ± 0,002 g/cm^2) e DH+UT (0,11 ± 0,002 g/cm^2) quando comparado aos grupos DP (0,09 ± 0,002 g/cm^2) e DP+UT (0,09 ± 0,004 g/cm^2)($p<0,05$), porém o uso da UT induziu redução de aproximadamente 22% na massa corporal nos obesos devido a DHL (DH+UT) ($p<0,05$) (Figura 14B). Os animais do grupo DH apresentaram um menor gasto energético, com redução de 13 e 17% no VO_2 e 21 e 29% no VCO_2 nos períodos diurnos e noturnos, respectivamente, comparados aos grupos DP (100%, $p<0,05$). O tratamento com UT induziu aumento nesse gasto energético em 9 e 7% no VO_2 e em 7 e 5% no VCO_2, tanto na fase diurna quanto noturna respectivamente (Figura 14C e D). O coeficiente de troca respiratória (RER) dos animais alimentados com DH foi reduzido em 11% em ambos os períodos e o tratamento com UT não apresentou nenhum efeito adicional (Figura 14E).

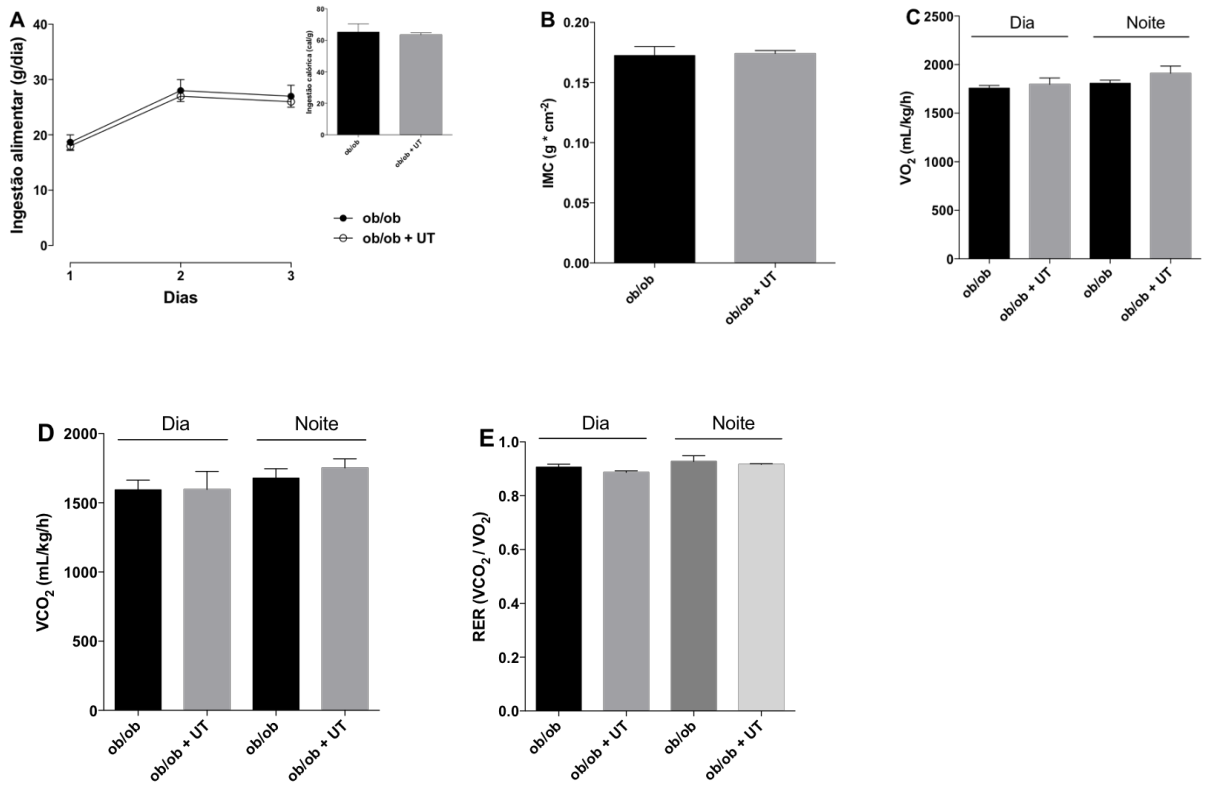
Figura 14 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre parâmetros metabólicos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p< 0,05$ (comparados a DP) $^{\#}p < 0,05$ (comparados a DP+UT) $^{\&}p< 0,05$ (comparados a DH), (n = 4 – 5).

O consumo alimentar e calórico não apresentou diferença significante entre os grupos ob/ob (20,4 ± 1,6 g) e ob/ob + UT (19,8 ± 0,4 g) (Figura 15A). O índice de massa corpórea (IMC) acompanhou os consumos, ou seja, não apresentou diferença significante entre os grupos (ob/ob: 0,17 ± 0,007 vs ob/ob + UT: 0,17 ± 0,002 g/cm^2) (Figura 15B). O gasto energético dos animais ob/ob (VO_2: 1808 ± 32,0 / 1758 ± 28,3mL/kg/h e VCO_2: 1679 ± 66,8 / 1594 ±40,8mL/kg/h), não apresentou diferença significante em comparação aos ob/ob tratados com UT (VO_2: 1911 ± 74,3 e 1797 ± 65,8 mL/kg/h e VCO_2: 1753 ± 65,2 e 1597 ±65,0 mL/kg/h) nos períodos diurnos e noturnos respectivamente (Figura 15C - D). O RER não apresentou diferença significante entre os animas tratados ou não com UT (diurno: 0,9 ± 0,01 *vs.* 0,9 ± 0,006; noturno: 0,9 ± 0,02 *vs.* 0,9 ± 0,02) (Figura 15E).

Figura 15 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre parâmetros metabólicos nos animais ob/ob



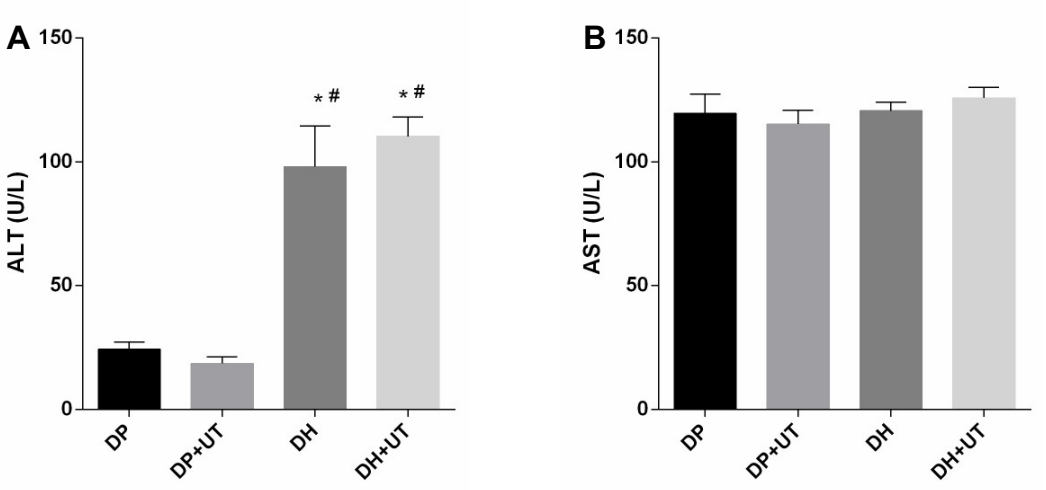
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste t, (n = 3 - 5).

5.5 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre enzimas e morfologia histológica hepáticas

5.5.1 Enzimas hepáticas - Alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransaminase (ST)

Os animais alimentados com DH apresentaram aumento de aproximadamente 4 vezes na atividade de ALT sanguínea quando comparada aos animais controles (98 ± 3 *vs.*24 ± 16 U/L, p<0,05) e o tratamento com UT não teve diferença (98 ± 3 *vs*. 110 ± 8 U/L) (Figura 16A). A atividade de AST não teve diferença entre os grupos (Figura 16B).

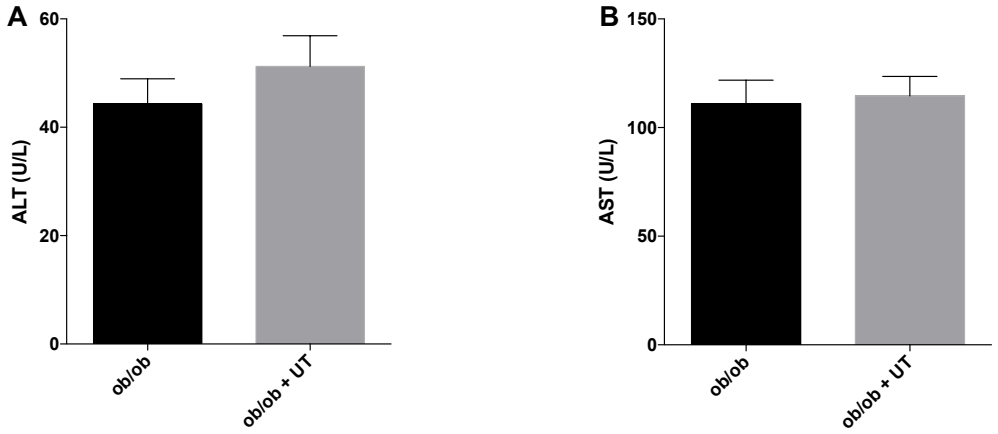
Figura 16 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre as enzimas hepáticas de animais alimentados com dieta hiperlipídica em relação a dieta padrão.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados a DP) $^{\#}p < 0,05$ (comparados a DP+UT), (n = 4 - 5).

Nos ob/ob o tratamento com UT não modificou os valores de ALT e AST sanguíneos (ALT: 44 ± 5 *vs*. 51 ± 6 U/L e AST:111 ± 11 *vs*. 115 ± 9 U/L) (Figura 17). No entanto, os valores de ALT foram maiores nos camundongos ob/ob quando comparada aos animais controles magros (24 ± 16 U/L).

Figura 17 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre as enzimas hepáticas de animais ob/ob.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t* student (n=4).

5.5.2 Aspectos morfológicos

Cortes de 5 ou 12 micrometros de fígados de camundongos dos distintos grupos foram corados com 4 corantes distintos: HE, ORO, tricrômio de Masson e Picrosirious. O HE foi utilizado para análise morfológica dos hepatócitos e avaliação de potencial infiltrado inflamatório nos espaços perivasculares. O ORO cora gorduras em vermelho. Tricrômio de Masson e Picrocirius foram utilizados para marcar fibras colágenas, o primeiro marcando em azul e o segundo em vermelho.

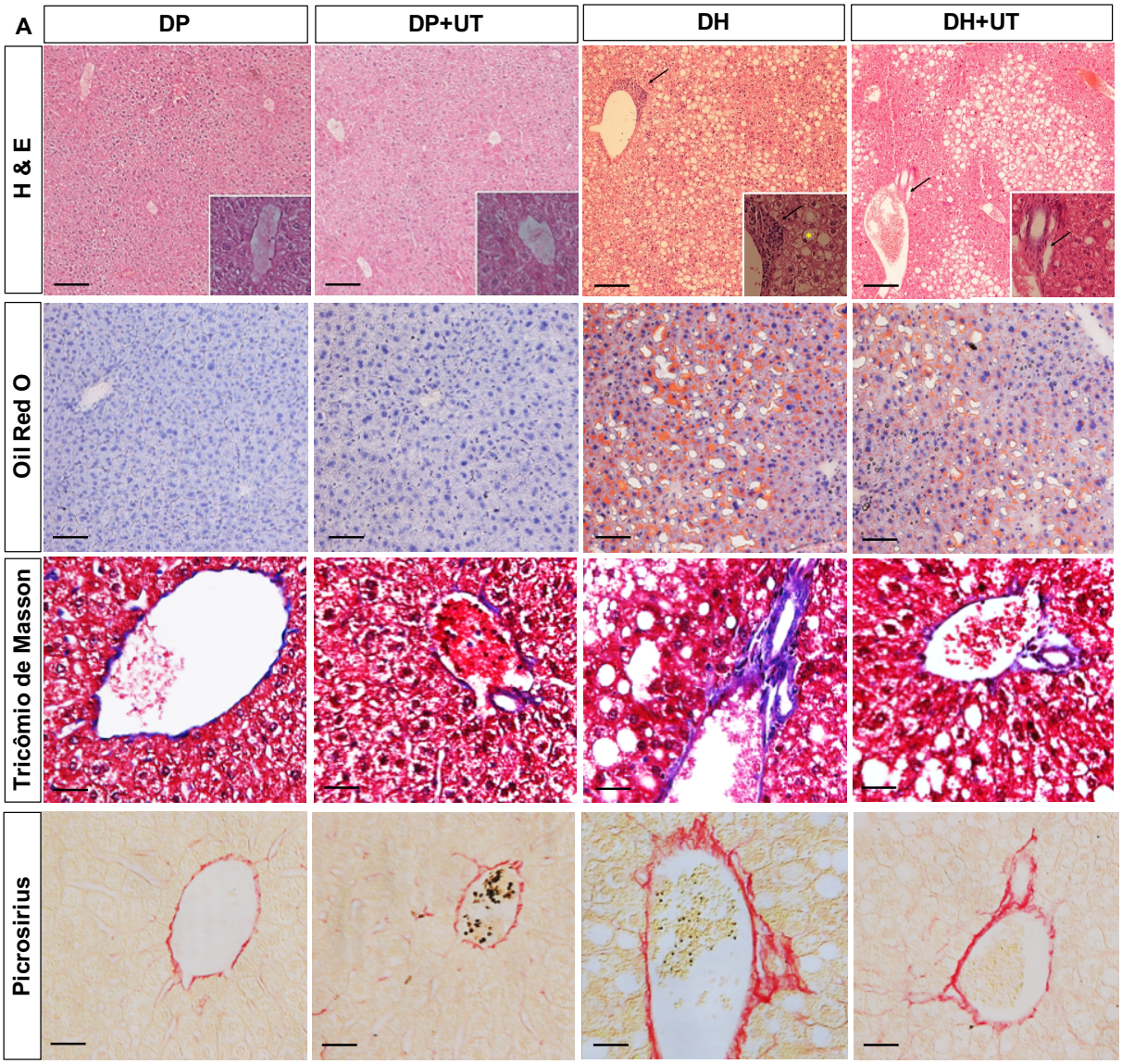
O fígado dos animais alimentados com DH apresentaram esteatose macrovesicular em 28 ± 1% dos hepatócitos examinados. Além disso, foram detectados hepatócitos com balonização, infiltrado inflamatório no espaço periventricular (Figura 18A). Os cortes corados com ORO confirmaram a presença de gordura intracelular (Figura 18B). Foi detectada maior presença de fibras colágenas coradas nos espaços vasculares em 67 ± 4% dos campos analisados quando comparados aos fígados dos animais controles (0%, $p<0,05$) (Figura 18A e C).

O tratamento com UT reduziu para 35% o acúmulo de lipídios nos hepatócitos (19 ± 2%, $p<0.05$) (Figura 18B) e em 33% a deposição de colágeno (para 45 ± 5%) ($p<0.05$) (Figura 18C).

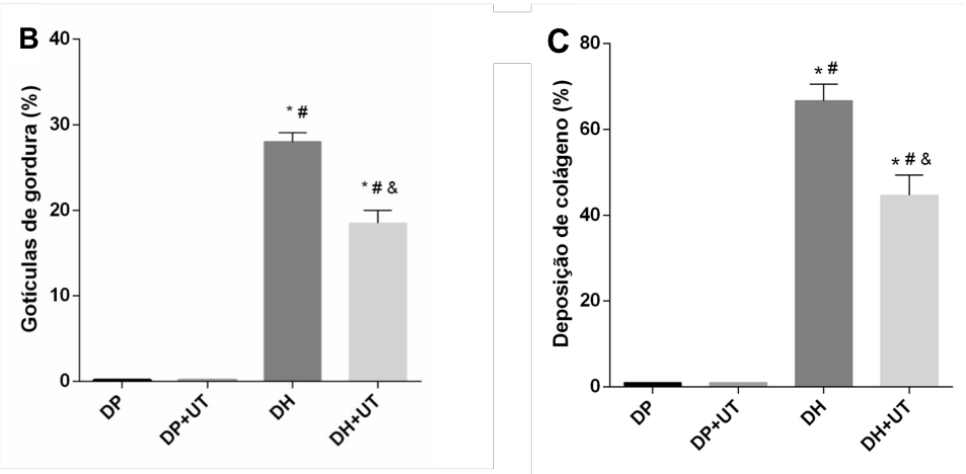
A análise dos cortes de fígado dos animais ob/ob corados com HE revelou esteatose de aspecto microvesicular e praticamente nenhum infiltrado inflamatório nos

espaços perivasculares. O tratamento com a UT apresentou redução em 20% do conteúdo de gordura intracelular (100 ± 5% *vs.* 80 ± 3%, $p<0,05$) (Figura 19A e B). Os animais ob/ob não apresentaram aumento da presença de colágeno no espaço periportal.

