

1 INTRODUÇÃO

Obesidade e sobrepeso são definidos como acúmulo excessivo de gordura corporal, sendo o acúmulo do tecido adiposo visceral um dos principais fatores para o surgimento de comorbidades associadas à obesidade (OMS, 2017b).

A etiologia da obesidade é complexa e resulta da interação de fatores genéticos, ambientais e emocionais. Entre 1975 e 2016 a prevalência mundial de obesidade quase triplicou. Assim, considerando-se que a epigenética da espécie humana não sofreu mudanças importantes em um intervalo de poucas décadas, fatores socioambientais poderiam explicar o aumento mundial dos casos de obesidade, como o maior consumo de alimentos de grande densidade energética associado à inatividade física (OMS, 2017b).

À medida que o tecido adiposo se expande durante a progressão da obesidade, os adipócitos se tornam hipoperfundidos, desencadeando a liberação de mediadores envolvidos na inflamação, bem como o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo. Essas células potencializam o processo inflamatório no tecido, desencadeando a inflamação crônica, sistêmica e de baixa intensidade, denominada inflamação subclínica (CAPURSO; CAPURSO, 2012). Há evidências de que esse quadro inflamatório esteja relacionado ao surgimento de desordens metabólicas como resistência à insulina, diabetes *mellitus*, hiperlipidemia (HOTAMISLIGIL, 2003), artrite, hipertensão arterial, aterogênese e, conseqüentemente a síndrome metabólica (YUDIKIN, 2003).

Assim, a busca pela cura ou auxílio no tratamento da obesidade e suas comorbidades, aliada à fácil obtenção e tradição, torna comum o uso de plantas medicinais pela população. Nesse contexto, um levantamento etnobotânico realizado em Campo Grande, MS listou as principais plantas solicitadas aos raizeiros e/ou por eles indicadas. Entre essas, a carqueja foi citada por influenciar no curso da obesidade (NUNES et al., 2003). Além de ser comumente utilizada pela população, há trabalhos que confirmam os efeitos benéficos da carqueja como anti-inflamatório, antioxidante e anti-adipogênico (OLIVEIRA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2017; RABELO et al., 2018). Entretanto, não há relatos na literatura que tenham utilizado dose e modo de preparo recomendados por uma agência de regulação, como a ANVISA, para a carqueja, tampouco sobre o efeito do tratamento com essa infusão sobre as funções

celulares de macrófagos em situação de inflamação derivada de um quadro de obesidade.

Dessa forma, obtivemos um modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica em camundongos onde os parâmetros ganho ponderal, ingestão alimentar e calórica, índice de adiposidade, tolerância à insulina, perfil glicêmico, lipídico e histológico, bem como a função dos macrófagos foram estudados com ou sem o tratamento por via oral.

Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito da infusão de carqueja em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, visando validar as ações da planta que possam auxiliar o tratamento da obesidade e minimizar o surgimento de comorbidades.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) e Obesidade

As Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) são doenças multifatoriais de longa duração e que se desenvolvem no decorrer da vida, desencadeadas principalmente pela má alimentação, inatividade física, fumo de tabaco e uso nocivo de álcool. Esse conjunto de doenças é o maior desafio da saúde pública no século XXI, comprometendo o desenvolvimento social e econômico em todo o mundo (OMS, 2017a).

O último levantamento realizado pela OMS aponta que as DCNT matam cerca de 40 milhões de pessoas por ano, o equivalente a 70% das mortes que ocorrem no mundo. Ainda, as enfermidades cardiovasculares constituem a maior parcela dessas mortes (17,7 milhões por ano), seguidas do câncer (8,8 milhões), das enfermidades respiratórias (3,9 milhões) e da diabetes (1,6 milhões). Vale destacar que esses quatro grupos de enfermidades são responsáveis por mais de 80% de todas as mortes prematuras por DCNT no mundo, que ocorrem principalmente nos países de média e baixa renda. Ademais, se nenhuma intervenção eficaz para prevenção e controle dessas doenças for aplicada, estima-se que o número de mortes por DCNT poderá aumentar para 55 milhões em 2030 (OMS, 2017a).

Após reconhecer os impactos das DCNT no desenvolvimento social, econômico e na saúde pública, dirigentes de vários países elaboraram o - Plano de Ação Mundial da OMS para a prevenção e controle de doenças não-transmissíveis 2013-2020 - que mediante nove metas globais, propõe intervenções nos principais fatores causadores de DCNT a fim de reduzir em 25% as mortes prematuras por doenças crônicas e deter o aumento da obesidade global, para coincidir com as taxas do ano de 2010. Assim, a meta desse Plano de Ação Mundial é reduzir a mortalidade e morbidade evitáveis, promover melhorias na qualidade de vida dos indivíduos, minimizar a exposição a fatores de risco e reduzir o ônus socioeconômico dessas doenças, adotando abordagens que promovam o bem-estar e reduzam a desigualdade dentro dos Estados Membros e entre esses. Para tanto, possui como objetivos específicos, dentre outros, promover a alimentação saudável para a saúde e bem-estar, e promover vida ativa para prevenir obesidade (OMS, 2017b).

Os dados mais recentes apontam que 39% (cerca de 1,9 bilhão) da população adulta mundial estava com sobrepeso em 2016, e 13% (600 milhões) eram obesas, sendo que a quantidade de obesos mais que dobrou nas últimas décadas. Na comparação entre os sexos, 10,8% dos homens adultos apresentavam obesidade, enquanto entre as mulheres o índice foi de 14,9% (Figura 1). Esses dados mostram que o sexo feminino está associado a maior risco de obesidade, enquanto o excesso de peso é mais prevalente entre os homens. Ainda, cerca de 41 milhões de crianças menores de cinco anos foram diagnosticadas com sobrepeso ou obesidade. Na África, o número de crianças menores de 5 anos com excesso de peso aumentou quase 50% desde 2000. Exceto em partes da África subsaariana e Ásia, há mais pessoas com obesidade do que abaixo do peso normal em todo o mundo (OMS, 2017b). Até 2030, estima-se que 57,8% (3,3 bilhões) da população adulta mundial terá sobrepeso ou obesidade. Como tal, espera-se que a carga de doenças associadas à obesidade aumente nos próximos anos. Por isso, atualmente a obesidade representa maior ameaça à saúde pública do que a fome ou a desnutrição (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

