

**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**

## 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 substâncias 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 esteatose 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.

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) high 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.

## **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; KOPYLIAK ET al., 2016).

O diabetes *Mellitus* tipo 2 é uma doença metabólica, cujos mecanismos patogênicos incluem resistência à insulina e disfunção das células  $\beta$  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 patogênese de distúrbios metabólicos como a resistência à insulina (LEFRANC et al., 2018).

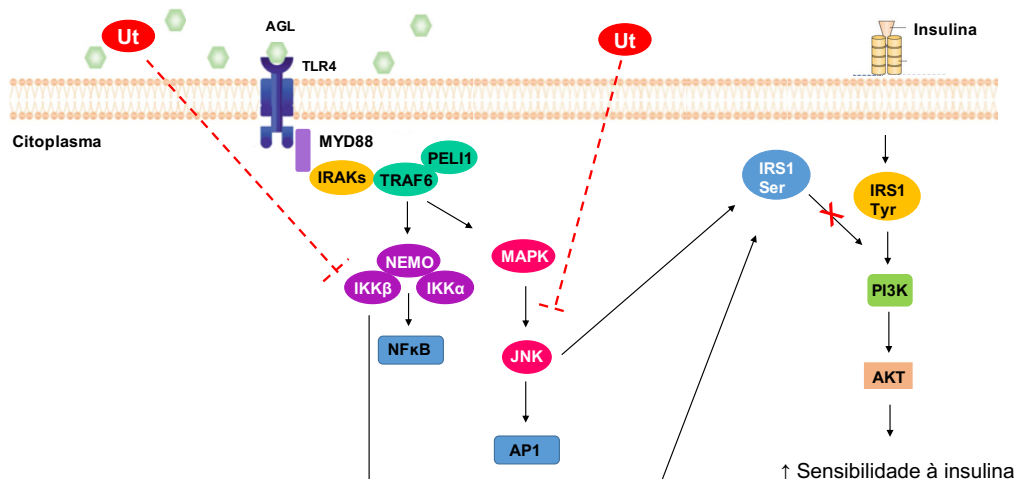
Além disso, devido a esse excesso de ácidos graxos no tecido adiposo, eles não apenas começam a ser liberados de forma livre na corrente sanguínea, como também passam a ser menos captados e estocados no tecido adiposo, passando a ser estocado em outros tecidos como muscular esquelético e hepático. A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

## Conclusão

**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 NFκB 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 IRS1 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.
- Apesar 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, Ikk $\beta$  e JNK, e a fosforilação no resíduo Ser<sup>307</sup> 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 immunomodulatory activity of plants. **Int J Immunopathol 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 of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **J Ethnopharmacol**, 109: 312–317, 2007.

ALLEN-HALL, L.; ARNASON, J. T.; CANO, P.; LAFRENIE, R.M. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- $\alpha$  inhibitor through NF- $\kappa$ B. **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. Linking 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 structure 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 during obesity: 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 *Uncaria tomentosa* Protects against Hemorrhagic Cystitis Induced by Cyclophosphamide in Mice. **PLoS ONE** 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.; VIRBASIU, 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 obesity and 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- $\theta$  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 hepatocytes and 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  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ . **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 and 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 integrates 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, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res Int*, 2014.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants 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.; THOMPSON, 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- $\kappa$ B. **Aliment Pharmacol Ther**, 12: 1279-1289, 1998.

SANSINANE, 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, insulin 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: epidemiology, 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.