Figura 18 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre gotículas de gordura, infiltrado inflamatório e deposição de fibras colágenas no fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica em relação a dieta padrão.

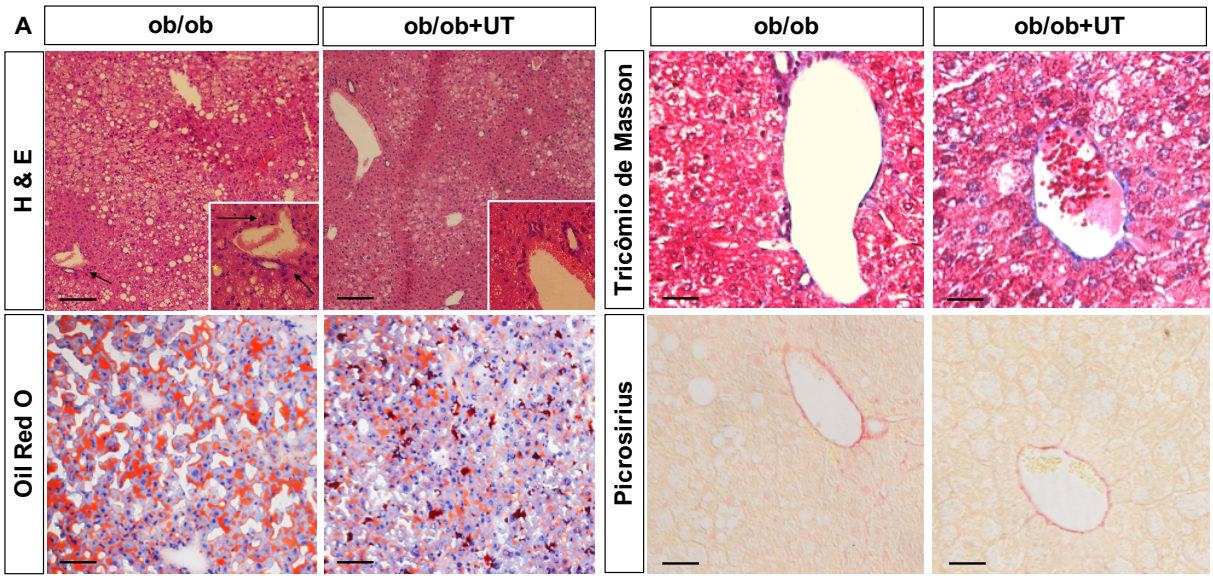


Imagens microscópicas do fígado com coloração em H & E, Oil Red O, barra de escala de 100 µm e aumento de 200X. Tricômio de Masson e Picrosirius, barra de escala de 50 µm e aumento de 400X

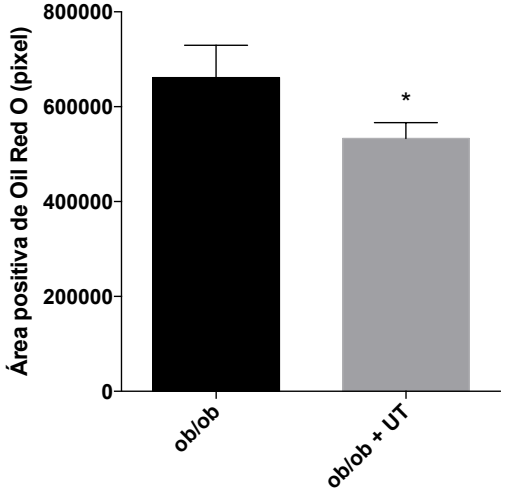


As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados a DP) $^{\#}p < 0,05$ (comparados a DP+UT), $^{\&}p < 0,05$ (comparados a DH) (n = 3 - 4).

Figura 19 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre gotículas de gordura e deposição de fibras colágenas no fígado de animais ob/ob.



Imagens microscópicas do fígado com coloração em H & E, Oil Red O, barra de escala de 100 µm e aumento de 200X. Tricômio de Masson e Picrosirius, barra de escala de 50 µm e aumento de 400X



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t* student $^{*}p < 0,05$ (ob/ob vs. ob/ob +UT), (n = 3 - 4).

5.5.3 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a expressão proteica dos elementos iniciais da ação insulínica celular

Os animais em privação alimentar de 6 horas e anestesiados receberam infusão endovenosa de insulina para a subsequente avaliação das relações estequiométricas da fosforilação induzida pelo hormônio do IR, IRS1 e AKT. Como esperado, houve aumento dessa relação nos animais estimulados quando comparados aos não estimulados com insulina. No entanto, houve incremento diferente entre os grupos alimentados com DP ou DH para IRS-1 e AKT (Figura 20).

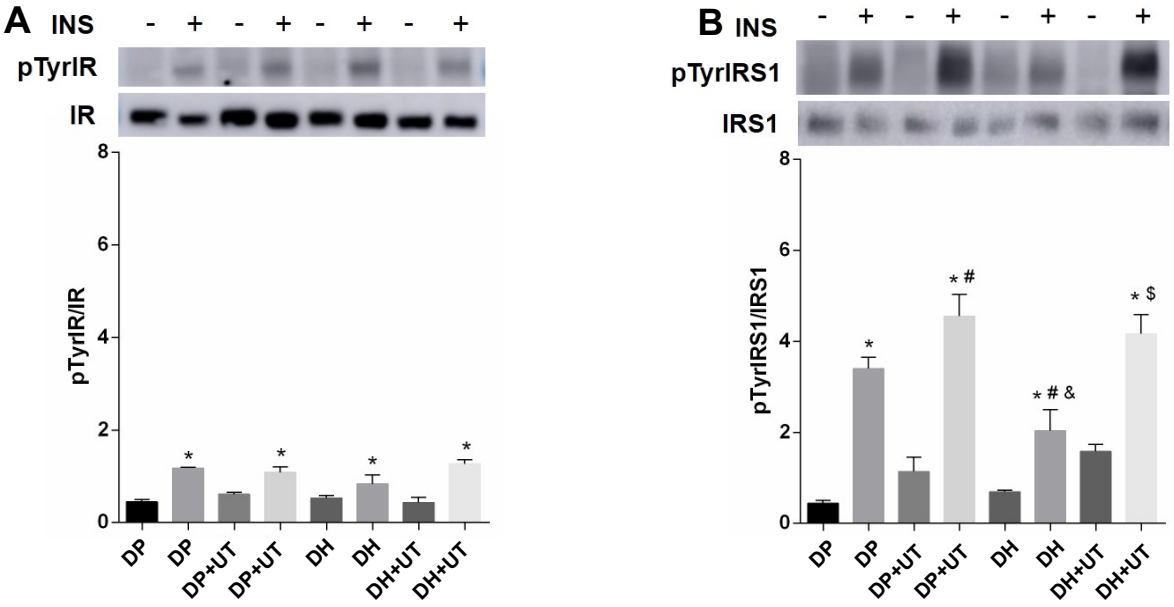
O grau de fosforilação da subunidade β do IR induzido pela insulina foi semelhante entre os distintos grupos (DP: 1,2 ± 0,01; DP+UT: 1,0 ± 0,1; DH: 0,8 ± 0,2 e DH+UT: 1,3 ± 0,1) (Figura 20A).

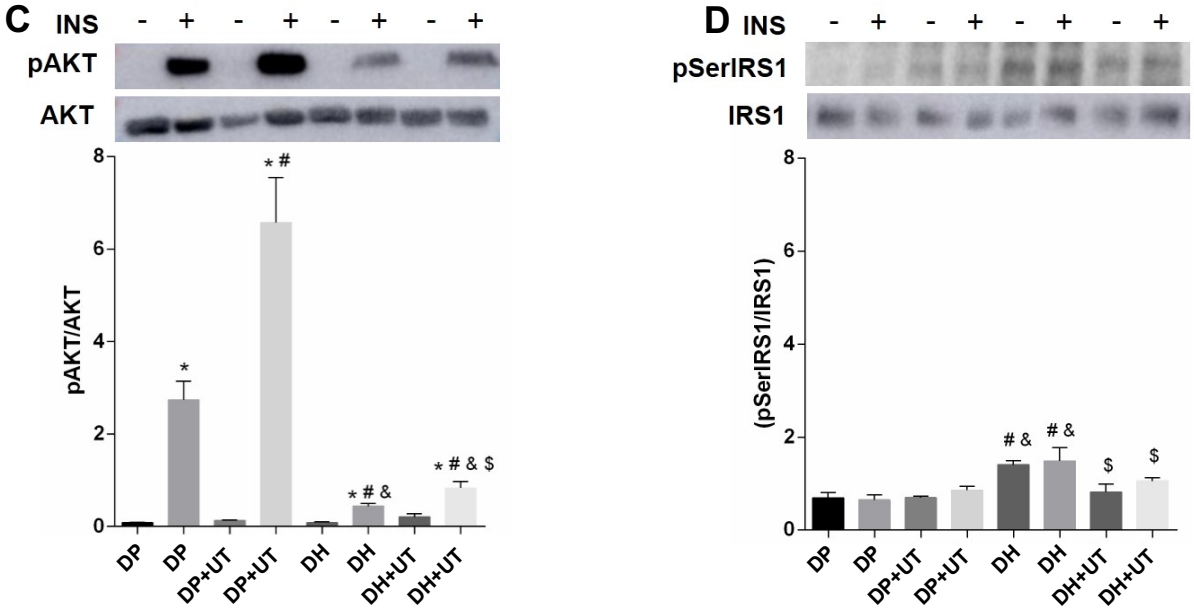
O grau de fosforilação do IRS-1 induzido pela insulina (Figura 20B) foi menor nos fígados dos animais do grupo DH para cerca de 40% do detectado nos animais controles (DP, $p<0,05$). Por outro lado, o tratamento com a UT resultou em aumento desta fosforilação induzida agudamente pelo hormônio. Nos animais do grupo controle (DP+UT) este aumento foi de aproximadamente 30% e nos alimentados com a DH (DH+UT) a resposta foi semelhante ao obtido nos animais controles, ou seja, para aproximadamente 2,4 vezes o detectado nos DH ($p<0,05$).

O grau de fosforilação em resíduo serina da AKT ($pSer^{307}$), que se localiza a jusante da ativação/fosforilação do IRS-1 induzido pela insulina, seguiu perfil parecido

ao IRS-1 com exceção do DH+UT (Fig. 20C). O tratamento com o extrato de UT foi capaz de induzir aumento na fosforilação induzida da AKT para aproximadamente 2,5 vezes no animal magro (DP+UT) em relação ao seu respectivo controle (DH, $p<0,05$) e um aumento de aproximadamente 50% o detectado nos animais com DH (DH+UT, $p<0,05$). No entanto, esse aumento da fosforilação da AKT no fígado dos animais obesos devido ao uso da DH ainda foi menor do que o atingido nos animais controles (Figura 20D).

Figura 20 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a atividade das proteínas da via de sinalização da insulina no fígado metabólicos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

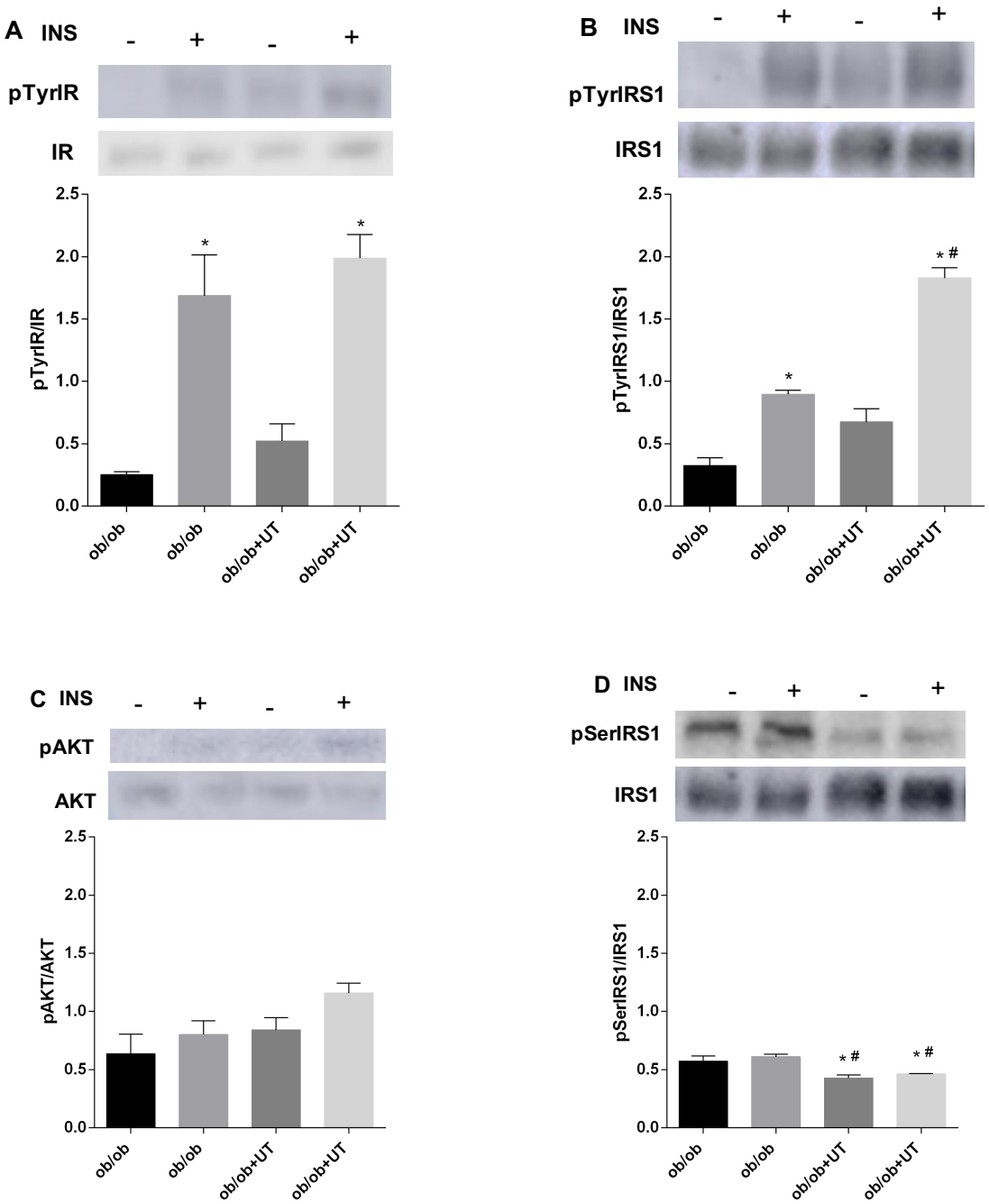




As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ estimulados (+) vs. não estimulados (-), $^{\#}p < 0,05$ comparados a DP (+), $^{\&}p < 0,05$ comparados a DP+UT (+), $^{\$}p < 0,05$ comparados a DH (+), (n = 5).

Resultados similares foram obtidos para os animais ob/ob em relação ao estímulo com a insulina (Figura 21). O grau de fosforilação induzido pela insulina do IR e do IRS-1 foram aumentados quando comparados aos grupos não estimulados. A intensidade da resposta para o IR foi semelhante entre os 2 grupos (Fig. 21A). No grupo que recebeu UT o grau de fosforilação em tirosina do IRS1 duplicou em relação ao veiculo (Figura 21 B, $p<0,05$). No entanto, o grau de fosforilação em serina da proteína pAKT foi semelhante entre os grupos e não atingiu diferença na condição basal (sem estimulo com insulina) ou pós-estímulo com o hormônio (Figura 21C). O tratamento com UT (ob/ob+UT) resultou em redução da fosforilação do IRS-1 no resíduo Ser^{307} ($p < 0,05$, Figura 21D).

Figura 21 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a atividade das proteínas da via de sinalização da insulina no fígado de animais ob/ob



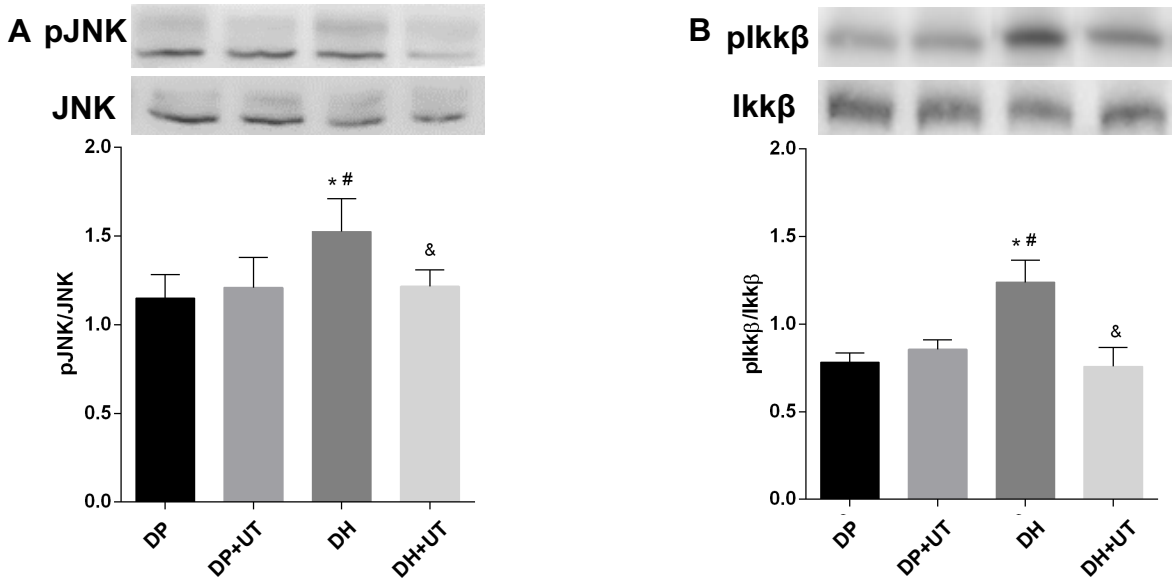
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t* student, $^{\&}p < 0,05$ (ob/ob- *vs.* ob/ob+UT-, ob/ob- vs. ob/ob+UT+), $^{\$}p < 0,05$ (ob/ob+ *vs.* ob/ob+UT-, ob/ob+ vs. ob/ob+UT+), $^{\&}p < 0,05$ (comparados com DH), (n = 5).