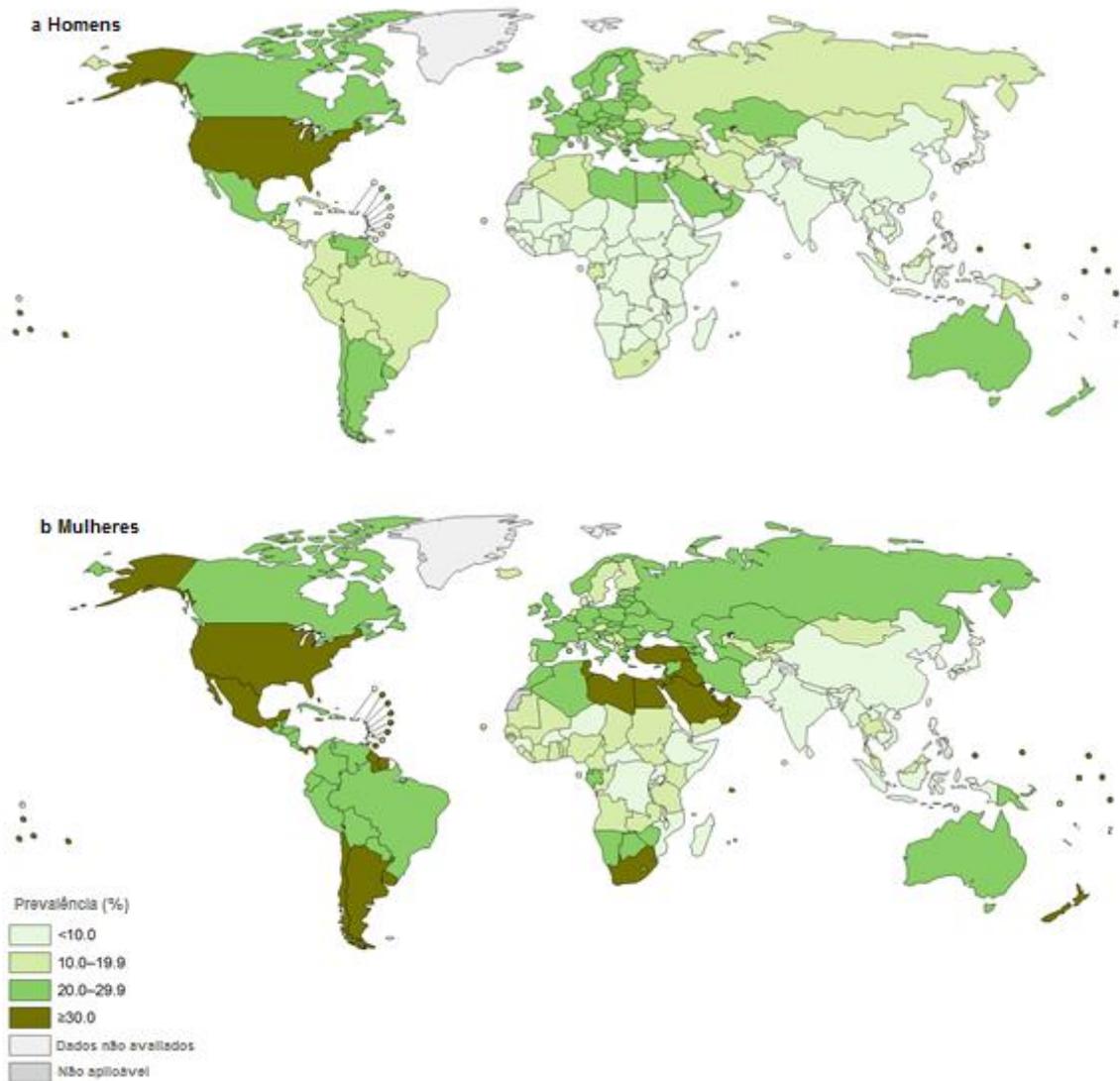


Figura 1: Prevalência mundial da obesidade em homens e mulheres maiores de 18 anos. Fonte: Adaptado de OMS, 2017.

No Brasil, a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizada pelo Ministério da Saúde em todas as capitais brasileiras e no Distrito Federal, monitorou a frequência de obesidade e sobrepeso da população. De acordo com a pesquisa, 53,8% da população brasileira encontra-se com sobrepeso, sendo mais prevalente em homens (57,7%) do que em mulheres (50,5%). Entretanto, quando no tocante à obesidade a prevalência se inverte, com 19,6% das mulheres acometidas contra 18,1% da população masculina. Ainda, os dados mostram que quanto maior o nível de escolaridade dos indivíduos, menor a taxa de sobrepeso e obesidade (BRASIL, 2017).

Vale destacar que a obesidade e suas comorbidades estão diretamente relacionadas com o aumento dos gastos diretos na saúde pública e as estimativas

futuras não são animadoras, indicando que até 2030, o aumento anual com os gastos relacionados ao excesso de peso nos Estados Unidos da América será de até US\$ 66 bilhões, enquanto no Reino Unido será de 1,9 a 2 bilhões de libras (WANG et al., 2011). Ainda, um estudo realizado pelo McKinsey Global Institute (2014) estimou que o impacto global da obesidade é de aproximadamente 2 trilhões de dólares (2,8% do produto interno bruto mundial), o que, em todo o mundo, é equivalente aos custos com tabagismo, guerra, violência e terrorismo.

Biener, Cawley e Meyrhoef (2017) revisaram em seu trabalho um estudo realizado com a população norte americana, que mostrou que quanto maior o grau de obesidade, de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC), maiores serão os custos diretos da doença com diagnósticos e tratamentos. Os autores constataram que os gastos no cuidado à saúde de indivíduos com peso normal e com sobrepeso são equivalentes. Entretanto, começam a aumentar na faixa que compreende a obesidade classe I (30-35 kg/m²), apresentando drástica ascensão na obesidade classes II (35-40 kg/m²) e III (≥40 kg/m²). Embora menos afetados pelo sobrepeso e obesidade, ultimamente chineses (SHI et al., 2017) e sul coreanos (LEE et al., 2017) também têm demonstrado preocupação com os custos elevados associados ao excesso de peso em suas populações.

No Brasil, Bahia e col. (2012) identificaram os custos do sobrepeso e obesidade na saúde da população. Segundo os autores, o Sistema Único de Saúde (SUS) gasta anualmente cerca de R\$ 3,6 bilhões com o tratamento dessas doenças, sendo R\$ 2,4 bilhões com o tratamento hospitalar (68%) e R\$ 1,2 bilhões (32%) com tratamento ambulatorial. Ainda, as doenças cardiovasculares foram as responsáveis pela maior frequência (67% dos custos), seguidas pelo tratamento do câncer. Entretanto, considerando que os custos indiretos, relativos à perda de produtividade, licenças médicas e morte prematura não foram incluídos, e os dados de gastos médicos foram obtidos por meio do banco de dados do DATASUS, ou seja, valores reembolsados às unidades de saúde. Os autores ressaltam que esses números são uma estimativa bastante conservadora dos gastos públicos com pacientes obesos, já que o custo real do tratamento é classicamente maior do que os valores reembolsados (BAHIA; ARAÚJO, 2014).

2.1.1 Classificação da Obesidade

Sobrepeso e obesidade são caracterizados pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que podem repercutir negativamente na saúde do indivíduo, com perda considerável da qualidade e expectativa de vida. Ambos resultam da interação de diversos fatores, dentre eles genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais. Porém, o rápido aumento da prevalência de excesso de peso sugere que o componente socioambiental (dieta e prática de atividade física) seja o principal responsável pela epidemia (OMS, 2017b).

Para o diagnóstico e classificação de sobrepeso e obesidade em adultos, o parâmetro mais utilizado é o IMC, pela rapidez e facilidade de cálculo. Esse é calculado dividindo-se o peso do indivíduo, em quilogramas, pelo quadrado da sua altura, em metros (OMS, 2017b). O ponto de corte para adultos baseia-se na associação entre IMC e doenças crônicas ou mortalidade. A classificação adaptada pela OMS, apresentada na Tabela 1, baseia-se em padrões internacionais desenvolvidos para pessoas adultas descendentes de europeus.

Tabela 1 – Risco de comorbidades de acordo com a classificação do IMC para adultos

IMC (kg/m²)	Classificação	Obesidade Grau/Classe	Risco de Comorbidades
< 18,5	Baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5 – 24,9	Peso normal	0	Normal
25,0 – 29,9	Sobrepeso	0	Pouco elevado
30,0 – 34,9	Obesidade	I	Elevado
35,0 – 39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥ 40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

Fonte: ABESO (2016).

Entretanto, embora seja o parâmetro mais utilizado para avaliação da adiposidade, o IMC não é totalmente correlacionado com a gordura corporal. Existem diferenças na composição corporal dos indivíduos em função do sexo, idade, etnia, no cálculo de indivíduos sedentários quando comparados a atletas, na presença de perda de estatura em idosos devido a cifose e em indivíduos edemaciados. Sendo assim, não é possível distinguir massa gordurosa de massa magra utilizando apenas o IMC. O índice ainda pode ser impreciso em indivíduos idosos, em decorrência da

perda de massa magra e superestimado em indivíduos musculosos. Dessa forma, o IMC não reflete a distribuição da gordura corporal, sendo que essa é uma informação importante na avaliação de sobrepeso e obesidade, visto que a gordura visceral (intra-abdominal) é um fator de risco potencial para doenças, independentemente da gordura corporal total. Ainda, indivíduos com o mesmo IMC podem ter diferentes níveis de massa gordurosa visceral (ABESO, 2016).

Por isso, além do IMC, existem atualmente outras ferramentas úteis para avaliar a adiposidade e sua distribuição corporal nos indivíduos, como a relação circunferência abdominal/quadril, circunferência da cintura, relação altura/circunferência abdominal, bioimpedância, calorimetria indireta, ultrassonografia, tomografia, ressonância magnética e a medição da espessura das pregas cutâneas (ABESO, 2016).

Uma vez diagnosticada, a obesidade representa um dos principais desafios que as sociedades enfrentam em todo o mundo, pois tem assumido características de uma pandemia mundial. Além disso, casos de obesidade podem ter diagnóstico de síndrome metabólica, que se refere a uma agregação de fatores de riscos cardiovasculares representada por hipertensão, obesidade abdominal, hipertrigliceridemia, baixa concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) e intolerância à glicose. O diagnóstico de síndrome metabólica é estabelecido quando três ou mais dos elementos coexistem no mesmo indivíduo (STABELINI NETO et al., 2012).

2.1.2 Etiologia da Obesidade

A obesidade é uma condição clínica multifatorial, resultante da interação de fatores genéticos, ambientais, sociais, emocionais e culturais (OMS, 2017b). Entretanto, devido à rápida ascensão dos índices de sobrepeso e obesidade nas duas últimas décadas, acredita-se que as variações na prevalência de obesidade são influenciadas predominantemente por fatores ambientais e comportamentais, particularmente pelo aumento da ingestão calórica e redução de atividade física (OMS, 2017b).

Os fatores biológicos, ambientais ou comportamentais que influenciam o peso corporal dos indivíduos alteram a ingestão ou o gasto de energia. Esses fatores interagem provocando um estado de balanço energético positivo, que ocorre quando

a ingestão de energia se sobrepõe ao gasto, gerando aumento no peso corporal do indivíduo, especialmente da massa adiposa (HILL; WYATT; PETERS, 2012).

Dentre os fatores biológicos associados ao surgimento da obesidade, podemos citar: genética, eixo cérebro-intestinal, condições neuroendócrinas, medicamentos, deficiência física e microbiota intestinal, como revisado por Kadouh e Acosta (2017).

O mapa gênico da obesidade está em constante evolução e atualmente, mais de 300 genes diferentes e marcadores de genes relacionados à obesidade foram identificados e parecem interagir com o meio ambiente para que a obesidade seja expressa (FRIEDMAN, 2003). Dessa forma, sob o ponto de vista genético, a obesidade pode ser classificada em três subgrupos: obesidade monogênica (defeito de um único gene, como por exemplo, a leptina), obesidade síndrome (anormalidades cromossômicas, como a Síndrome de Prader-Willi) e, obesidade poligênica (obesidade comum) (RAO; LAL; GIRIDHARAN, 2014).

Embora diversas formas de obesidade monogênica já tenham sido identificadas, elas são raras e principalmente decorrentes de mutações que controlam a via leptina-melanocortina, responsável por regular a ingestão de alimentos, representando cerca de 4% dos casos de obesidade grave na infância (GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015). Por sua vez, a obesidade síndrome, que já possui várias formas identificadas, geralmente está associada a algum grau de atraso cognitivo e a características dismórficas (CHUNG, 2012). Já a obesidade poligênica (multifatorial) é a que representa a maioria dos casos de obesidade em humanos. Sendo assim, a detecção de modificações genéticas com efeitos poligênicos sobre o peso corporal passa a ter grande importância clínica (HINNEY; HEBEBRAND, 2010).

No período pré-natal, o excessivo ganho de peso materno, especialmente nas primeiras 20 semanas de gestação, é um fator de risco para o desenvolvimento de sobrepeso na infância. Já o aleitamento materno exclusivo nos primeiros 6 meses de vida correlaciona-se positivamente a uma menor incidência de obesidade infantil (GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015).