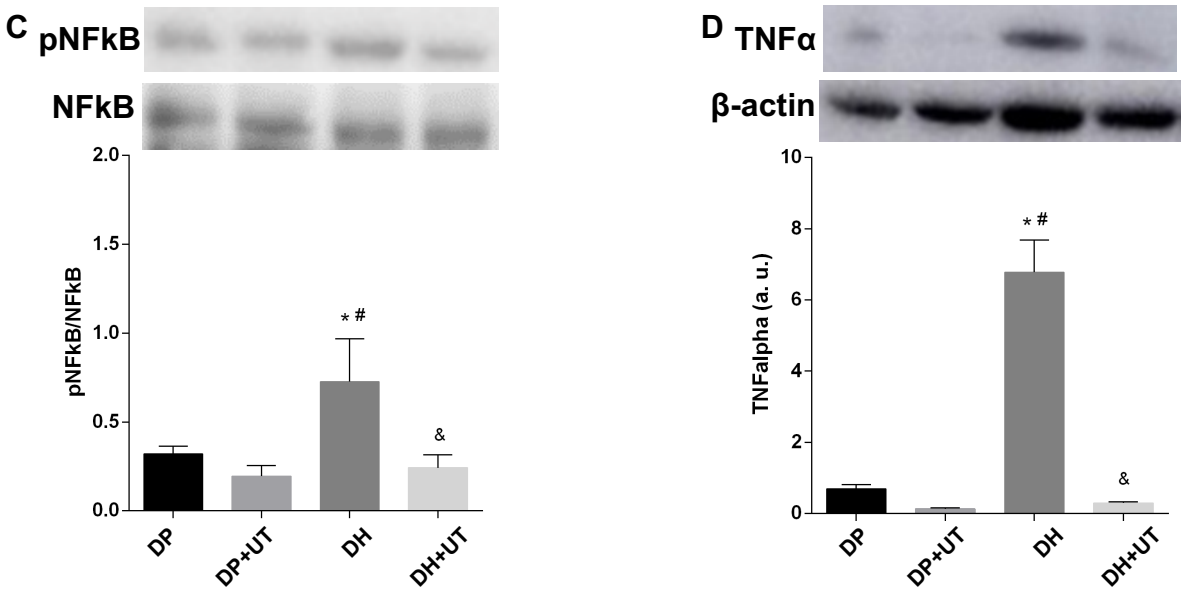
5.5.4 Efeito da *Uncaria tomenntosa* sobre marcadores inflamatórios em fragmentos hepáticos dos camundongos obesos

Foram avaliados a expressão e grau de fosforilação das proteínas intracelulares JNK, Ikkb e NFkb e do TNFα, e a expressão gênica das citocinas IL-1B e IL-10, da arginase1 e do marcador de macrófagos ativado F4/80.

Os graus de fosforilação da JNK, Ikkβ, NFkB foram aumentados em (36 ± 13, 50 ± 8, 133 ± 28%, respectivamente, $p < 0.05$) no grupo DH quando comparados com o grupo DP (Figura 22A, B e C, respectivamente), a expressão proteica de TNFα também foi aumentada quando comparada ao grupo controle (DP) (0,7 ± 0,1 *vs.* 6,8 ± 0,9 unidades arbitrárias, $p < 0.05$) (Figura 22D). O tratamento com UT dos animais alimentados com DH promoveu uma redução de 20 ± 7%, 42 ± 14%, 71 ± 35% nas atividades/fosforilações da JNK, Ikkβ e NFkB, respectivamente, e reduziu a expressão de TNFα (0,3 ± 0,04 unidades arbitrárias, $p < 0.05$), quando comparadas aos animais alimentados com DH (Figura 22).

Figura 22 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a atividade das proteínas da via de sinalização da inflamação no fígado metabólicos nos animais alimentados com dieta hiperlipídica

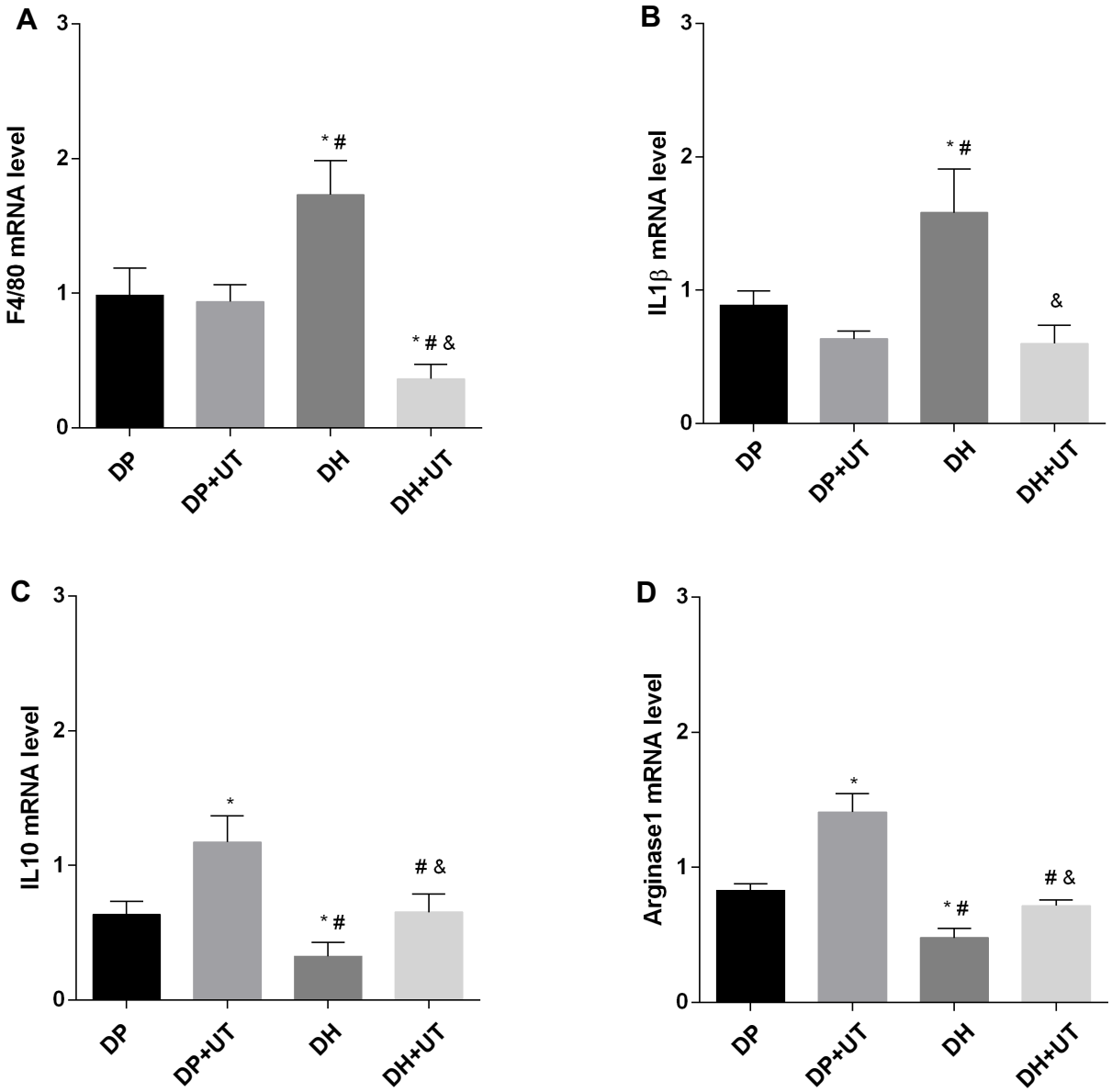




As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados a DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparados a DP+UT), $^{\&}p < 0,05$ (comparados a DH) (n =4 - 6).

A DH induziu aumento do mRNA dos marcadores pro-inflamatórios F4/80 e IL1β para 170 ± 12% e 177 ± 18%, respectivamente, no fígado dos animais em comparação ao detectado nos animais com DP ($p < 0.05$) (Figura 23A e B). Concomitantemente, a expressão gênica dos marcadores anti-inflamatórios, IL10 e arginase1, foram reduzidos para 50 ± 15% e 62 ± 6% em relação aos controles ($p < 0.05$) (Figura 23C e D). O tratamento com UT aumentou os marcadores anti-inflamatórios, IL10 para 100 ± 17% e arginase para 87 ± 6%, acompanhado por redução dos marcadores pro-inflamatório, F4/80 para 40 ± 6% e IL1β para 67 ± 17% quando comparados ao grupo controle (Figura 23).

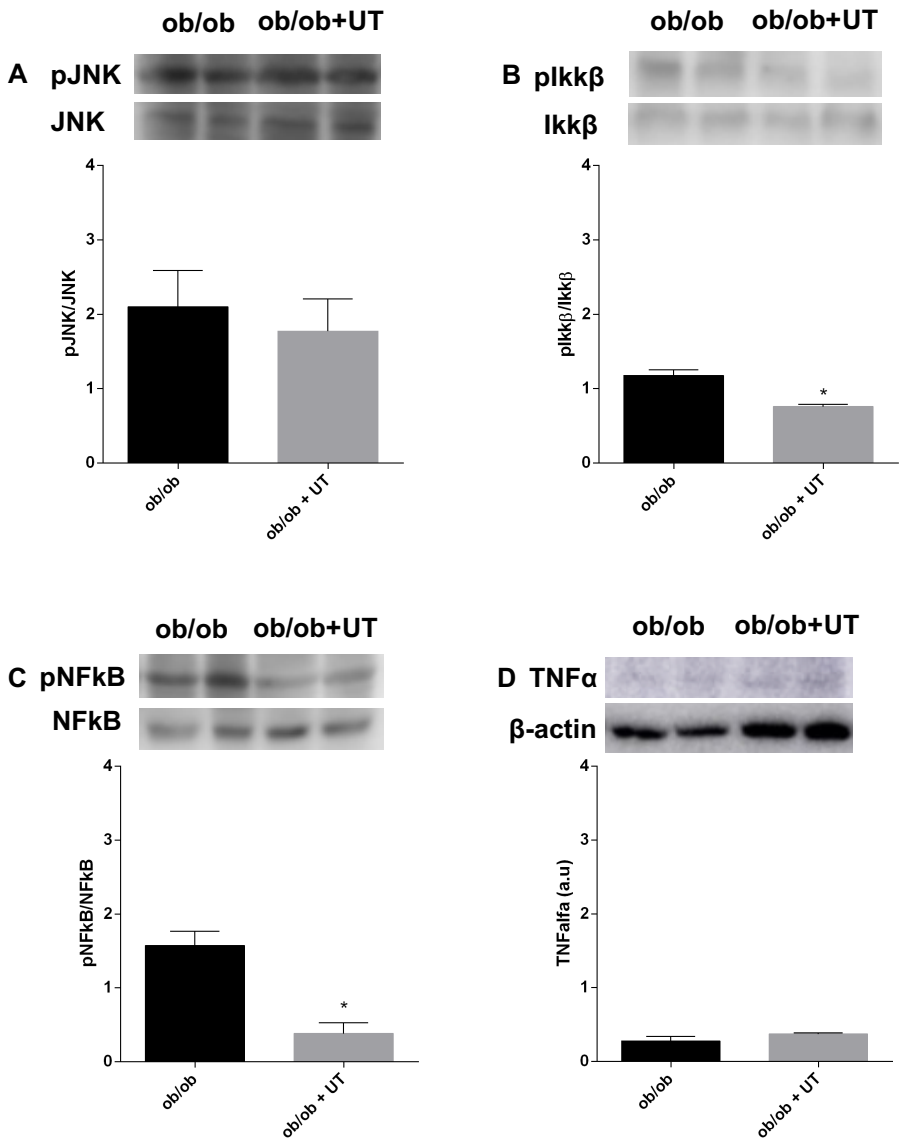
Figura 23 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre expressão gênica de marcadores pro (F480 e IL1β) e anti-inflamatório (IL10 e arginase1) no de animais alimentados com dieta hiperlipídica



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados a DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparados a DP+UT), $^{\&}p < 0,05$ (comparados a DH) (n =5 - 7).

Nos animais ob/ob o tratamento com UT reduziu a relação estequiométrica do Ikkβ (42 ± 4%) e a do NFkB (75 ± 25%) comparado ao grupo ob/ob ($p < 0,05$), sem afetar a JNK (Figura 24). Similarmente, o tratamento reduziu o mRNA para 38 ± 6% e de F4/80 para 39 ± 9% ($p < 0,05$). Não foi detectada diferença na expressão dos marcadores anti-inflamatórios (IL10 e arginase1) nos animais ob/bo (Figura 25).

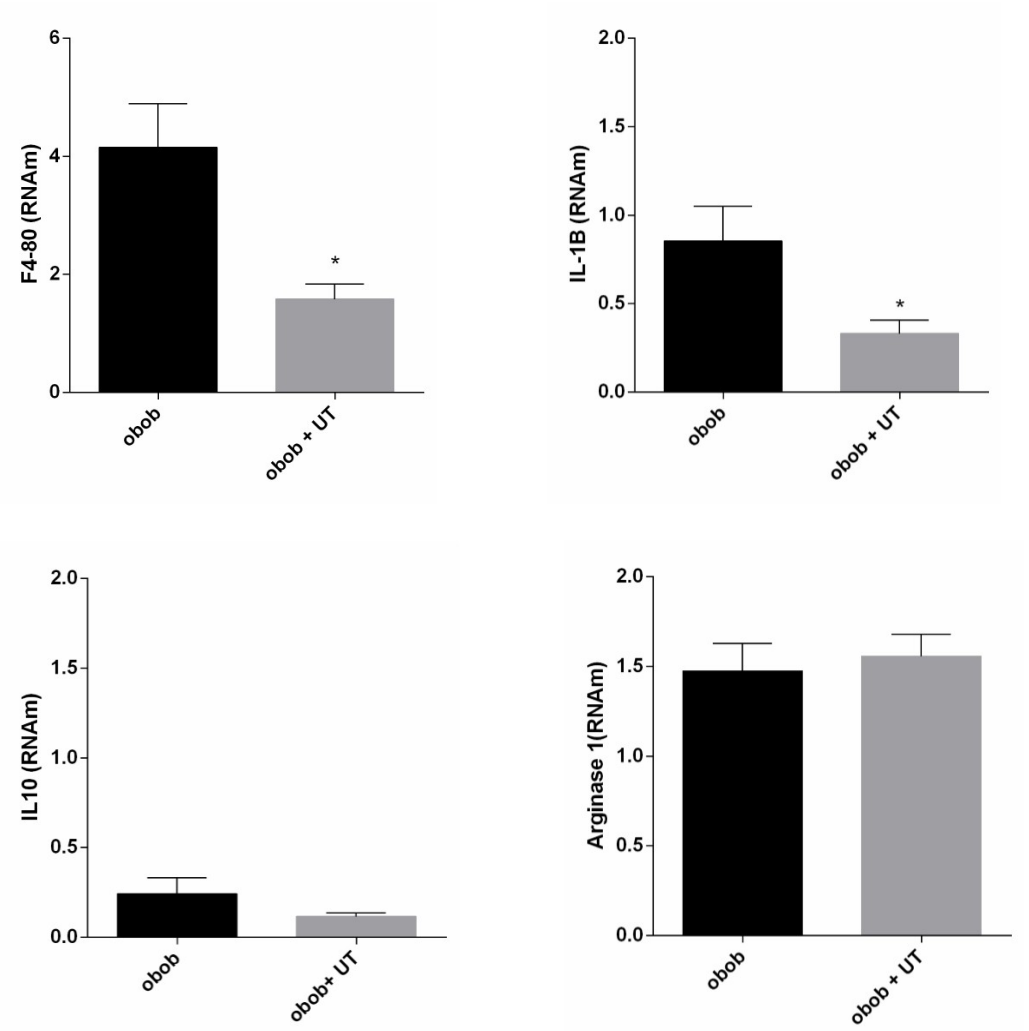
Figura 24 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a atividade das proteínas da via de sinalização da inflamação no fígado metabólicos de animais ob/ob.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t* student, *$p < 0,05$ (ob/ob *vs.* ob/ob+UT), (n = 5).