A variação na composição da microbiota intestinal de indivíduos com peso ideal e sobrepeso tem sido constantemente estudada, podendo ser influenciada desde o parto e diversos estudos têm demonstrado associação entre obesidade e desequilíbrio da microbiota intestinal. Alguns pesquisadores observaram que a obesidade causada por dieta rica em gordura pode levar à redução de microrganismos intestinais do filo *Bacteroidetes* e aumento de *Firmicutes* e *Proteobacteria* em camundongos (CANI et

al., 2007; MCCARTEY; MARSHALL, 2016). Por sua vez, outros trabalhos demonstraram que uma menor diversidade microbiana, como um todo, foi associada com maior inflamação, dislipidemia, adiposidade e resistência à insulina em indivíduos franceses e dinamarqueses, quando comparados à indivíduos com padrão alimentar mais saudável, que apresentaram maior diversidade microbiana intestinal (COTILLARD et al., 2013; KONG et al., 2014).

Ainda, o grupo de Venema (2010) demonstrou que camundongos criados convencionalmente continham 40% mais gordura corporal que aqueles criados em condições livres de contaminação (*germ-free*). Após colonizarem esses com microbiota derivada do ceco de camundongos normais, os pesquisadores observaram aumento de 60% da gordura corporal em machos e 85% em fêmeas, mesmo não havendo diferenças na ingestão energética ou redução do gasto energético. Tanto as pesquisas com humanos com sobrepeso (KONG et al., 2014) quanto com camundongos alimentados com dieta rica em gordura (EVERARD et al., 2013) demonstraram redução intestinal da espécie *Akkermansia muciniphila*, uma bactéria gram-negativa que degrada o muco intestinal por utilizar a mucina como única fonte de energia. A elevação dos níveis intestinais dessa bactéria está associada à redução da endotoxemia, da gordura corporal, à melhora da sensibilidade insulínica e à proteção da integridade da barreira intestinal (EVERARD et al., 2013). Por essa razão, diversos estudos têm sido realizados a fim de obter fontes alimentares que elevem os níveis intestinais dessa espécie bacteriana (EVERARD et al., 2013; JAKOBSDOTTIR et al., 2013; CAESAR et al., 2015).

Distúrbios endócrinos também podem contribuir para o desenvolvimento do sobrepeso e obesidade, como o hipotireoidismo, deficiência do hormônio do crescimento, hipogonadismo em homens, ovariectomia, síndrome de Cushing, síndrome dos ovários policísticos (GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015; RIBEIRO, 2015), além de períodos reduzidos de sono (TAHERI et al., 2004) e deficiência de vitamina D (DING et al., 2012).

2.1.3 Tecido adiposo e adipocinas

O tecido adiposo é considerado o mais flexível dos tecidos presentes no organismo, por possuir capacidade de remodelação de tamanho e volume. Anatomicamente, ele pode ser classificado em tecido adiposo visceral, localizado

próximo ou no interior das vísceras abdominais (epididimal, mesentérico, retroperitoneal, omental e perirrenal) e tecido adiposo subcutâneo, que pode ser encontrado nos depósitos abaixo da pele (glúteo-femoral e inguinal) (KOTANI et al., 1994; VALE; LISBOA, 2013).

A obesidade visceral representa entre 10 e 20% da gordura corporal total de homens, e entre 5 e 10% da gordura total em mulheres (KAMINSKI; RANDAL, 2010). É mais comum nos homens e está relacionada ao risco aumentado de desenvolver resistência à insulina e síndrome metabólica, que precedem o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo II, além de aumentar o risco de surgimento de doenças cardiovasculares (GIRARD; LAFONTAN, 2008).

Já a obesidade subcutânea representa aproximadamente 80% da massa de gordura total em indivíduos saudáveis. Esse tipo de obesidade é mais frequente em mulheres e pode levar ao desenvolvimento de complicações vasculares e ortopédicas, como varizes e celulites. Després e col. (2008) demonstraram que as disfunções metabólicas associadas à obesidade estão correlacionadas com o aumento do tecido adiposo visceral, e não com o aumento do tecido adiposo subcutâneo. Assim, embora o tecido adiposo subcutâneo seja mais representativo em quantidade, o visceral é metabolicamente mais ativo, e o seu acúmulo é preditivo de mortalidade associada à obesidade.

A composição do tecido adiposo consiste de diversas populações celulares, como linfócitos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, estromais e pré-adipócitos, que juntamente com os adipócitos são uma fonte de citocinas e adipocinas (LEE et al., 2010). De acordo com sua composição e funções fisiológicas, o tecido adiposo divide-se em: tecido adiposo marrom (SANTHANAM et al., 2015), bege (WU et al., 2012) e branco (MATSUZAWA, 2006)

Os adipócitos do tecido adiposo marrom contribuem para o gasto de energia, via termogênese, para manter a temperatura corporal (SACKS; SYMONDS, 2013). O tecido adiposo marrom é abundante em recém-nascidos e está localizado nas regiões inter-escapular e supraclavicular, bem como em torno dos rins, coração, aorta, pâncreas e traqueia. Esses depósitos adiposos diminuem com a idade, mas ainda podem ser encontrados em adultos (SANTHANAM et al., 2015). Ainda, o tecido adiposo marrom foi negativamente correlacionado com o IMC, embora seu papel preciso na etiologia da obesidade permaneça obscuro (PRODHOMME et al., 2016)

O tecido adiposo bege, mais recentemente descoberto, ocorre dentro de depósitos de tecido adiposo branco e apresenta fenótipo semelhante ao dos adipócitos marrons clássicos, com gotas lipídicas multiloculares e alto conteúdo mitocondrial (COUSIN et al., 1992; WU et al., 2012), porém possui baixos níveis de UCP-1 (proteína desacopladora 1), que desempenha um papel chave na queima de energia e geração de calor. Esses níveis são semelhantes aos da gordura branca. Entretanto, as células bege também possuem a capacidade de incrementar sua expressão de UCP-1, em resposta a exposição crônica ao frio, à administração de agonistas β 3-adrenérgicos ou tiazolidinedionas, um grupo de agonistas PPAR γ (receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama), desencadeando a queima de energia equivalente àquela da gordura marrom clássica, a dos bebês. Por isso, as células bege são referidas como adipócitos marrons induzíveis (PETROVIC et al., 2010).

Durante muito tempo, o tecido adiposo branco foi considerado apenas um órgão de armazenamento do excesso de caloria consumida na dieta, sob a forma de triglicerídeos, que por sua vez podem ocupar 85 a 90% do citoplasma do adipócito, conseqüentemente deslocando o núcleo da célula para a periferia (VALE; LISBOA, 2013). Entretanto, sabe-se que o tecido adiposo branco também é um órgão imune endócrino, com capacidade de comunicar-se com outras estruturas, como o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal, enviando e respondendo a sinais que modulam o apetite, a sensibilidade à insulina, o sistema endócrino e reprodutivo, o metabolismo ósseo, a inflamação e a imunidade, além de desempenhar funções autócrinas, parácrinas e endócrinas, principalmente na resposta inflamatória (O'ROURKE et al., 2011).

Ao longo do desenvolvimento de um indivíduo, o tecido adiposo branco passa por alterações em sua celularidade, tanto em quantidade quanto em tamanho dos adipócitos. Durante a infância e adolescência, a obesidade caracteriza-se por hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo branco (SPALDING et al., 2008). Já na fase adulta, em caso de obesidade, ocorre o predomínio da hipertrofia nos adipócitos e, independente das alterações no peso corporal do indivíduo, o número de adipócitos parece permanecer constante, visto que apenas cerca de 10% das células adiposas são renovadas a cada ano em indivíduos adultos (HYVÖNEM; SPALDING, 2014).

Assim, o tecido adiposo é submetido a um processo de remodelagem contínua, que normalmente mantém a saúde do tecido, mas pode sair do controle e levar à

morte dos adipócitos em associação ao recrutamento e ativação dos macrófagos, e consequentemente ao surgimento de resistência à insulina, dentre outras comorbidades associadas (LEE et al., 2010).

A morte dos adipócitos de indivíduos obesos aumenta devido à hipóxia causada pela hipertrofia dessas células. Sendo assim, macrófagos são recrutados para o tecido adiposo a fim de eliminar os detritos celulares restantes e se acumulam preferencialmente nessas regiões de hipóxia, sendo negativamente correlacionados com a pO_2 no tecido adiposo em humanos (HARFORD et al., 2011). Ainda, tanto os macrófagos recrutados ao tecido adiposo quanto os adipócitos hipertrofiados começam a secretar agentes pró-inflamatórios que culminam em uma inflamação sistêmica de baixa intensidade (KENNEDY et al., 2009).

Dessa forma, a hipertrofia dos adipócitos, ao mesmo tempo em que fornece valiosa proteção contra os efeitos lipotóxicos sistêmicos nocivos pelo excesso de exposição de lipídeos, também resulta em secreção alterada de citocinas, que com o passar do tempo, afetam negativamente a remodelagem do tecido adiposo (LEE et al., 2010).

As citocinas, quando secretadas pelo tecido adiposo, são conhecidas como adipocinas e são diversificadas quanto à sua estrutura proteica (ZHANG et al., 1994), além de estarem envolvidas em processos fisiológicos como a angiogênese, a regulação da pressão sanguínea e o metabolismo de lipídeos (TRAYHURN; WOOD, 2005). Entretanto, essa nomenclatura não é consensual, havendo autores que apenas reconhecem como adipocinas a leptina, a adiponectina e, eventualmente, a resistina, a adipsina e a visfatina, por serem produzidas principalmente pelos adipócitos (FANTUZZI, 2005).

Quando os receptores dos adipócitos são estimulados, ativam os sinais de transdução da cascata inflamatória que induzem a expressão e secreção de proteínas de fase aguda, como a haptoglobina, e mediadores da inflamação, como $TNF\alpha$ (fator de necrose tumoral alfa), PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio 1), interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-15, fatores B e C3 do complemento, prostaglandina E2, apelina, visfatina, vaspina, irisina, MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e moduladores inflamatórios como a leptina, a adiponectina e a resistina (RAMALHO; GUIMARAES, 2008; MISIURA; KRAVCHUN, 2017).

A adiponectina, ao contrário da maioria das adipocinas, é altamente expressa no tecido adiposo subcutâneo, está diminuída no plasma de indivíduos obesos e sua expressão é inversa à adiposidade (YE; MCGUINNESS, 2013). Os efeitos metabólicos da adiponectina são: melhora na sensibilidade à insulina, inibição na entrada de ácidos graxos não esterificados, oxidação de ácidos graxos e redução na secreção de glicose no fígado, além do aumento na captação de glicose e adipogênese do tecido adiposo (COELHO et al., 2013). Portanto, os efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênico da adiponectina devem-se à inibição do crescimento de precursores de macrófagos e da diferenciação em células espumosas, a inibição da adesão de monócitos e à inibição na remodelagem e proliferação de células musculares da parede vascular. Ademais, estudos *in vitro* mostraram que a adiponectina pode reduzir a resposta inflamatória em células endoteliais por meio da inibição do TNF- α induzida pelo NF κ B (fator de transcrição nuclear kappa B). Dessa forma, esses estudos sugerem que a adiponectina é o único hormônio derivado do adipócito que possui propriedades antidiabéticas, anti-inflamatórias e antiaterogênicas (BRAY et al., 2009; LEAL; MAFRA, 2013).

A leptina é um hormônio peptídeo que, assim como a adiponectina, é principalmente expressa no tecido adiposo subcutâneo (LEAL; MAFRA, 2013). Entretanto, sua produção aumenta com a expansão do tecido adiposo e é proporcional à quantidade de gordura corporal, sendo mais elevada em mulheres (PUJANEK et al., 2013). O principal efeito biológico da leptina é o controle da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético por ativação de receptores altamente expressos no hipotálamo (JUNG; KIM, 2013). Ainda, a leptina induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos e células T, e ativa vias de inflamação usadas por receptores de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que a leptina possa mediar respostas inflamatórias (OUCHI et al., 2011; YE; MCGUINNESS, 2013).

A resistina também é uma adipocina, produzida proporcionalmente à massa adiposa e correlacionada com a resistência à insulina (VALE; LISBOA, 2013). Estudos em camundongos mostraram que a neutralização no gene da resistina (*resistina-knockout*) resultou na redução da glicose sanguínea, melhora na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, enquanto sua administração produz resistência à insulina tanto em condições normoglicêmicas quanto hiperglicêmicas (JACKSON; OSEI; AHIMA, 2005).