Similarmente, o tratamento reduziu as expressões gênicas de F4/80 e IL1β (38 ± 6% e 39 ± 9% *vs*. 100 ± 18% e 100 ± 23%, respectivamente, $p < 0,05$). Não foi detectada diferença na expressão dos marcadores anti-inflamatórios (IL10 e arginase1) nos animais ob/ob (Figura 25).

Figura 25 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre expressão gênica de marcadores pro (F480 e IL1β) e anti-inflamatório no fígado (IL10 e arginase1) metabólicos de animais ob/ob.

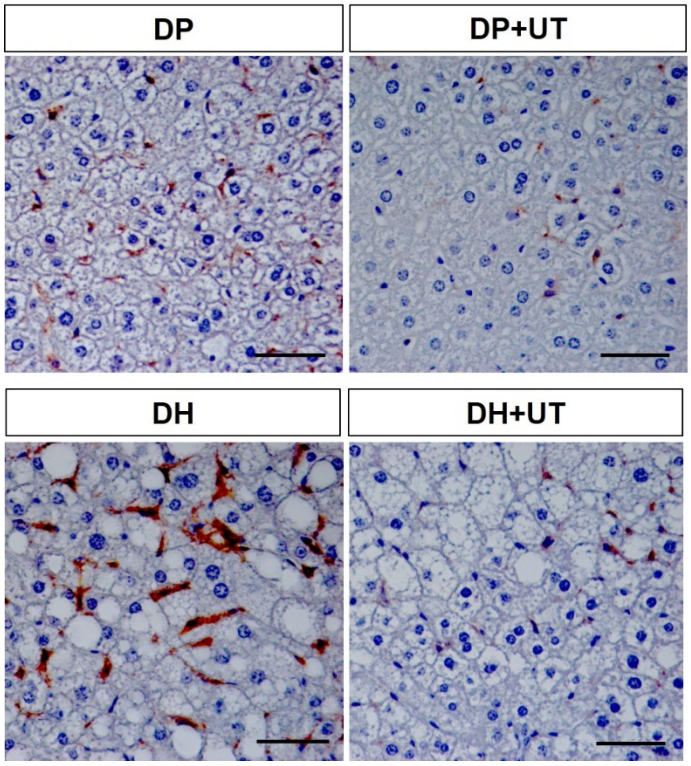


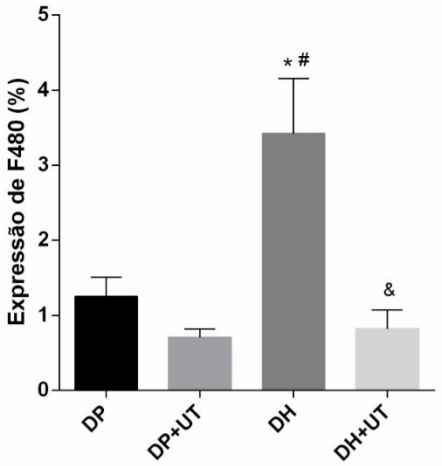
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t* student, *$p < 0,05$ (ob/ob *vs.* ob/ob+UT), (n = 5).

5.5.4.1 *Infiltração de macrófagos no fígado*

Foi realizada a imuno-histoquímica com anticorpo anti-F4/80 para confirmar o aumento da expressão gênica desse marcador inflamatório no fígado dos animais obesos. Foi detectado aumento de 3 vezes mais células no fígado dos animais alimentados com a DH comparados aos DP. O tratamento com UT reduziu as células positivas de F4/80 no tecido aos níveis do controle (DP) ($p < 0.05$) (Figura 26).

Figura 26 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre infiltração de macrófagos no fígado metabólicos de animais alimentados com dieta hiperlipídica

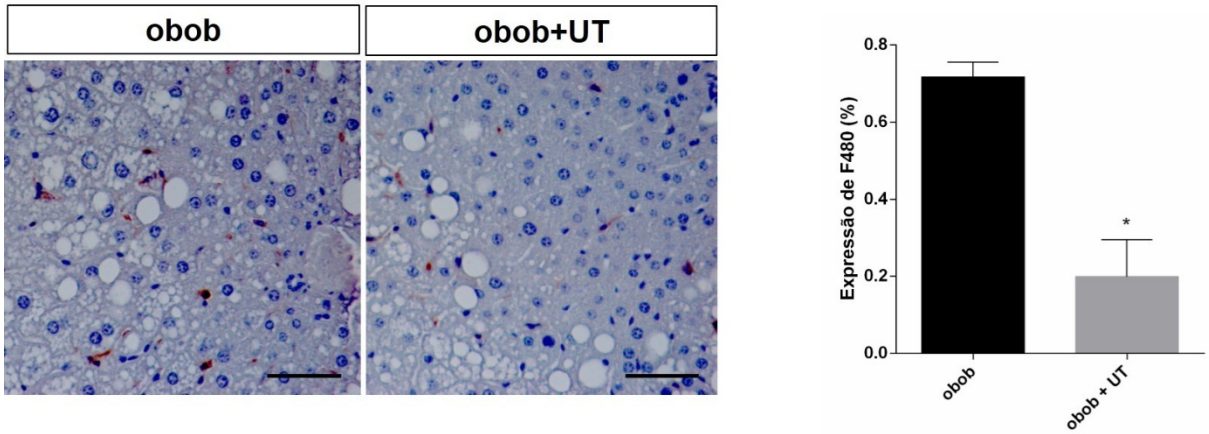




Imagens microscópicas do fígado com marcação de F4/80 por imunohistoquímica. Barra de escala de 50 µm e aumento de 400X. As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados a DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparados a DP+UT), $^{\&}p < 0,05$ (comparados a DH) (n =4 - 5).

Nos fígados dos camundongos ob/ob, que apresentaram percentual menor de células marcadas com F4/80 do que nos alimentados com a DH (~0,7%), o tratamento com a Ut induziu redução para quase 1/3 do detectado (0,2%, $p < 0,05$) (Figura 27).

Figura 27 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre infiltração de macrófagos no fígado metabólicos de animais ob/ob.

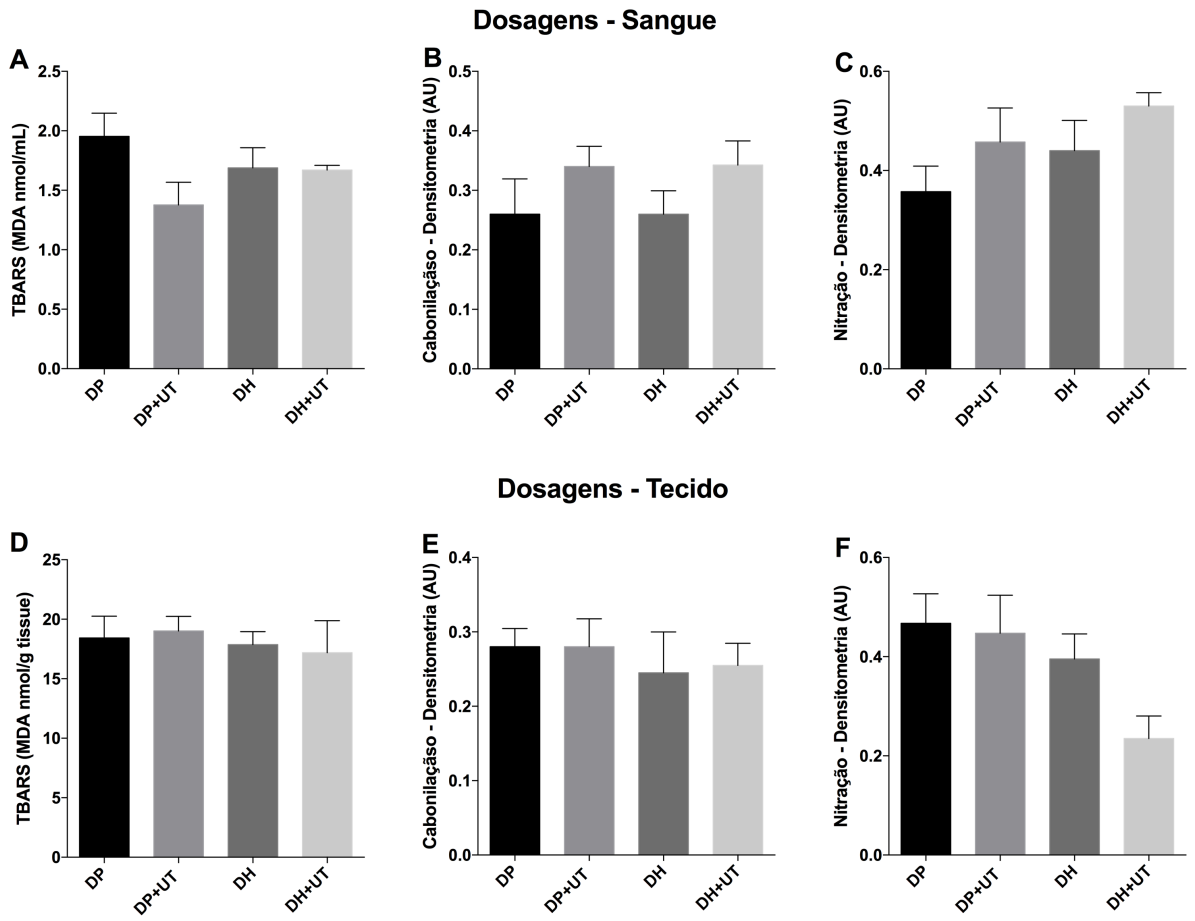


As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t* student, *$p < 0,05$ (ob/ob *vs.* ob/ob+UT), (n = 4).

5.5.5 Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre parâmetros de estresse oxidativo no soro e fígado dos camundongos obesos e controles

As dosagens de TBARS, carbonilação e nitração das proteínas sanguíneas não apresentaram diferenças entre os grupos DP, DP+UT, DH e DH+UT no sangue (1,9 ± 0,2 *vs.* 1,2 ± 0,2 *vs.*1,7 ± 0,2 *vs*. 1,7 ± 0,04 nm/mL); (0,3 ± 0,06 vs. 0,3 ± 0,03 vs. 0,3 ± 0,04 *vs.* 0,3 ± 0,04 nm/mL); (0,3 ± 0,05 *vs*. 0,4 ± 0,07 *vs.* 0,4 ± 0,06 *vs.* 0,5 ± 0,03 nm/mL), respectivamente (Figura 28A, B e C). As mesmas analises realizadas em fragmentos hepáticos mostraram resultados similares ao do sangue (18,4 ± 1,8 *vs.* 19,0 ± 1,2 *vs.*17,9 ± 1,1 *vs*. 17,2 ± 2,3 nm/mL); (0,3 ± 0,02 vs. 0,3 ± 0,04 vs. 0,2 ± 0,05 *vs.* 0,2 ± 0,03 nm/mL); (0,5 ± 0,06 *vs*. 0,4 ± 0,08 *vs.* 0,4 ± 0,05 *vs.* 0,2 ± 0,04 nm/mL), respectivamente (Figura 28D, E e F).

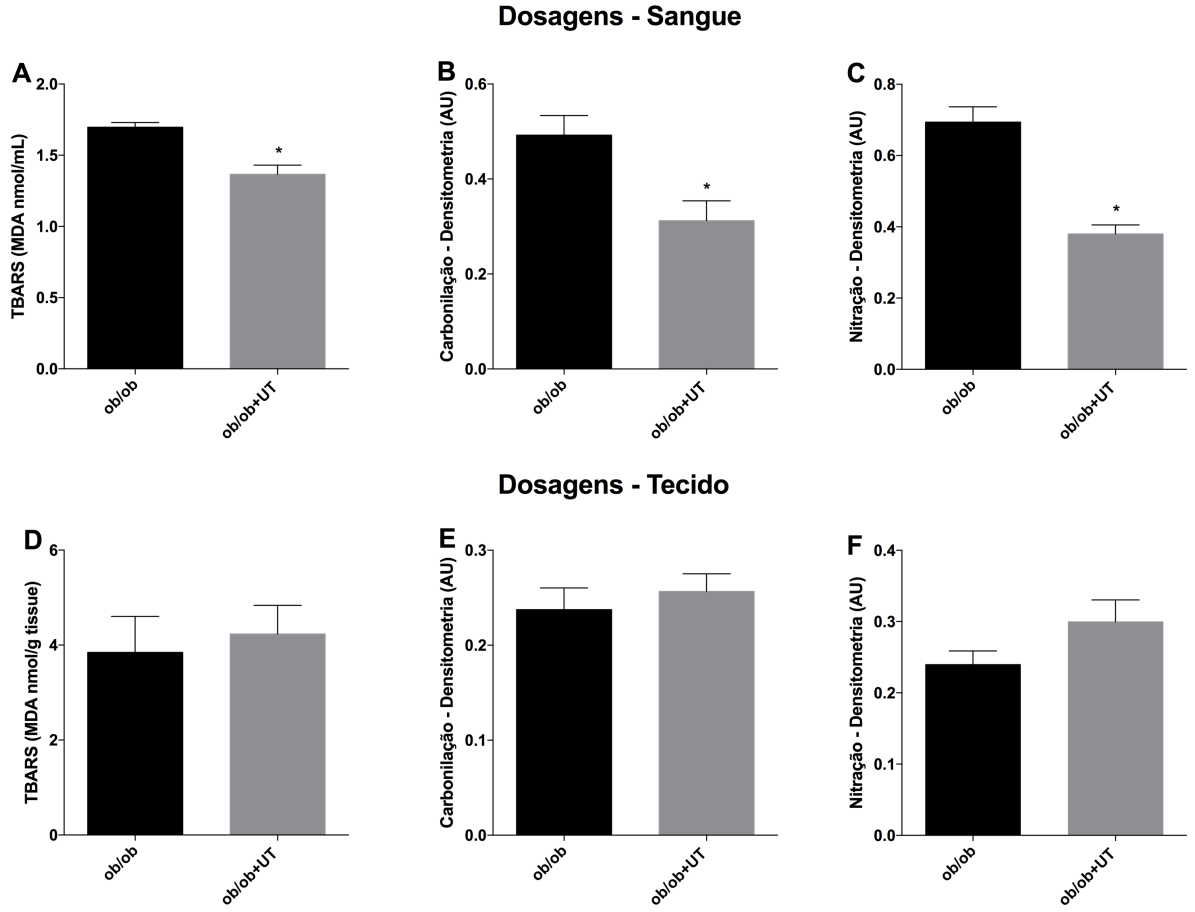
Figura 28 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre o estresse oxidativo no sangue e tecido de animais alimentados com dieta hiperlipídica



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, (n = 5).

Por outro lado, nos animais ob/ob, o tratamento com UT reduziu a quantidade de TBARS, proteínas carboniladas e nitradas no sangue (1,7 ± 0,03 *vs.* 1,4 ± 0,06; 0,5 ± 0,04 vs. 0,3 ± 0,04; 0,7 ± 0,04 *vs*. 0,4 ± 0,02 nm/mL, $p<0,05$, respectivamente) (Figura 29A, B e C). No entanto, nos fragmentos hepáticos não houve diferença entre os ob/ob (3,8 ± 0,7 *vs.* 4,2 ± 0,6; 0,2 ± 0,02 vs. 0,2 ± 0,02; 0,2 ± 0,02 *vs*. 0,3 ± 0,03 nm/mL, respectivamente) (Figura 29D, E e F).

Figura 29 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre o estresse oxidativo no sangue e tecido de animais ob/ob.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t* student, *$p < 0,05$ (ob/ob *vs.* ob/ob+UT), (n = 5).

6 DISCUSSÃO

Nós investigamos o efeito do extrato bruto da planta *Uncaria tomentosa* sobre a regulação da glicemia, o gasto energético, as características da DHGNA e os marcadores inflamatórios em tecido hepático de dois modelos de camundongos obesos: devido a dieta hiperlipídica, DH, e os com mutação que não produz a leptina, ob/ob. No modelo de DH, o tratamento com UT reduziu o IMC em 22%, aumentou o gasto energético, melhorou a sensibilidade à insulina e reduziu as características associadas à DHGNA. Além disso, nos camundongos ob/ob, houve uma melhora na tolerância à glicose com um aumento da insulinemia no jejum.

O desaparecimento (clearence) da glicose do plasma depende de alguns fatores: 1) resposta secretória de insulina e sua ação; 2) habilidade da glicose em induzir o seu próprio metabolismo favorecendo sua captação pelos tecidos; 3) suspender a produção de glicose pelo fígado. Os testes de tolerância a glicose (GTT) e insulina (ITT) avaliam a secreção e sensibilidade à insulina. No GTT, quando a glicose é injetada, esta vai estimular a liberação de insulina que por sua vez reduzirá a glicemia. No ITT, quando a insulina é injetada, esta vai promover uma queda na glicemia, através da supressão da produção hepática de glicose e pelo estímulo da captação de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina, músculo esquelético e adiposo. O indivíduo é considerado mais sensível a insulina quanto mais rápida e intensa for a redução da glicemia (GELONEZE; TAMBASCIA, 2006).