O TNF- α é produzido por diversos tipos de células do sistema imune como monócitos, linfócitos T e B, células polimorfonucleares, células tumorais, fibroblastos, mastócitos, células *Natural Killer*, células musculares lisas e principalmente macrófagos (TRACEY et al., 2008). Hotamisligil, Shargill e Spiegelman (1993) demonstraram que a expressão de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) de TNF- α estava aumentada na obesidade e desde então essa citocina tem sido associada à resistência à insulina. Anteriormente, acreditava-se que o adipócito fosse a principal fonte de TNF- α na obesidade, entretanto tem sido reconhecido que os macrófagos, principalmente do tipo M1, da fração vascular estromal são a principal fonte de TNF- α derivado do tecido adiposo de obesos (COELHO et al., 2013). Ademais, estudos têm demonstrado que a expressão aumentada de RNAm de TNF- α no tecido adiposo é altamente induzida por obesidade, e é maior no tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo (MAURY; BRICHARD, 2010). Quanto às doenças associadas, a relação entre os níveis de TNF- α e Síndrome Metabólica (SM) está relacionada com a capacidade dessa citocina em mediar a resistência à insulina (BALISTRERI et al., 2010). Outro mecanismo descrito é a inibição da Lipase Lipoproteica (LLP) e aumento na mobilização de ácidos graxos livres do tecido adiposo para a corrente sanguínea, que acarreta resistência à insulina em tecidos periféricos como fígado e músculos (HERMSDORFF et al., 2008). Ainda, o TNF- α também é pró-inflamatório. Com ações parácrina e autócrina, influencia a síntese de adipocinas pró-inflamatórias por meio da ativação de NF- κ B, aumentando a expressão de MCP-1, IL-6 e do próprio TNF- α , e reduzindo a expressão de adiponectina (BRAY et al., 2009; LEE, 2013).

A MCP-1, também conhecida como CCL2, é produzida principalmente por macrófagos e células endotelial e responsável pelo recrutamento de células do sistema imune para os locais de inflamação. Sua expressão é aumentada em lesões ateroscleróticas (KANDA et al., 2006), bem como em indivíduos obesos, em relação aos eutróficos, principalmente naqueles que possuem resistência à insulina (TAN et al., 2012). Ainda, a MCP-1 possui ação parácrina e autócrina nos adipócitos e é mais expressa no tecido adiposo visceral do que no subcutâneo (MAURY; BRICHARD, 2010). Kanda e col. (2006) demonstraram que o aumento na expressão de MCP-1 induziu elevação na infiltração de macrófagos no tecido adiposo, resistência insulínica e aumento do conteúdo hepático de triglicerídeos em camundongos. Ademais, os autores mostraram que a deleção do gene para MCP-1 reduziu a extensão do acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, a resistência à insulina e a esteatose hepática

associada à obesidade. Dessa forma, a MCP-1 desempenha papel relevante no desenvolvimento de resistência à insulina por meio da indução da resposta inflamatória desencadeada no tecido adiposo, bem como na patogênese da síndrome metabólica (BOURLIER; BOULOUMIE, 2009).

A IL-10, assim como a adiponectina, é uma citocina anti-inflamatória, que atua suprimindo a transdução de sinal das citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, sua expressão está diretamente relacionada à adiposidade, atingindo altos níveis em indivíduos obesos, ao contrário da adiponectina (BALISTRERI, 2010). A interleucina 10 é produzida principalmente por macrófagos ativados do tipo M2 e linfócitos Th2 (ITOH et al., 2011; YE; MCGUINNESS, 2013). Também é expressa por adipócitos, criando um ambiente anti-inflamatório no tecido adiposo, em condições fisiológicas. Ainda, essa citocina inibe a produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β e aumenta os níveis de citocinas anti-inflamatórias, como a IL1Ra (BALISTRERI et al., 2010). Estudo realizado com mulheres com ou sem obesidade mostrou que níveis circulantes de IL-10 estavam aumentados nas mulheres obesas e que baixos níveis da citocina estavam relacionados à síndrome metabólica tanto de mulheres com, quanto sem obesidade. Ainda, os autores observaram que o tratamento com IL-10 melhorou a inflamação nos tecidos adiposo e hepático, além de melhorar os metabolismos lipídico e glicídico no fígado de camundongos obesos (GOTOH et al., 2012). Hong e col. (2009) demonstraram que camundongos com dieta indutora de obesidade que hiperexpressam IL-10 possuem maior sensibilidade muscular à insulina devido à atenuação na resposta inflamatória e melhora na sinalização de insulina muscular. Corroborando esse estudo, Feuerer e col. (2009) observaram que a administração de IL-10 em cultura de adipócitos inibiu a expressão de todos os genes pró-inflamatórios induzidos por TNF- α , inclusive o próprio TNF- α . Demonstraram também que a regulação negativa do IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina) e do GLUT-4 (transportador de glicose tipo 4) estimuladas pelo TNF- α foram revertidas pela administração de IL-10, restaurando a sinalização adequada da insulina e indicando papel importante dessa citocina na reversão da resistência insulínica.

Em contrapartida, a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, envolvida na inflamação, lesão tecidual e defesa do hospedeiro (BRAY et al., 2009). É expressa por fagócitos mononucleares, células T e B, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e células da medula óssea (JÜCKER et al., 1991). Níveis aumentados de IL-6 estão positivamente correlacionados com obesidade, intolerância

à glicose e resistência à insulina, por isso são preditivos para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo II, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, sendo um terço da IL-6 circulante sintetizada pelo tecido adiposo. Ainda, a produção de IL-6 pelo tecido adiposo visceral é três vezes maior que pelo subcutâneo (MAURY; BRICHARD, 2010). Ademais, a produção aumentada de IL-6 é favorecida tanto pela hipertrofia dos adipócitos quanto por estímulos inflamatórios, como o TNF- α . Em contrapartida, a expressão pelo tecido adiposo e os níveis circulantes de IL-6 diminuem com a perda de peso (OUCHI et al., 2011).

A expressão e secreção desregulada dessas adipocinas na obesidade contribui para a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e conseqüentemente para o surgimento de um estado de inflamação crônica de baixa intensidade, também denominada inflamação subclínica (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008).

2.2 Inflamação Subclínica

No início da década de 1990 a obesidade foi reconhecida como um fator condicionante ao surgimento de uma inflamação crônica de baixa intensidade, quando se constatou o aumento na expressão do gene que codifica para a citocina pró-inflamatória TNF- α no tecido adiposo, bem como a redução da sensibilidade à insulina em roedores alimentados com dieta indutora de obesidade (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIELGEMAN, 1993). Estudos posteriores verificaram que, em indivíduos obesos, o tecido adiposo aumenta a capacidade de síntese de moléculas com ação pró-inflamatória, como as citocinas e adipocinas já citadas nesse trabalho, além da proteína C reativa, do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), da molécula de adesão intracelular (ICAM), do angiotensinogênio e do PAI-1 (BULLÓ et al., 2007; SHAH; MEHTA; REILLY, 2008).

A inflamação subclínica observada na obesidade é caracterizada por duas evidências científicas: elevação de marcadores e citocinas pró-inflamatórias e, pela presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco (BULLÓ et al., 2003; CANCELLO; CLÉMENT, 2006). Assim, os macrófagos residentes e os adipócitos não só contribuem para o estado de inflamação local no tecido adiposo, como estimulam sinergicamente a atividade inflamatória um do outro (WEISBERG et al., 2003).