Alonso e colaboradores (2012) demonstraram em camundongos obesos, devido a dieta hipercalórica (DIO) e em ob/ob, que a fase rápida de secreção de insulina é muito importante na manutenção da homeostase de glicose, à semelhança do observado em humanos. Ademais, demonstraram um incremento na insulinemia pós estímulo com glicose para aproximadamente 4 vezes nos ob/ob e para cerca de 30 vezes os DIO, com um protocolo experimental de jejum e dose de glicose semelhante ao utilizado aqui.

Assim, a melhora da sensibilidade à insulina nos camundongos alimentados com DH e tratados com UT, sem alteração no GTT, mas associada a redução da insulina plasmática em jejum, corrobora com a hipótese de que a insulina plasmática seria reduzida ao longo do teste de tolerância à glicose. Dessa maneira, estaria caracterizada uma melhora na secreção da insulina induzida pela glicose, indicando uma possível reversão inicial da intolerância à glicose desse modelo de obesidade.

Por outro lado, nos camundongos ob/ob, o tratamento com UT não foi capaz

de superar a resistência à insulina. É importante lembrar que este é um modelo de diabetes tipo 2 (T2D), que apresenta uma resistência à insulina muito mais severa em comparação com camundongos alimentados com DH. O aumento da insulinemia nestes camundongos tratados com UT, por sua vez, indica melhora na secreção de insulina induzida pela glicose. O que resultou na melhora da tolerância à glicose detectada.

Tem sido amplamente relatado que uma condição de baixa inflamação crônica está associada à obesidade (ARKAN et. al., 2005; HOTAMISLIGIL, 2006). Nesse estado de obesidade, a maioria das adipocinas são reguladas positivamente e funcionam como proteínas pró-inflamatórias, que promovem doenças metabólicas ligadas a obesidade. Dentre essas adipocinas estão, leptina – produto do gene *ob*, TNF e IL-6 (OUCHI et al., 2011). Além disso, adipócitos hipertróficos exibem atividades prejudicadas de lipólise e esterificação lipídica que levam a um aumento nos níveis de ácidos graxos plasmáticos, uma redução na capacidade tamponante dos ácidos graxos e um rápido acúmulo de gordura ectópica (ERTUNC; HOTAMISLIGIL, 2016), que tem sido amplamente associada à resistência à insulina hepática (SHUMAN, 2014; CAMPOREZ et al., 2015; SAMUEL; SHUMAN, 2016).

Os ácidos graxos saturados podem se ligar ao receptor do tipo Toll 4 (TLR-4) e ativar respostas inflamatórias em macrófagos, células dendríticas, tecido adiposo e fígado. O TLR-4 ativa a via de sinalização intracelular Ikkβ/NFκB e MAPK (p38, JNKs), que, por sua vez, leva à transcrição de citocinas pró-inflamatórias (HUANG et al., 2012; JIN; FLAVELL, 2013; ROCHA, 2016). Ikkβ e JNK também são capazes de induzir a fosforilação do IRS-1 em serina 307 (Ser^{307}), o que prejudica a sinalização do receptor de insulina e leva à resistência insulínica (HIROSUMI et al., 2002; HOTAMISLIGIL, 2003; HOTAMISLIGIL, 2008; VELLOSO, 2015; ERTUNC, HOTAMISLIGIL, 2016). Os níveis reduzidos de JNK, Ikkβ, NFkB e TNF-α nos camundongos tratados com UT reforçam o fato de que este extrato possui propriedades anti-inflamatórias.

Em concordância com estudos anteriores, a resistência à insulina no fígado causada pelo acúmulo de lipídios foi associada ao aumento da fosforilação do IRS-1 em serina (TANTI et al., 1994; COPPS et al., 2010; KATO et al., 2014; HANÇER et al., 2014; VELLOSO et al., 2015). A redução da fosforilação do IRS-1 em serina induzida pelo tratamento com UT está provavelmente relacionada com a melhora na

sensibilidade à insulina no fígado de ambos os camundongos, DH e ob/ob. Considerando o efeito anti-inflamatório da UT e a redução da fosforilação do IRS-1 em serina, é plausível que a sinalização do receptor de insulina a jusante seja devida ao aumento da fosforilação do substrato e, consequentemente, a transdução intracelular do sinal, ao invés de uma atividade aumentada da cinase do receptor de insulina (IR).

O acúmulo de lipídios nos hepatócitos é característica da doença gordurosa hepática. Essa por sua vez tem duas classificações centrais: uma relacionada ao excesso de ingestão de álcool, tanto em quantidade quanto em cronicidade, e a causas outras quando descartado o consumo de bebidas alcoólicas. Portanto, a DGH é definida como alcoólica ou não alcoólica (DHGNA).

A DGH tem um espectro que varia de mera esteatose, que pode permanecer nesse estágio por anos, podendo inclusive regredir ou, em função de manutenção dos fatores etiológicos ou de risco, progredir a uma condição denominada esteato-hepatite (NASH). Em seguida, evoluir para quadro com presença de fibrose a cirrose e, até ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (SHARIFNIA et al., 2015; KIM et al., 2016). NA DGHNA, essa progressão está diretamente relacionada a presença de 3 condições: diabetes *Mellitus*, envelhecimento e obesidade.

Dados epidemiológicos indicam que aproximadamente 25% das pessoas com DGHNA inicial evoluirão para NASH em 3 anos, e que em 6 anos deverá estar presente em 44% dessas pessoas. Desse conjunto de pessoas, cerca de 5 a 18% apresentarão uma progressão rápida da doença para cirrose. E destas, aproximadamente 3 a 13% poderão desenvolver carcinoma hepatocelular (HCC) num período de 3 a 7 anos. Há também outra informação importante e crucial, cerca de 20 a 30% das pessoas com a “mera” esteatose hepática poderão apresentar a NASH associada a fibrose e em 6 anos cerca de 40% terão essa forma mais agressiva da NASH. Aproximadamente 40% desses últimos evoluirão para cirrose, mas um percentual ainda não definido poderá evoluir diretamente para desenvolver o HCC, independentemente de apresentarem cirrose (BERLOT; ADAMS, 2016).

As características associadas à esteato-hepatite incluem: gotículas lipídicas intracelulares, infiltrados celulares inflamatórios, fibrilas de colágeno, aumento dos níveis de RNAm do IL-1β e F4/80, células positivas para F4/80 no fígado e maiores atividades de ALT no sangue. Nos camundongos DH, todas essas sete características

foram detectadas, enquanto nos camundongos ob/ob apenas cinco dessas características foram observadas. Nesse sentido, ambos os modelos de camundongos obesos apresentam um padrão de DHGNA com infiltrado inflamatório ativo. No entanto, os camundongos DH exibem uma condição mais prejudicial, quando comparados aos camundongos ob/ob. A despeito dos ob/ob apresentarem um IMC mais alto, mostraram um tipo menos prejudicial de doença hepática gordurosa. Apesar da discrepância na intensidade da DHGNA, o tratamento com UT reduziu o acúmulo de gordura intracelular e os marcadores inflamatórios no fígado em ambos os modelos de camundongos obesos.

Vale a pena mencionar que o grupo DP + UT não apresentou alteração nas atividades de ALT e AST no plasma, o que indica que não há efeito hepático citotóxico. No entanto, a falta de redução da atividade sanguínea ALT nos camundongos DH + UT pode estar relacionada a discrepâncias entre o curto período de tratamento e a depuração metabólica da enzima na corrente sanguínea.

Apesar do efeito protetor e potencialmente reversível da UT na DHGNA em ambos os modelos obesos, o tratamento foi mais efetivo nos camundongos obesos com DH comparados aos camundongos ob/ob. É importante destacar, que os camundongos ob/ob já nascem sem leptina, que é um fator para a obesidade, os mutantes são identificados com 4 semanas de idade e aumentam de peso rapidamente, chegando a atingir 3 vezes o peso normal quando comparados com os camundongos sem mutação. No primeiro modelo de obesidade, os camundongos começam a se alimentar com a dieta hiperlipídica a partir das 8 - 10 semanas de idade, só apresentam maior aumento de massa corporal em relação aos controles por volta de 5 semanas após o início dessa alimentação. E foram avaliados neste estudo entre 18 e 20 semanas de idade. Os camundongos ob/ob tem uma massa corpórea aproximadamente 40% maior que dos camundongos DH.

A leptina tem ação no hipotálamo e regula o gasto energético e consumo alimentar. Entretanto, o receptor de leptina não está somente no hipotálamo, e a função fisiológica desse hormônio envolve vários fatores que não estão ligados ao estado energético, dentre esses fatores estão glicose, insulina, glicocorticoide. O consumo alimentar e o aumento pós-prandial da insulinemia aumenta a concentração da leptina no plasma. A leptina ajuda o tecido adiposo a utilizar glicose para produção de ATP (SZKUDELSKI, 2007). Ademais, a resistência à leptina pode ser resultante de

fatores diversos como síntese de forma inativa ou menos potente de leptina, como uma resposta ineficiente a essa adipocina, como devido a problemas de transporte, como deficiências na cascata intracelular de sinalização ou como defeitos no sistema efetor (YOSHIHARA et al., 2010).

Outras características distintas, além da resistência à leptina versus ausência do hormônio funcional, que podem desempenhar um papel na resposta ao tratamento com a UT contra a comorbidade DHGNA destes modelos são: (1) hipogonadismo devido à imaturidade persistente do eixo gonadal hipotálamo-hipofisário nos camundongos ob/ob, (2) o grau de sarcopenia associado à obesidade e comprometimento da sensibilidade à insulina, e (3) o grau de inflamação crônica (LINDSTRÖM, 2007). No entanto, não sabemos se o tratamento prolongado com a UT poderia interferir com algumas das outras diferenças, além do estado inflamatório e da sensibilidade à leptina, observadas entre esses animais obesos.

Em condições fisiológicas, a leptina estimula a redução da glicemia por vários mecanismos, em particular reduzindo a produção hepática de glicose (D'SOUZA et al., 2017). Outro fato importante, é que esse hormônio limita a formação hepática de triglicerídeos pela facilitação da entrada de ácidos graxos na mitocôndria e sua β-oxidação. Estes efeitos são dependentes das condições energéticas do organismo (SANSINANEA et al., 2001). Portanto, nos modelos de camundongos obesos utilizados no nosso estudo mostramos acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, que deve estar relacionado a uma disfunção da leptina.

Há evidências que indicam que ambos os padrões de esteatose, a presença de macrovesículas ou microvesículas, estão associados a um comprometimento da função mitocondrial (TRAK-SMAYRA et al, 2011). Além disso, o ganho de peso e a perda de peso estão associados a mudanças no gasto energético. A maioria dessas mudanças não é adaptativa e ocorre passivamente, porém pode ser adaptativa e surgir ativamente. De fato, a termogênese adaptativa consiste em (1) gasto energético de repouso e termogênese induzida pela dieta, e (2) gasto energético relacionado à atividade. Considera-se que o mecanismo por trás da termogênese adaptativa esteja sob controle hormonal e genético, particularmente devido à insulina, leptina, hormônios tireoidianos e atividade do sistema nervoso simpático (MULLER; BOSY-WESTPHAL, 2013).

A esse respeito, o gasto energético reduzido e o aumento do IMC detectado

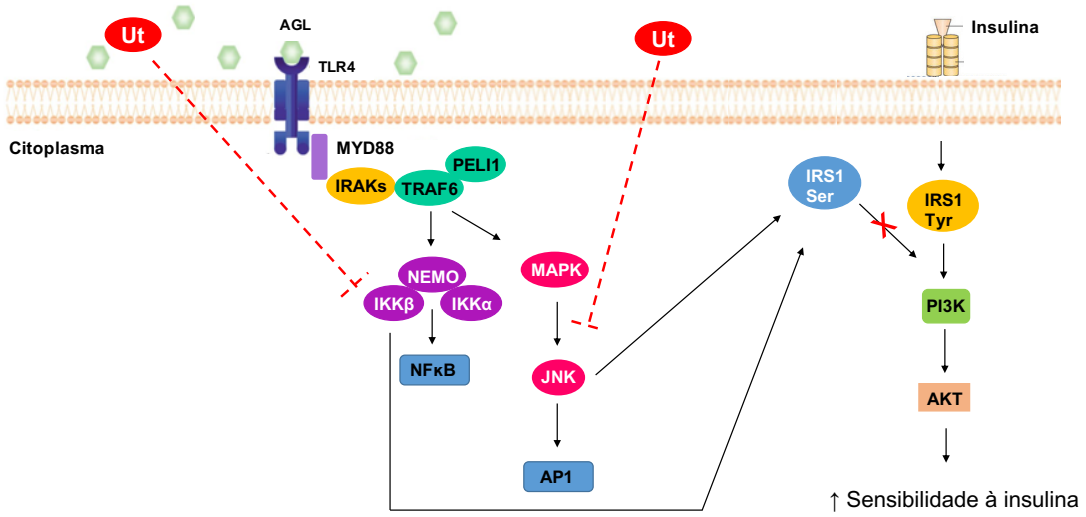
nos camundongos obesos podem estar relacionados tanto à resistência à insulina quanto à ação prejudicada da leptina. Apesar da quantidade semelhante de níveis de leptina no sangue observados em camundongos DH em jejum, um possível mecanismo celular pelo qual o tratamento UT melhorou o gasto energético associado à redução do IMC poderia ser através do aumento da sensibilidade hipotalâmica à leptina nos camundongos DH. O fato de a UT ser incapaz de modular o IMC e o gasto energético nos camundongos ob/ob sustenta essa proposição, uma vez que a principal característica desse modelo de obesidade se baseia na ausência de leptina circulante funcional (LINDSTRÖM, 2007).

Outro fator que pode ser levado em consideração é o estresse oxidativo, pois indivíduos com DHGNA, além da obesidade, diabetes, dislipidemia, podem apresentar estresse oxidativo, que também contribui para a evolução da esteatose para esteato-hepatite, fibrose e cirrose, levando a um aumento da peroxidação lipídica e redução da defesa antioxidante. A concentração das enzimas antioxidantes é reduzida no fígado com esteatose e inflamado quando comparados aos fígados de camundongos apenas com esteatose (MACHADO et al., 2015; SHIN et al., 2018). No nosso estudo, os camundongos ob/ob tratados com UT apresentaram níveis mais baixos de carbonilação, o que pode indicar maior produção de ROS neste camundongo hipoleptinêmico em comparação com os alimentados com DH usados neste estudo. Assim, esses dados amplificam o potencial efeito antioxidante do extrato de *Uncaria tomentosa*.

Além de já ser usado clinicamente em pacientes com osteoartrite (MONTORO et al, 2004), provavelmente devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, o tratamento com extrato de *Uncaria tomentosa* melhorou a sensibilidade à insulina, atenuou a inflamação hepática e o acúmulo de gordura hepática em camundongos alimentados com DH e camundongos ob/ob. Em conjunto, esses dados fornecem evidências, pela primeira vez, que o tratamento com *Uncaria tomentosa* pode ter uma utilidade potencial como uma abordagem terapêutica para a obesidade e doença metabólica associada à DHGNA.

7 CONCLUSÕES

Figura 30 – Esquema de conclusão mostrando o efeito da *Uncaria tomentosa* sobre a via de sinalização da inflamação x via de sinalização da insulina (Adaptado de Fang et al., 2017)



A insulina se liga ao seu receptor e ativa o substrato do receptor da insulina (IRS) em resíduos de tirosina para ativar a via de sinalização da insulina. Quando a via de sinalização da inflamação do NFkB e AP1 são ativadas por ácidos graxos livres (AGL), que podem ser reconhecidos por *toll-like* receptor (TLR), são ativadas por essa via as proteínas IKKβ e JNK, que fosforilam o ISR1 em resíduos de serina (Ser), promovendo uma inativação da via de sinalização da insulina. A *Uncaria tomentosa* (Ut) reduziu a atividade da IKKβ e JNK, dessa forma estas proteínas não fosforilam o IRS1ser, promovendo uma melhora na sensibilidade a insulina.

- A DH é capaz de induzir DGHNA em camundongos C57Bl6, com características de NASH incipiente, ou seja, com balonização de hepatócitos, infiltrado inflamatório, presença de deposição de fibras colágenas em espaços vasculares hepáticos e aumento da ALT sanguínea, por outro lado, o camundongo obeso mutante com ausência da leptina, embora também tenha esteatose hepática, as características morfológicas de NASH são mais frustras.
- A despeito da diferença entre as massas corporais totais dos dois modelos de obesidade, ambos apresentaram reduzido gasto energético, reduzida tolerância à glicose e à insulina em comparação aos animais magros. Além disso, o perfil inflamatório avaliado nos fragmentos hepáticos mostrou que nos animais com DH há maior quantidade de células marcadas com F4/80 do que nos ob/ob, que por sua vez expressam maior quantidade de RNAm para arginase 1 do que os da DH.
- O tratamento com o extrato da UT foi capaz de reduzir em aproximadamente 22% a massa corporal dos obesos induzidos pela DH, sem impacto nos ob/ob. Além disso,

foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina nos animais magros, reverter a intolerância à glicose nos mutantes e a resistência à insulina nos alimentados com a DH.

- O tratamento com a UT foi capaz de aumentar o gasto energético dos alimentados com a DH, porém sem interferir nos mutantes ou controles magros. O tratamento com UT foi capaz de reverter a resistência à insulina no fígado dos animais obesos, com recuperação parcial ou total da intensidade de fosforilação induzida pelo hormônio no IRS-1 e AKT. Além disso, foi capaz de reduzir a atividade/fosforilação de cinases intracelulares centrais na via inflamatória, Ikkβ e JNK, e a fosforilação no resíduo Ser^{307} do IRS-1, que interfere com a ação insulínica, nesse mesmo tecido.
- O tratamento com extrato de *Uncaria tomentosa* atenuou a DGHNA em ambos modelos de obesidade, e reduziu a presença dos infiltrados inflamatórios e a deposição de fibras colágenas nos espaços vasculares hepáticos em camundongos obesos pela DH.
- Em conjunto, esses dados fornecem evidências experimentais, pela primeira vez, de que o tratamento com *Uncaria tomentosa* deve ser avaliado como potencial abordagem terapêutica no combate a obesidade, a desregulação da glicemia e a DGHNA em início da progressão a esteato-hepatite.

REFERÊNCIAS

ABAJO, C.; BOFFILL, M.; CAMPO, J.; ALEXANDRA, M.; GONZALEZ, Y.; MITJANS, M.; PILAR, V. M. *In vitro* study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidenspilosa.* **J Ethnopharmacol**, 93: 319-23, 2004.

AGOUNI, A.; OWEN, C.; CZOPEK, A.; MODY, N.; DELIBEGOVIC, M. *In vivo* differential effects of fasting, re-feeding, insulin and insulin stimulation time course on insulin signaling pathway components in peripheral tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, 401 (1): 104–111, 2010.

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

AKINGBEMI, B. T. Adiponectin Receptors in Energy Homeostasis and Obesity Pathogenesis. **Prog Mol Biol Transl Sci**, 114, 2013.

AKRAMI, M.; HAMID, A.; KHALIU, A.; GHAFFAR4, A.; TAYYABA, N.; SAEED, A.; ALF, M.; NAVEED, A. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodula tory activity of plants. **Int JImmunopathol pharmacol**, 27 (3): 313-319, 2014

ALLEN-HALL, L.; CANO, P.; ARNASON, J. T.; ROJAS, R.; LOCK, O.; LAFRENIE, R. M. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression if IL-1β and TNF-α. **J Ethnopharmacol**, 109: 312–317, 2007.

ALLEN-HALL, L.; ARNASON, J. T.; CANO, P.; LAFRENIE, R.M. Uncariatomentosa acts as a potent TNF-α inhibitor through NF-κB. **J Ethnopharmacol**, 127: 685–693, 2010.

ALONSO, L.C.; EATANABE, Y.; STEFANOVISKI, D.; LEE, E.J.; SINGAMSETTY, S.; ROMANO, L.C.; ZOU, B.; GARCIA-OCANA, A.; BERGMAN, R.N.; O'DONNELL, C.P. Simultaneous measurement of insulin sensitivity, insulin secretion and the disposition index in conscious unhandled mice. **Obesity (Silver Spring),** 20(7): 1403-1412, 2012.

ALONZO, V. R.; GUARNER, R. Linging the gut microbiota to human health. **Br J Nutr**, 109: S21–S26, 2013.

ANDRIKOPOULOS, S.; BLAIR, A. R.; DELUCA, N.; FAM, B. C.; PROIETTO, J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** 295: 1323–1332, 2008.

AQUINO, R.; DE SIMEONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C.; STEIN, M.L. Plant metabolites stucture and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **J Nat Prod**, 52, 679–685, 1989.

ARKAN, M. C.; HEVENER, A. L., GRETEN, F. R.; Maeda, S.; LI, Z. W.; LONG, J. M.; WYNSHAW-BORIS, A.; POLI, G.; OLEFSKY, J.; KARIN, M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat Med**, 11:191-98, 2005.

BALLAND, E; COWLEY, MA. New insights in leptin resistance mechanisms in mice, **Front Neuroendocrinol**, 2015.

BARAYA, Y. S.; WONG, K. K.; YAACOB, N. S. The Immunomodulatory Potential of Selected Bioactive Plant-Based Compounds in Breast Cancer: A Review. Anticancer Agents Med Chem, 17(6):770-783, 2017.

BERETTA, M.; BAUER, M.; HIRSCH, E. PI3K signaling in the pathogenesis of obesity: The cause and the cure. **Adv Biol Reg**, 58: 1-15. 2015.

BERLOT, L. C.; ADAMS, L. A. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Int J Mol Sci,** *17*(5), 774, 2016.

BONORA E, MOGHETTI P, ZANCANARO C, CIGOLINI M, QUERENA M; CACCIATORI, V.; CORGNATI, A.; MUGGEO. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, 68: 374–378, 1989.

BROWN, G. T.; KLEINER, D. E. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **Metabolism**, 2015.

BURGERING, B. M.; COFFER, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3- OH kinase signal transduction. Nature, 376: 599–602, 1995.

BURT, A.D.; MUTTON, A.; DAY, C.P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. **Semin Diagn Pathol**, 15: 246–258, 1998.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **J Ethnopharmacol,** v.100, p.131-134, 2005.

CAMPOREZ, J. P. G.; KANDA, S.; PETERSEN, M. C.; JORNAYVAS, F.R.; SAMUEL, V. T.; BHANOT, S.; PETERSEN, K. S.; JURKZAC, M. J.; SHULMAN, G. I. ApoA5 knockdown improves whole-body insulin sensitivity in high-fat-fed mice by reducing ectopic lipid content. **J Lipid Res**, 56, 2015.

CATTA-PRETA, M.; MENDONCA, L. S.; FRAULOB-AQUINO, J.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. **Virchows Arch**, 459:477–485, 2011.

COPPS, K. D.; HANCER, N. J.; OPARE-ADO, L.; QIU, W.; WALSH, C.; WHITE, M. F. Irs1 serine 307 promotes insulin sensitivity in mice. **Cell Metab***.*11, 84–92, 2010.

CONTI, M.; MORAND, P.C.; LEVILLAIN, P.; LEMONNIER, A. Improved Fluorometric Determination of Malonaldehyde. **Clin.Chem***.* 37 (7): 1273-1275, 1991.
Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell.** 103: 239–252, 2000.

DEBNATH, M.; AGRAWAL, S.; AGRAWAL, A.; DUBEY, G. P. Metaflammatory responses duringobesity: Pathomechanism and treatment. **Obes Res Clin Pract**, 2015.

DEFRONZO, R.A. Banting Lecture From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, 58:773–95, 2009.

DIETRICH, F.; PIETROBON MARTINS, J.; KAISER, S.; MADEIRA Silva, R. B.; Rockenbach, L.; ALBANO Edelweiss, M. I.; OETEGA, G. G.; MORRONE, F. B.; CAMPOS, M. M.; BATTASTINI, A. M. The Quinovic Acid Glycosides Purified Fraction from Uncariatomentosa Protects against Hemorrhagic Cystitis Induced by Cyclophosphamide in Mice. **PLoSONE** 10 (7): e0131882, 2015.

D'SOUZA, A.M.; NEUMANN, U.H.; GLAVAS, M.M.; KIEFFER, T.J. The glucoregulatory actions of leptin. **Mol. Metab.** 6(9): 1052-1065, 2017.

ERTUNC, M. E.; HOTAMISLIGIL, S. G. Lipid signaling and lipotoxicity in metabolic inflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. **J Lipid Res,** 57: 2099–2114, 2016.

FANG, W.; BI, D.; ZHENG, R.; CAI, N.; XU, H.; ZHOU, R.; LU, J.; WAN, M.; XU, X. Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. **Sci Rep**, 7: 1663, 2017.

GELONESE, B.; TAMBASCIA, M. A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**., 50 (2): 208-215, 2006.

GRAVES, D. B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. **J Phys D**, 45 (26): 1–42, 2012.

GUILHERME, A.; VIRBASIUS, J.V.; PURI, V.; CZECH, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**., 9: 367-377, 2008.

HANÇER, N. J.; QIU, W.; CHERELLA, C.; LI, Y.; COPPS, K. D.; WHITE, M.F. Insulin and Metabolic Stress Stimulate Multisite Serine/Threonine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 and Inhibit Tyrosine Phosphorylation. **J Biol Chem,** 289: 12467–12484, 2014.

HARDIN, S. R. Cat's claw: An Amazonian vine decreases inflammation in osteoarthritis. **Complement Ther Clin Practice**, 13: 25–28, 2007.

HAY, N. Akt isoforms and glucose homeostasis – the leptin connection. **Trends Endocrinol Metab**, 22 (2), 2011.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GORGUN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M., HOTAMISLIGIL, G. S. A central role for JNK in obesityand insulin resistance. **Nature***,* 420: 333–6, 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. **Int J Obes Relat Metab Disord,** 27: 53–55, 2003.

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

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and Diabetes. **Int J Obes (Lond),** 32 (Suppl 7): S52–S54, 2008.

HUANG, S.; RUTKOWSKY, J. M ; SNODGRASS, R. G.; ONO-MOORE, K. D.; SCHNEIDER, D. A.; NEWMAN, J. W.; ADAMS, S. H.; HWANG, D. H. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. **J Lipid Res,** 53(9): 2002–2013, 2012.

HUANG, N.; JIN, H.; ZHOU, S.; SHI, J.; JIN, F. TLR4 is a link between diabetes and Alzheimer's disease. **Behav Brain Res**, 316: 234–244, 2016

HUBLER, M. J.; KENNEDY, A. J. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. J Nutr Biochem, 34: 1–7, 2016.

IGOILLO-ESTEVE, M.; MARSELLI, L.; CUNHA, D. A.; LADRIÈ, L.; ORTIS, F.; GRIECO, F. A.; DOTTA, F.; WEIR, G. C.; MARCHETTI, P.; EIZIRIK, D. L.; CNOP, M. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. **Diabetology**, 53 (7): 1395-405, 2010.

JIN, C.; FLAVELL, R. A. Innate sensors of pathogen and stress: Linking inflammation to obesity. **J Allergy Clin Immunol,** 1 (32): 287–94, 2013.

JIN, R; VOS, MB. Fructose and liver function – is this behind nonalcoholic liver disease? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 18 (5): 490–495, 2015.

KATO, K.; TAKAMURA, T.; TAKESHITA, Y.; RYU, Y.; MISU, H. Ectopic Fat Accumulation and Distant Organ-Specific Insulin Resistance in Japanese People with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Plos One** ,9: e92170, 2014.

KIM, J. K.; FILLMORE, J. J.; SUNSHINE, M. J.; ALBRECHT, B.; HIGASHIMORI, T.; KIM, D. W.; LIU, Z. X.; SOOS, T. J; CLINE, G. W.; O'BRIEN, W. R.; LITTMAN, D. R.; SHULMAN, G. I. PKC-θ knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. **J Clin Invest,** 114: 823–827, 2004.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **J Nat Prod**, 74 (3): 496-511, 2011.

KOBYLIAK, N.; VIRCHENKO, O.; FALALYEYEVA, T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. Nutr J, 15: 43, 2016.

KONRAD, D.; WUEEST, S. The Gut-Adipose-Liver Axis in the Metabolic Syndrome. **Physiology**, 29: 304–313, 2014.

LECLERCQ, I. A.; DA SILVA MORAIS, A.; SCHROYEN, B.; VAN HUL, N.; GEERTS, A. Insulin resistance in hepatocytesand sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. **J Hepatol**, 47: 142–156, 2007.

LEE, CY. The Effect of High-Fat Diet-Induced Pathophysiological Changes in the Gut on Obesity:What Should be the Ideal Treatment? **Clin Transl Gastroenterol**, 4: e39, 2013.

LEFRANC, C.; FRIEDERICH-PERSSON, M.; PALACIOS-RAMIREZ, R.; NGUYEN DINH CAT, A. Mitochondrial oxidative stress in obesity: role of the mineralocorticoid receptor. **J Endocrinol**, 238 (3): R143-R159, 2018.

LINDSTRÖM, P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. **Sci World***,* 7: 666–685, 2007.

LITTLE, T. J.; FEINLE-BISSET, C. Effects of dietary fat on appetite and energy intake in health and obesity--oral and gastrointestinal sensory contributions. **Physiol Behav,** 104 (4): 613–620, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)). **Method Methods,** 25 (4): 402–408, 2001.

LUMENG, CN; BODZIN, JL; SALTIEL, AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest***,* 117: 175–184 (2007).

MACHADO, M. V.; MICHELOTTI, G. A.; XIE, G.; ALMEIDA PEREIRA, T.; BOURSIER, J.; BOHNIC, B.; GUY, C. D.; DIEHL, A. M. Mouse models of diet- induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. **PLoS One**, 10 (5): e0127991, 2015.

MAHLI, A.; HELLERBRAND, C. Alcohol and Obesity: A Dangerous Association for Fatty Liver Disease. **Dig Dis**, 34 (suppl 1): 32–39, 2016.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. **Cell**, 129, 2007.

MARCEAU, F.; LARRIVÉE, J. F.; BOUTHILLIER, J.; BACHVAROVA, M.; HOULE, S.; BACHVAROV, D. R. Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 an B2 receptor expression in the rabbit. **Am J Physiol**, 46: 1568-1578, 1999.

Montoro, P.; Carbone, V.; Quiroz, J. D. Z.; De Simone, F.; Pizza, C. Identification and Quantification of Components in Extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. **Phytochem Anal,** 15: 55–64, 2004.

MULLER, M. J.; BOSY-WESTPHAL, A. Adaptive thermogenesis with weight loss in humans. **Obesity***,* 21, 218–28, 2013.

NAGLE, C. A.; KLETT, E. L.; COLEMAN, R. A. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. **J Lipid Res**, 50: S74-9, 2009.

NAGARAJAN, P; KUMAR, MJM; VENKATESAN, R; MAJUNDAR, SS; JUYAL, RC. Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol***,* 18(11): 1141-1153, 2012.

NAIMI, M.; GAUTIER, N.; CHAUSSADE, C.; VALVERDE, A. M.; ACCILI, D.; OBBERGHEN, E. V. Nuclear forkhead box O1 controls and inte- grates key signaling pathways in hepatocytes. **Endocrinology,** 148: 2424–2434, 2007.

ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. **Science,** 339: 172–177, 2013.

OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nat Med,** 18 (3): 363-74, 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, 29 (9): e 45, 2001.

OUSHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, 1 (2): 85–97, 2011.

POLYZOS, S. A.; MANTZOROS, C. S. Adiponectin as a target for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis with thiazolidinediones: A systematic review. **Metab Clin Exp**, 65: 1297 – 1306, 2016.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, proox- idants, and antioxidants: the interplay. BioMed Res Int, 2014.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASAIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antiox- idants and human diseases. **Clin Chim Acta**, 436: 332–347, 2014.

Raybould, H. E. Gut microbiota, epithelial function and derangements in obesity. **J Physiol**, 590(Pt 3): 441–446, 2012.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation. **Faseb J,** 22: 659–661, 2007.

REYES, J. A. O.; PLANCARTE, A. A. BASES MOLECULARES DE LAS ACCIONES DE LA INSULINA. **Reb**, 27(1): 9-18, 2008.

RISDALE, C.E. A revision of Mitragyna and Uncaria (Rubiaceae). **Blumea**, 24, 43–100, 1978.

ROBINSON, C. E.; KESHAVARZIAN, A.; PASCO, D. S.; FROMMEL, T. O.; WINSGIP, D. H. HOLMES, E. W. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. **Anal Biochem**, 266 (1): 48-57, 1999.

ROCHA, D. M.; CALDAS, A. P.; OLIVEIRA, L. L; BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H. H. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. **Atherosclerosis**, 244: 211e215, 2016.

ROLEIRA, F. M. F.; TAVARES-DA-SILVA, E. J.; VARELA, C. L.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. **Food Chemistry**, 183: 235–258, 2015.

SAH, S. P.; SINGH, B.; CHOUDHARY, S.; KUMAR, A. Animal models of insulin resistance: A review. **Pharmacol Rep**, 68: 1165–1177, 2016.

SAMUEL, V. T.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. **Lancet**, 375 (9733): 2267–2277, 2010.

SAMUEL, V. T.; SHUMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **J Clin Invest**, 126, 2016.

SANDOVAL-CHACÓN, M.; THHOMPSON, J. H.; ZHANG, X. J.; LIU, X.; MANNICK, E. E.; SANDOWSKA-KROWICKA, H.; CHAMBONNET, R. M.; CLARK, D. A.; MILLER, M. J. S. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF-kB. **Aliment Pharmacol Ther**, 12: 1279-1289, 1998.