Acredita-se que com o ganho de peso e hipertrofia dos adipócitos ocorra uma compressão nos vasos sanguíneos do tecido adiposo, impedindo que o suprimento

adequado de oxigênio chegue ao tecido, causando a consequente hipóxia local e morte dos adipócitos e desencadeando a cascata da resposta inflamatória, bem como o processo de angiogênese, para formação de novos vasos. Assim, a hipóxia *per se* já seria suficiente para estimular a quimiotaxia de macrófagos e induzir a expressão de genes pró-inflamatórios (LOLMEDE et al., 2003; WOOD et al., 2009).

Entre os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da resposta inflamatória de baixa intensidade induzida pela obesidade destaca-se a via de sinalização do NF- κ B. A estimulação dessa via pode ocorrer pela interação entre um ligante e seu receptor de superfície celular, como o receptor para o TNF- α (TNF-R) e o receptor do tipo Toll (TLR-4), que pode ser ativado tanto por lipopolissacarídeos (LPS), quanto por ácidos graxos saturados (Figura 2) (CANCELLO; CLÉMENT, 2006). A ativação de qualquer desses receptores leva à translocação do NF- κ B para o núcleo da célula e à transcrição de diversos genes como TNF- α , IL-1, IL-6, G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos), GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos), M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos), enzimas iNOS e COX-2 (ciclooxigenase 2), quimiocinas IL-8 e MCP-1; fatores de transcrição p50 e IRF-1 (fator regulador 1 de interferon), ICAM e PECAM (molécula de adesão celular endotelial plaquetária) (GUHA; MACKMAN, 2001).

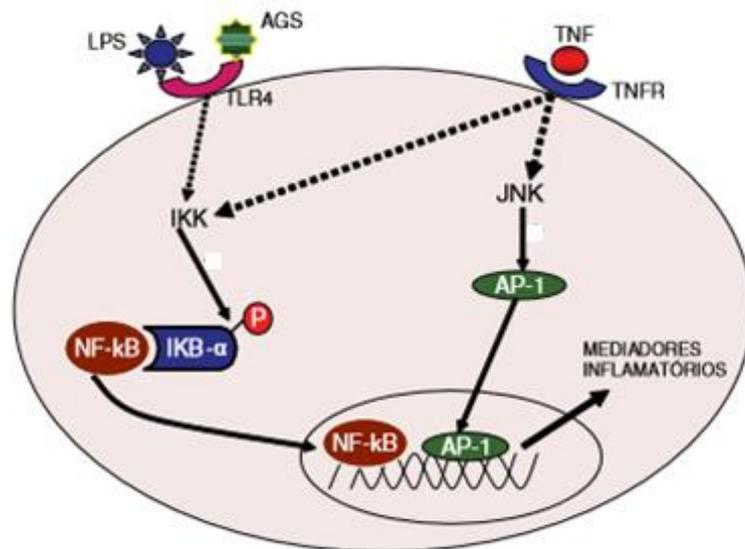


Figura 2: Vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1. IKB α : inibidor do fator de transcrição NF- κ B; IKK: quinase do inibidor do fator de transcrição NF- κ B; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; AGS: ácidos graxos saturados; JNK: Jun N-terminal quinase; TNF-R: receptor do TNF- α ; TLR-4: receptor do tipo Toll-4. Fonte: Adaptado de BASTOS; ROGERO; ARÉAS, 2009.

Ainda, a ativação da via de sinalização do NF- κ B pelo TNF- α envolve a participação da família das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos). As MAPK fosforilam serina e treonina e regulam processos celulares essenciais, como crescimento, proliferação e diferenciação celular por meio da modulação da transcrição gênica em resposta a alterações no ambiente intracelular (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006).

Assim como o TNF- α , o LPS também atua por meio da via de sinalização do NF- κ B (CANCELLO; CLÉMENT, 2006). O lipopolissacarídeo é uma molécula altamente tóxica, presente na membrana celular de bactérias gram-negativas e algumas gram-positivas. Alguns autores têm considerado o LPS como um biomarcador de obesidade associado a microbiota intestinal (PUSSINEM et al., 2011), visto que o nível sérico de LPS aumenta ligeiramente em casos de obesidade e esteatose (DELZENNE; CANNI, 2011), originando um quadro de endotoxemia metabólica (CANI et al., 2007).

Sob condições normais, a presença de LPS no lúmen intestinal não causa efeitos negativos para a saúde do indivíduo, mas alguns fatores podem favorecer a transferência dessa endotoxina para o sistema circulatório (LAUGERETTE et al., 2011).

Como o LPS possui uma fração insolúvel (lipídeo A) em sua estrutura molecular (RAETZ; WHITFIELD, 2002), ele pode ser incorporado a micelas, absorvido e agregado aos quilomícrons (GHOSHAL et al., 2009). Embora o transporte de LPS por quilomícrons possa favorecer a depuração hepática dessa endotoxina, reduzindo a toxicidade do LPS (HARRIS et al., 1993), uma dieta com alto teor de gordura pode ocasionar uma quilomicronemia prolongada, aumentando as chances de exposição extra-hepática do LPS (GHOSHAL et al., 2009). Assim, o acúmulo de quilomícrons no espaço intercelular pode aumentar a pressão local e causar afrouxamento dos complexos juncionais entre os enterócitos, aumentando a permeabilidade da barreira intestinal para moléculas de maior peso molecular, como o LPS, especialmente através do espaço paracelular (SALIM; SODERHOLM, 2011).

Outrossim, os LPS promovem a ativação de macrófagos por meio da sua ligação às proteínas ligantes CD14 (determinante de diferenciação), MD2 (proteína diferenciadora mieloide) e LBP (proteína ligante de Lipopolissacarídeo), que são auxiliares no reconhecimento do LPS pelo receptor TLR-4, presente na membrana plasmática (CRUZ-MACHADO, 2010). Posteriormente, ocorre a ativação de

moléculas envolvidas na transdução do sinal, como a MyD88 (proteína de diferenciação mieloide) e a IKK (quinase do inibidor do fator de transcrição NF- κ B) (BULLÓ et al., 2007; SHAH; MEHTA; REILLY, 2008; DELZENNE; CANI, 2011). A ativação da IKK promove a fosforilação do I κ B- β (inibidor do fator de transcrição NF- κ B) e a subsequente liberação e translocação do NF- κ B do citosol para o núcleo, onde o NF- κ B promoverá a ativação dos genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta (BAUD; KARIN, 2009). Entretanto, estudos posteriores mostraram que o LPS também pode ser reconhecido por mecanismos independentes do TLR-4, levando à ativação do inflamassoma (HAGAR et al., 2013; KAYAGAKI et al., 2013).