SANSINANEA, A.S.; CERONE, S.I.; ZONCO, I.; GARCÍA, C.; AUZA, N. Serum leptin levels in cattle with different nutritional conditions. **Nutr Res**., 21 (7):1045–1052, 2001.

SHARIFNIA, T.; ANTOUN, J.; VERRIERE, T. G. C.; SUAREZ, G.; WATTACHERIL, J.; WILSON, K.T.; PEEK JR., R. M.; ABUMRAD, N. N.; FLYNN, C. R. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 309: G270–G278, 2015.

SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M. P. Adipose inflammation, insu- lin resistance, and cardiovascular disease. **J Parenter Enter Nutr**, 32: 638–644, 2008

SHEN J, OBIN MS, ZHAO L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. **Mol Aspects Med,** 34 (1): 39–58, 2013.

SHERWIN, C. M.; CHRISTIANSEN, S. B.; DUNCAN, I. J. H.; ERHARD, H. W.; LAY, D. C.; MENCH, J. A.; O'CONNOR, C. E.; PETHERICK, C. J. Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research. Appl Anim Behav Sci, 81: 291-305, 2003.

SHI, H.; MAIA, V.;KOKOEVA, K. I.; TZAMELI, I.; YIN, H.; JEFFREY, S. Flier TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. **J Clin Invest**, 116 (11): 3015-3025, 2006.

SHIN, S.; CHO, H.; SONG, S.; SONG, D. Catalase and nonalcoholic fatty liver disease. Pflügers Archiv - Eur J Physiol, 2018.

SHUMAN, G. I. Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. **N Engl J Med,** 12: 371, 2014.

STEFAN, N.; HÄRING, H.; CUSI, K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. Lancet **Diabetes Endocrinol**,18: 30154-2, 2018

SZKUDELSKI, T. Intracellular Mediators in Regulation of Leptin Secretion from Adipocytes. **Physiol Res**, 56: 503-512, 2007.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. TOLL-LIKE receptors. **Annu Rev Immunol**. 21:335–76, 2003.

TANTI, J. F.; GRHMEAUX, T.; OBBERGHEN, E. V.; MARCHAND-BRUSTEL, Y. L. Serine/threonine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 Modulates Insulin Receptor Signaling. **J Biol Chem***,* 269: 6051–6057, 1994.

TRAK-SMAYRA, V.; PARADIS, V.; MASSART, J.; NASSER, S.; MASSART, J.; JEBARA, V.; BERNARD, B. Pathology of the liver in obese and diabetic ob⁄ob and db⁄db mice fed a standard or high-calorie diet. **Int J Exp Path,** 92: 413–421, 2011.

TUCKER, P. S.; FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R. J. Can Exercise Minimize Postprandial Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes? **Curr Diabetes Rev,** *4,* 309-319 (2008).

VELLOSO, L. A.; FOLLI, F.; SAAD, M. J. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation. **Endocrine Reviews***,* 36: 245–71, 2015.

VINOLO, M. A.; RODRIGUES, H. G.; FESTUCCIA, W. T.; CRISMA, A. R.; ALVES, V. S.; MARTINS, A. R.; AMARAL, C. L.; FIAMONCINI, J.; HIRABARA, S. M.; SATO, F. T.; FOCK, R. A.; MALHEIROS, G.; DOS SANTOS, M. F.; CURI, R. Tributyrin attenuates obesity-associated inflammation and insulin resistance in high-fat feed mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 303: E272-82, 2012.

ZAFAR, U.; KHALIQ, S.; AHMAD, H. U.; MANZOOR, S.; LONE, K. P. Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. Hormones (Athens)., 17 (3):299-313, 2018.

ZHAO, R.; FUENTES-MATTEI, E.; VELAZQUEZ-TORRES, G.; SU, C. H.; CHEN, J.; LEE, M. H.; YEUNG, S. C. Exenatide improves glucocorticoid induced glucose intolerance in mice. **Diabetes Metab Syndr Obes,** 4: 61–65, 2011.

ZHOU, Y.; RUI, L. Leptin signaling and leptin resistance. **Front Med**, 7 (2): 207–222, 2013.

WANG, M.; CHEN, F.; WANG, J.; ZENG, Z.; YANG, Q.; SHAO, S. Th17 and Treg lymphocytes in obesity and Type 2 diabetic patients. **Clin Immunol**, (18): 30406-6, 2018.

WASIM, M; AWAN, FR; NAJAM, SS; KHAN, AR; KHAN, HN. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. **Biochem Genet**, 2015.
WEIB, J.; RAU, M; GEIER, A. Non-alcoholic fatty liver disease: epidemiol- ogy, clinical course, investigation, and treatment. **Dtsch Arztebl Int**, 111: 447–452, 2014.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest,** 115 (5), 2005.

WHEATCROFT, S. B.; WILLIAMS, I. L.; SHAH, A. M.; KEARNEY, M. T. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. **Diabet Med,** 20: 255–68, 2003.

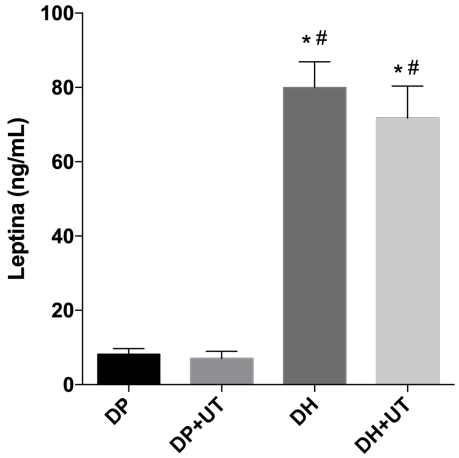
WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **Clin Biochem Rev**, 26:19, 2005.

YOSHIHARA, E.; FUJIMOTO, S.; INAGAKI, N.; OKAWA, K.; MASAKI, S.; YODOI, J.; MASUTANI, H. Disruption of TBP-2 ameliorates insulin sensitivity and secretion without affecting obesity. **Nat Commun,** 1: 127, 2010.

ANEXOS

A Resultados Adicionais

1 Leptinemia

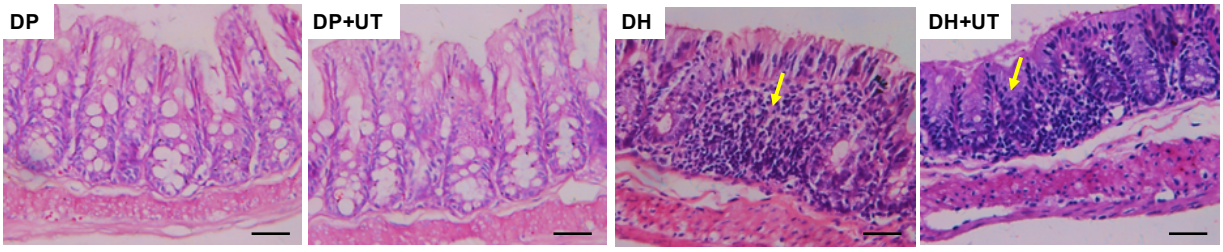


As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados com DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparados com DP+UT), (n = 3 - 5).

2 Efeito da *Uncaria tomentosa* no intestino

2.1 Inflamação intestinal

Figura 1 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre o intestino de animais alimentados com dieta hiperlipídica

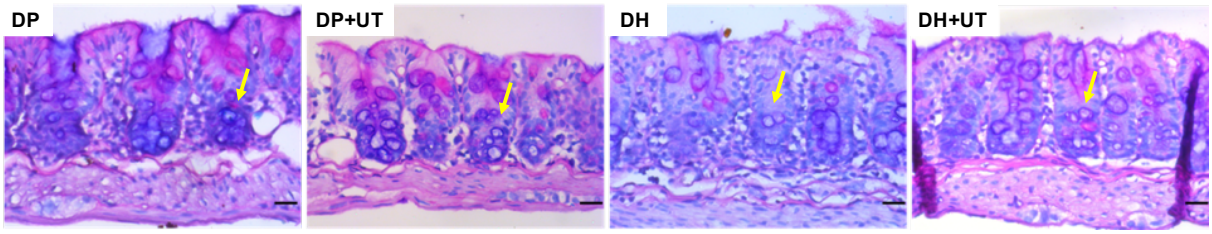


De acordo com uma análise qualitativa, foi observada um aumento da inflamação na região cecal dos animais alimentados com DH, e o tratamento com UT reduziu esse processo inflamatório. Imagens microscópicas do intestino com coloração em H & E. As siglas indicam, DP (Dieta Padrão), DP+UT (Dieta Padrão + *Uncaria tomentosa*), DH (Dieta Hiperlipídica), DH+UT (Dieta Hiperlipídica + *Uncaria tomentosa*). As setas em amarelo apontam o infiltrado inflamatório. Barra de escala de 50 µm e aumento de 400X.

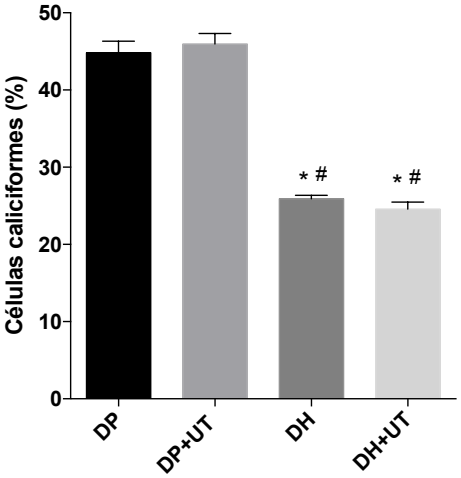
2.1.1 Função de barreira intestinal

2.1.1.1 Células caliciformes

Figura 2 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre as células caliciformes de animais alimentados com dieta hiperlipídica



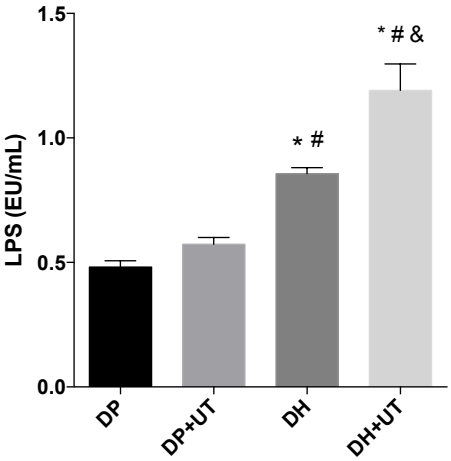
Imagens microscópicas do intestino com coloração em ácido periódico de shift. As setas em amarelo apontam as células caliciformes. Barra de escala de 50 µm e aumento de 400X.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados com DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparados com DP+UT), (n = 3 - 5).

2.1.1.2 Dosagem de Lipopolissacarídeo (LPS) no sangue

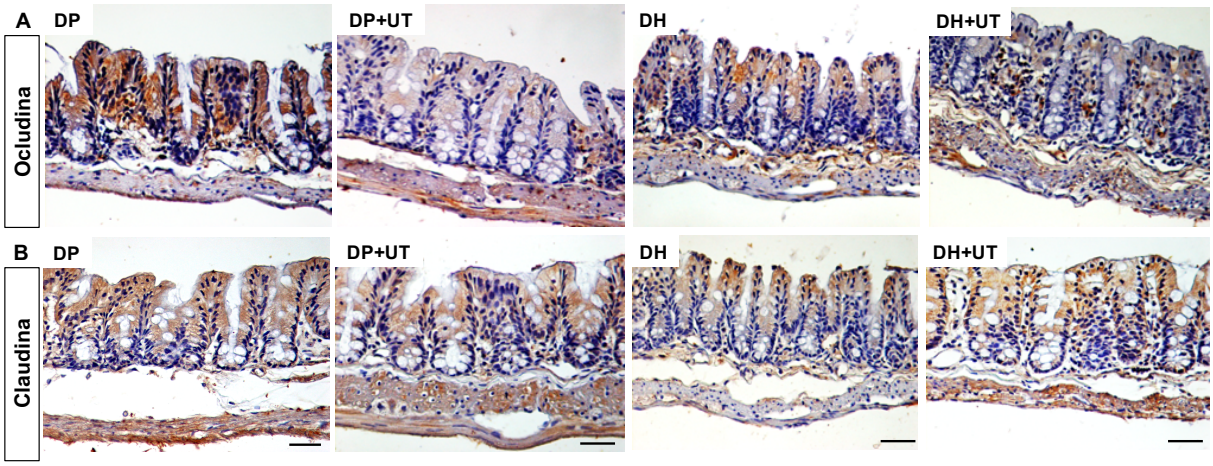
Figura 3 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre concentração sanguínea de LPS de animais alimentados com dieta hiperlipídica



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, $^{*}p < 0,05$ (comparados com DP), $^{\#}p < 0,05$ (comparados com DP+UT), $^{\&}p < 0,05$ (comparados com DH) (n = 5).

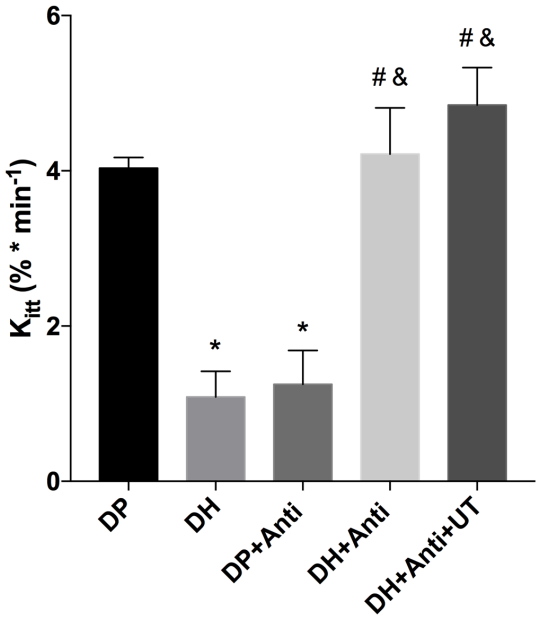
2.1.1.3 Expressão de junções comunicantes

Figura 4 – Efeito da *Uncaria tomentosa* sobre as junções comunicantes de animais alimentados com dieta hiperlipídica

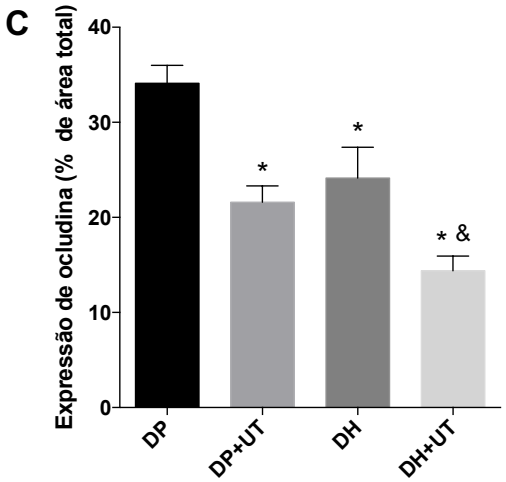


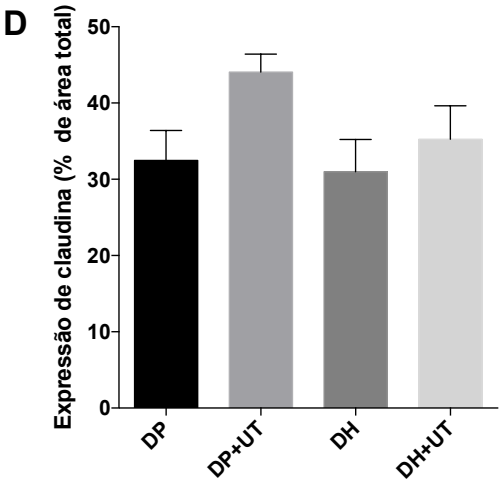
Imagens microscópicas do intestino com marcação das junções comunicantes ocludinas e claudinas. A coloração em marrom corresponde a marcação das junções por imunohistoquímica. Barra de escala de 50 µm e aumento de 400X.

2.1.2 Bactérias intestinais x sensibilidade a insulina



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (comparados com DP), $^{\#}p$ < 0,05 (comparados com DH) $^{\&}p$ < 0,05 (comparados com DP + Anti) (n = 5). As siglas indicam, DP (Dieta Padrão), DH (Dieta Hiperlipídica), DP+Anti (Dieta Padrão + Antibiótico), DH+Anti (Dieta Hiperlipídica + Antibiótico), DH+Anti+UT (Dieta Hiperlipídica + Antibiótico+*Uncaria tomentosa*). Antibióticos (Ampicilina: dose 1 g/L; Neomicina: dose 0,5 g/L), antiprotozoário (Metronidazol: dose 1 g/L).





As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA "two-way" seguido do pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 (comparados com DP), $^{\&}p$ < 0,05 (comparados com DH) (n = 5).

B Artigo publicado da tese

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Uncaria tomentosa improves insulin sensitivity and inflammation in experimental NAFLD

Received: 1 March 2017
Accepted: 22 June 2018
Published online: 20 July 2018

Layanne C. C. Araujo[1], Karla B. Feitosa[2], Gilson M. Murata[1], Isadora C. Furigo[1], Simone A. Teixeira[2], Camila F. Lucena[1], Luciene M. Ribeiro[1], Marcelo N. Muscará[2], Soraia K. P. Costa[2], José Donato Jr[1], Silvana Bordin[1], Rui Curi[3] & Carla R. O. Carvalho[1]

We investigated the effect of the crude herbal extract from *Uncaria tomentosa* (UT) on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in two models of obesity: high fat diet (HFD) and genetically obese (ob/ob) mice. Both obese mouse models were insulin resistant and exhibited an abundance of lipid droplets in the hepatocytes and inflammatory cell infiltration in the liver, while only the HFD group had collagen deposition in the perivascular space of the liver. UT treatment significantly reduced liver steatosis and inflammation in both obese mouse models. Furthermore, serine phosphorylation of IRS-1 was reduced by 25% in the HFD mice treated with UT. Overall, UT treated animals exhibited higher insulin sensitivity as compared to vehicle administration. In conclusion, *Uncaria tomentosa* extract improved glucose homeostasis and reverted NAFLD to a benign hepatic steatosis condition and these effects were associated with the attenuation of liver inflammation in obese mice.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by ectopic fat accumulation in the liver of people with no previous history of alcohol abuse, and affects about 1 billion people worldwide. NAFLD is a global public health problem associated with an increased prevalence of obesity, and is regarded as a hepatic manifestation of the metabolic syndrome[1]. NAFLD has a prevalence of approximately 30% in the adult population of developed countries, and it has also become a frequent liver disease in children, due to increased prevalence of childhood obesity[2]. NAFLD can be classified as simple steatosis or nonalcoholic steatohepatitis (NASH)[3–5]. Despite the benign clinical course of steatosis, one third of people with NAFLD have NASH. NASH, on other hand, is a progressive disease that can progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma[6].

Despite some tremendous worldwide efforts to combat obesity, the synthetic drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) such as: orlistat, lorcaserin, fentermin-topiramate, rimonabant, and sibrutamin/meridian have collateral side effects that have made some of them inappropriate for prolonged usage. In fact, the use of these drugs has been associated with an increased occurrence of hypertension, cardiac diseases, hepatic failure, as well as cognitive and psychiatric effects. Surgical interventions, on the other hand, are associated with co-morbidities and have high costs. Thus, our goal is to investigate a novel, prospective therapeutic option against obesity and its co-morbidities, based on the crude extract of *Uncaria tomentosa*.

The crude extract of *Uncaria tomentosa*, also known as cat's claw, contains a mixture of quinovic acid glycosides, polyphenols and tetracyclic or pentacyclic oxindolic alkaloids, such as pteropodine, isopteropodine, speciophylline, uncarine F, mitraphylline and isomitraphylline. These secondary metabolites have anti-inflammatory properties[7–11]. In parallel with its known anti-inflammatory effect, this herbal medicine, has been used to reduce adverse chemotherapy side-effects, gastric ulcer, viral infections, urinary tract disease, arthritis and general inflammatory conditions[12,13].

Here we administered an equivalent human dosage of *Uncaria tomentosa* (UT) for five consecutive days to two distinct rodent models of obesity: high fat diet (HFD) and genetically obese (ob/ob) mice. The results demonstrated that obese mice administered UT showed an improvement in insulin sensitivity and NASH, as well as decreased lipid accumulation and inflammation. Our data suggests that the herbal medicine, cat's claw, has the potential to combat insulin resistance and NAFLD, which are two features associated with obesity.

[1]Department of Physiology and Biophysics, University of São Paulo, São Paulo, 05508-900, Brazil. [2]Department of Pharmacology, Institute of Biological Science, University of São Paulo, São Paulo, 05508-900, Brazil. [3]Interdisciplinar Post-Graduate Program in Health Sciences, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, SP, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.R.O.C. (email: croc@icb.usp.br)

C Artigo publicado de colaboração

Life Sciences 202 (2018) 110–116

Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Dehydroepiandrosterone supplementation is not beneficial in the late postmenopausal period in diet-induced obese rats

Caio Jordão Teixeira[a], Luciene Maria Ribeiro[a], Katherine Veras[b], Layanne Cabral da Cunha Araujo[a], Rui Curi[c], Carla Roberta de Oliveira Carvalho[a,*]

[a] Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, 1524 Prof. Lineu Prestes Ave., ICB 1, Sao Paulo 05508-900, SP, Brazil
[b] Department of Nutrition, University of Mogi das Cruzes, 200 Dr. Cândido X. A. Souza Ave., Sao Paulo 08780-911, SP, Brazil
[c] Interdisciplinary Post-Graduate Program in Health Sciences, Cruzeiro do Sul University, 868 Galvao Bueno, Sao Paulo 01506-000, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Dehydroepiandrosterone
Menopause
Insulin resistance
Skeletal muscle

ABSTRACT

Aims: Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an adrenal steroid hormone that is a precursor of sexual hormones. It is reduced during aging and is strongly associated with insulin resistance and obesity. There is evidence for beneficial effects of this steroid, in both human and animal models, during perimenopause. However, the impact of DHEA treatment during late postmenopause on glucose metabolism is not clearly documented. We tested the hypothesis that DHEA supplementation could improve insulin sensitivity in an ovariectomized obese rat model (OVX) that was fed a high-fat diet for 11 weeks.

Main methods: Female Wistar rats at 8 weeks of age were OVX or SHAM-operated. Eight weeks after the surgery, the animals were randomly treated with vehicle or DHEA for 3 weeks. Food intake, metabolic parameters and insulin sensitivity were evaluated.

Key findings: Following the ovariectomy, increased body weight gain, adiposity index, and feeding efficiency were observed, despite there being no change in food and energy intake. The OVX rats also displayed glucose intolerance, insulin resistance, decreased insulin-induced IRS1/2 tyrosine phosphorylation in the skeletal muscle, and reduced serum VLDL-c and TAG levels. OVX rats treated with 10 mg/kg DHEA (OVX + DHEA) exhibited estradiol (E_2) serum levels similar to SHAM animals, with no change in uterus mass. DHEA treatment also resulted in an increase in energy intake.

Significance: Despite the positive effects of DHEA supplementation observed in menopausal women and ovariectomized rats, a potential negative effect on glucose metabolism and insulin action in the late postmenopausal condition in diet-induced obese OVX rats are reported.

1. Introduction

Estrogens have a role in energy expenditure, body fat regulation and metabolism, and the lack of these steroids play a role in the etiology of obesity and its metabolic complications [1–3]. Surgically induced or natural menopause has been associated with higher adiposity, insulin resistance, increased mortality associated with cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus (T2DM), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [4,5]. Estrogen replacement therapy (HT), despite having some positive effects on metabolism, has been associated with an increased risk of venothrombotic episodes, stroke, and cholecystitis [6]. Thus, investigating new therapeutic strategies for postmenopausal women, rather than classic HT, is of great clinical importance.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulphate form (DHEA-S) represent one of the most abundant circulating androgen and estrogen precursors, mainly secreted by the adrenal glands, ovaries, liver and central nervous system [7–9]. Previous reports have shown that DHEA and DHEA-S are markedly decreased in human circulation during aging and have also been associated with several age-related metabolic diseases [7,10,11]. Interestingly, a specific receptor for DHEA still has not been identified. This steroid has anti-inflammatory effects, reduces the risk of cardiovascular diseases as well as fat accumulation, protects against insulin resistance in both humans [12,13] and rodents [11,14–16], and inhibits breast cancer cell line proliferation and migration [17].

We previously reported that administration of DHEA increases insulin sensitivity by activating the PI3K/Akt signaling pathway in the skeletal muscle and liver [18], improves insulin secretion in pancreatic islets of aged male rats [19] and stimulates insulin production and reduces INS-1E cell apoptosis [20]. Our group also observed how DHEA

* Corresponding author.
E-mail address: croc@icb.usp.br (C.R. de Oliveira Carvalho).

https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.052
Received 16 February 2018; Received in revised form 24 March 2018; Accepted 26 March 2018
Available online 27 March 2018
0024-3205/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

D Artigo publicado resultante de colaboração realizada durante o programa do doutorado

frontiers in Pharmacology

ORIGINAL RESEARCH
published: 24 January 2019
doi: 10.3389/fphar.2018.01547

A Guinea Pig Model of Airway Smooth Muscle Hyperreactivity Induced by Chronic Allergic Lung Inflammation: Contribution of Epithelium and Oxidative Stress

*Luiz Henrique César Vasconcelos[1†], Maria da Conceição Correia Silva[1†], Alana Cristina Costa[2], Giuliana Amanda de Oliveira[2], Iara Leão Luna de Souza[1], Fernando Ramos Queiroga[1], Layanne da Cunha Araujo[3], Glêbia Alexa Cardoso[4], Renato Fraga Righetti[5,6], Alexandre Sérgio Silva[4,7], Patrícia Mirella da Silva[1,8], Carla Roberta de Oliveira Carvalho[3,9], Giciane Carvalho Vieira[10], Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério[5], Fabiana de Andrade Cavalcante[1,11] and Bagnólia Araújo da Silva[1,12]**

[1] Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, [2] Graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, [3] Programa de Pós-graduação em Ciências (Fisiologia Humana), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [4] Programa Associado de Pós-graduação em Educação Física, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, [5] Programa Associado de Pós-graduação em Educação Física, Universidade do Pernambuco, Recife, Brazil, [6] Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [7] Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil, [8] Departamento de Educação Física, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, [9] Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, [10] Departamento de Biofísica e Fisiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [11] Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, [12] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:
Heike Wulff,
University of California, Davis,
United States

Reviewed by:
Paolo Montuschi,
Catholic University of Sacred Heart,
Italy
Thomas Taylor-Clark,
University of South Florida,
United States

***Correspondence:**
Bagnólia Araújo da Silva
bagnolia@ltf.ufpb.br

[†] These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Respiratory Pharmacology, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

Received: 16 January 2018
Accepted: 18 December 2018
Published: 24 January 2019

Citation:
Vasconcelos LHC, Silva MCC, Costa AC, Oliveira GA, Souza ILL, Queiroga FR, Araujo LC, Cardoso GA, Righetti RF, Silva AS, da Silva PM, Carvalho CRO, Vieira GC, Tibério IFLC, Cavalcante FA and Silva BA (2019) A Guinea Pig Model of Airway Smooth Muscle Hyperreactivity Induced by Chronic Allergic Lung Inflammation: Contribution of Epithelium and Oxidative Stress. Front. Pharmacol. 9:1547. doi: 10.3389/fphar.2018.01547

Asthma is a heterogeneous disease of the airways characterized by chronic inflammation associated with bronchial and smooth muscle hyperresponsiveness. Currently, different murine models for the study of asthma show poor bronchial hyperresponsiveness due to a scarcity of smooth muscle and large airways, resulting in a failure to reproduce smooth muscle hyperreactivity. Thus, we aimed to standardize a guinea pig model of chronic allergic lung inflammation mimicking airway smooth muscle hyperreactivity observed in asthmatics (Asth). Animals were randomly divided into a control group (Ctrl), which received saline (0.9% NaCl), and the Asth group, subjected to *in vivo* sensitization with ovalbumin (OVA) nebulization. Morphological analysis was performed by hematoxylin-eosin staining. Bronchial hyperresponsiveness was evaluated by nebulization time in the fifth, sixth, and seventh inhalations (NT5-7) and tracheal isometric contractions were assessed by force transducer. Total antioxidant capacity was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and protein expression by Western blot. Histologically, the Asth group developed peribronchial cellular infiltrate, epithelial hyperplasia and smooth muscle thickening. After the fourth nebulization, the Asth group developed bronchial hyperreactivity. The trachea from the Asth group contracted after *in vitro* stimulation with OVA, differing from the Ctrl group, which showed no response. Additionally, airway smooth muscle

E Artigo submetido que foi realizado em paralelo a tese

Elsevier Editorial System(tm) for Life Sciences

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Reference gene and protein expression levels in two different NAFLD mouse models

Article Type: Full length article

Keywords: obesity; non-alcoholic fatty liver disease; reference gene and protein.

Corresponding Author: Dr. Carla RO Carvalho

Corresponding Author's Institution:

First Author: Layanne Araujo

Order of Authors: Layanne Araujo; Silvana Bordin; Carla Carvalho

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: The expression levels of some reference genes and proteins are used for data normalization and quantification. However, these levels can change in response to experimental conditions or treatments. Aim: the aim of this work was to evaluate reference gene and protein expression in models of non-alcoholic fatty liver disease, using mice fed a high fat diet (HFD) and mice that are genetically obese (ob/ob). Main methods: histological staining techniques were used to verify the morphology and quantify the amount of lipid droplets present in the liver. Real time polymerase chain reaction and immunoblotting were employed for monitoring protein expression and gene expression levels, respectively. Key finding: the results showed that there was a substantial increase in the amount of lipid droplets in the livers of HFD and ob/ob animals when compared to the standard diet (SD) group. There was an observed reduction in the expression of □-actin (10%), □-tubulin (6%), GAPDH (19%) and RPL3 (15%) genes when comparing the ob/ob group to the HFD group. Additionally, the ob/ob mice displayed GAPDH protein levels that were substantially, but not significantly, reduced when compared to SD. Significance: It was concluded that there are slight differences in the expression levels of reference genes and proteins in these two NAFLD animal models, and researchers should consider these alterations when working with these models.

F Artigo submetido resultante de colaboração realizada durante o programa do doutorado

Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Acute Strength Exercise Alter Contractile And Relaxant Reactivity Of Wistar Rat Uterus And Promotes Adrenal Gland Morfofunctional Changes

Paula B. Ferreira,[1] Thiago A. R. Melo,[2] Glêbia A. Cardoso,[3] Adriano F. Alves,[4] Layanne C. da C. Araújo,[5] Luiz H. C. Vasconcelos,[4] Maria da C. C. Silva,[1] Carla R. de O. Carvalho,[5] Alexandre S. Silva,[3] Bagnólia A. da Silva[1,6]

[1] Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil.
[2] Graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil.
[3] Programa Associado de Pós-graduação em Educação Física, Universidade Federal da Paraíba/Universidade do Pernambuco, João Pessoa/Recife, 50100-130/58051-900, Brazil.
[4] Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, Brazil.
[5] Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508-900, Brazil.
[6] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 58051-900, Brazil.

Correspondence should be addressed to Bagnólia A. da Silva; bagnolia@ltf.ufpb.br.

Abstract

Strength training induces ischemia/reperfusion events that may be associated with increased production of reactive species, causing oxidative stress, damaging cell membrane and macromolecules, being related to problems in female reproductive system, such as alterations in the menstrual cycle and abortion. Thus, in this work it was evaluated the effects of a single acute section of strength exercise on adrenal and uterine histomorphometry, uterine contractile and relaxant reactivity, oxidant/antioxidant balance and ERK 1/2, JNK and SOD levels on uterus. For this, virgin female Wistar rats were divided into control (GC), G0, G12 and G24 groups, indicating the time after exercise for euthanasia and evaluations. By haematoxylin/eosin staining, it was observed an increase in the glomerulosa and fasciculate area in G24 and in medulla, as well as the vacuole number, by G12, although G0 reduced medulla and vacuole number, G12 the fasciculate, and G24 the reticulated, medulla and vacuole number. Also, G12 and G24 reduced eosinophil number in rat uterus, but increased blood vessels number and area, and the smooth muscle layer. In the contractile reactivity, for KCl, there was a reduction in effectiveness of this agent in G0 and G12, but a reversion in G24, while for oxytocin the effectiveness has been increased in all exercised groups. For relaxant reactivity, G24 despite have decreased effectiveness of nifedipine, increased its potency. However, all exercised groups reduced isoprenaline potency. There was not alteration on malondialdehyde levels in uterus and plasma, but G12 and G24 reduced

G Certificado do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada *Efeito da Uncaria tomentosa na microbiota intestinal de camundongos C57bl6*, registrada sob nº 035, nas fls. 30, do livro 03, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 23 de abril de 2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da **Lei Federal nº 11.794**, o Dr. (Dra.) Carla Roberta de Oliveira Carvalho (Investigador Principal) e os membros da equipe Gabriela Moreira, Caio Jordão Teixeira, Layanne Cabral da Cunha Araujo, Vitor Felitti. Esta licença de uso de animais expira em 23 / 04 / 2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP **até o último dia de validade da atual proposta**. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal *Effect of Uncaria tomentosa in the gut microbiota of c57bl6 mice*, registered as Number 035, in pages 30 of book 03, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 04 / 23 / 2015.

Under this license, Carla Roberta de Oliveira Carvalho (Principal Investigator) and team members Gabriela Moreira, Caio Jordão Teixeira, Layanne Cabral da Cunha Araujo, Vitor Felitti are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the **Brazilian Federal Law nº 11.794**.

This license expires in 04 / 23 / 2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 23 de abril de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. Ana Paula Lepique
Secretária- CEUA - ICB/USP