Em adipócitos, diferentes mecanismos contribuem para a resistência à insulina induzida por LPS. A ativação de TLR-4 por LPS em pré-adipócitos aumenta a expressão de citocinas como TNF- α e IL-6, prejudicando a sinalização da insulina no tecido adiposo (HOTAMISLIGIL et al., 1996), além de promover a expressão de NF- κ B e ativação das MAPK com subsequente translocação da AP-1 (proteína ativadora 1) para o núcleo da célula e liberação de citocinas prejudiciais à sinalização insulínica (CHUNG et al., 2006).

2.2.1 Ácidos graxos e a resposta inflamatória

A expansão do tecido adiposo é um dos modos pelos quais os ácidos graxos saturados causam alteração metabólica nesse tecido. Estudos em humanos mostraram que dietas ricas em ácidos graxos saturados estão mais intimamente associados à inflamação do que dietas que contêm reduzida quantidade desses ácidos graxos (CANCELLO; CLÉMENT, 2006; SHAH; MEHTA; REILLY, 2008), visto que os ácidos graxos saturados ativam tanto o TLR-2 quanto o TLR-4. Por outro lado, ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 apresentam ação anti-inflamatória, uma vez que inibem a expressão gênica e a sinalização mediada por esses receptores, reduzindo assim a atividade dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (WOLOWCZUK et al., 2008).

Nos adipócitos, ácidos graxos saturados induzem a fosforilação da JNK, ativam a PKC (proteína quinase C), o NF- κ B (prejudicando a via de sinalização da insulina) e a via de sinalização da MAPK, o que induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α (KENNEDY et al., 2009). Além disso, esses ácidos induzem a resistência à insulina por sua ação antagônica sobre o coativador do PPAR- γ , uma vez que a ativação dos PPAR- γ está relacionada ao controle do metabolismo da

glicose e, nesse sentido, à melhora da sensibilidade à insulina (BULLÓ et al., 2007; SHAH; MEHTA; REILLY, 2008). Dessa forma, o excesso de ácidos graxos saturados aumenta a inflamação e a apoptose por meio do estresse oxidativo, do estresse do retículo endoplasmático, da síntese de espécies reativas de oxigênio e pela ativação da via de sinalização da PKC (FREITAS; CESCHINI; RAMALHO, 2014).

O processo inflamatório estimula a diferenciação de adipócitos, o que favorece o aumento da liberação de ácidos graxos não esterificados a partir dessas células para a circulação sanguínea. O aumento do fluxo desses ácidos graxos para o fígado promove resistência periférica à ação da insulina nesse tecido, devido ao aumento da expressão e atividade da enzima glicose-6-fosfatase, da gliconeogênese e da glicogenólise. Ainda, ácidos graxos não esterificados inibem o IRS-1 e, conseqüentemente, induzem a resistência periférica à insulina no músculo esquelético e no fígado (CANCELLO; CLÉMENT, 2006; KENNEDY et al., 2009). Por isso, o aumento da ingestão de ácidos graxos saturados pela dieta favorece a ativação da resposta inflamatória e, conseqüentemente, o aumento do risco para DCNT (KENNEDY et al., 2009).

Assim, o conjunto de fatores compreendendo a hipertrofia dos adipócitos, a hipóxia no tecido adiposo, a síntese de adipocinas, quimiocinas e citocinas e a endotoxemia devido ao aumento da concentração sanguínea de LPS leva a uma maior infiltração de macrófagos no tecido adiposo (KENNEDY et al., 2009).

2.2.2 Macrófagos e Obesidade

Os macrófagos são fagócitos mononucleares que, devido à grande variedade de processos fisiológicos e patológicos nos quais atuam, desempenham um papel essencial no organismo. Eles estão distribuídos por todo o corpo, podendo ser encontrados nos órgãos linfoides, fígado, pulmão, trato gastrointestinal, sistema nervoso central, cavidades serosas, ossos, sinóvia e pele. Ainda, são fundamentais na resposta imune, secretando citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, apresentando antígenos, fagocitando patógenos e detritos celulares, formando células gigantes multinucleadas e produzindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os macrófagos são sensíveis a vários tipos de substâncias, como imunoglobulinas, lipoproteínas, fatores de crescimento, partículas virais, componentes

bacterianos e fúngicos, citocinas e IFN- γ (interferon gama), onde após o contato, ocorre ativação dos macrófagos residentes por meio de sinalização (ODEGAARD; CHAWLA, 2011). Os macrófagos ativados passam então a produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), e aumentam sua capacidade de adesão, espriamento, fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias (GHOSN et al., 2010). Ainda, as atividades bactericida e fungicida dos macrófagos devem-se principalmente à fagocitose e à geração de ERO e ERN, tais como óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (GWINN; VALLYATHAN, 2006).

Ao estudarem o tecido adiposo de humanos e ratos obesos, Cinti e col. (2005) demonstraram que cerca de 90% dos macrófagos estavam seletivamente localizados em volta dos adipócitos necróticos, formando estruturas em forma de coroa. Posteriormente, a presença dessas estruturas em coroa foi associada à inflamação no tecido adiposo e à síndrome metabólica (AOUADI et al., 2013). Esses achados fundamentam a morte do adipócito como um importante modulador da resposta dos macrófagos associada à obesidade (CINTI et al., 2005).

Sabe-se que as células gigantes multinucleadas persistem nos locais de morte dos adipócitos para remover os lipídeos que se encontram no interstício. Pelo menos inicialmente, essa remoção lipídica aparenta ter um papel protetor. Entretanto, a persistência dos macrófagos e a formação das células gigantes multinucleadas nos locais onde existem adipócitos mortos e gotas lipídicas livres no citoplasma, sugere que esses detritos celulares induzam a ativação crônica dos macrófagos no tecido adiposo (CINTI et al., 2005).

Os macrófagos desempenham um importante papel na manutenção da inflamação subclínica durante a obesidade (OLEFSKY; GLASS, 2010), inclusive com a presença de diferentes subtipos de macrófagos no tecido adiposo.

2.2.2.1 Macrófagos M1 x M2

Os macrófagos se diferenciam em tipos distintos de células, macrófagos M1 / classicamente ativados e macrófagos M2 / alternativamente ativados, dependendo do microambiente onde se localizam (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009).

Lumeng, Bodzin e Sattiel (2007) demonstraram pela primeira vez a presença de macrófagos M1 e M2 no tecido adiposo. Os autores mostraram que além de aumentar em número, o fenótipo dos macrófagos é alterado de um estado anti-

inflamatório (M2) para um estado pró-inflamatório (M1) durante a obesidade, contribuindo assim para o desenvolvimento da inflamação subclínica (Figura 3).

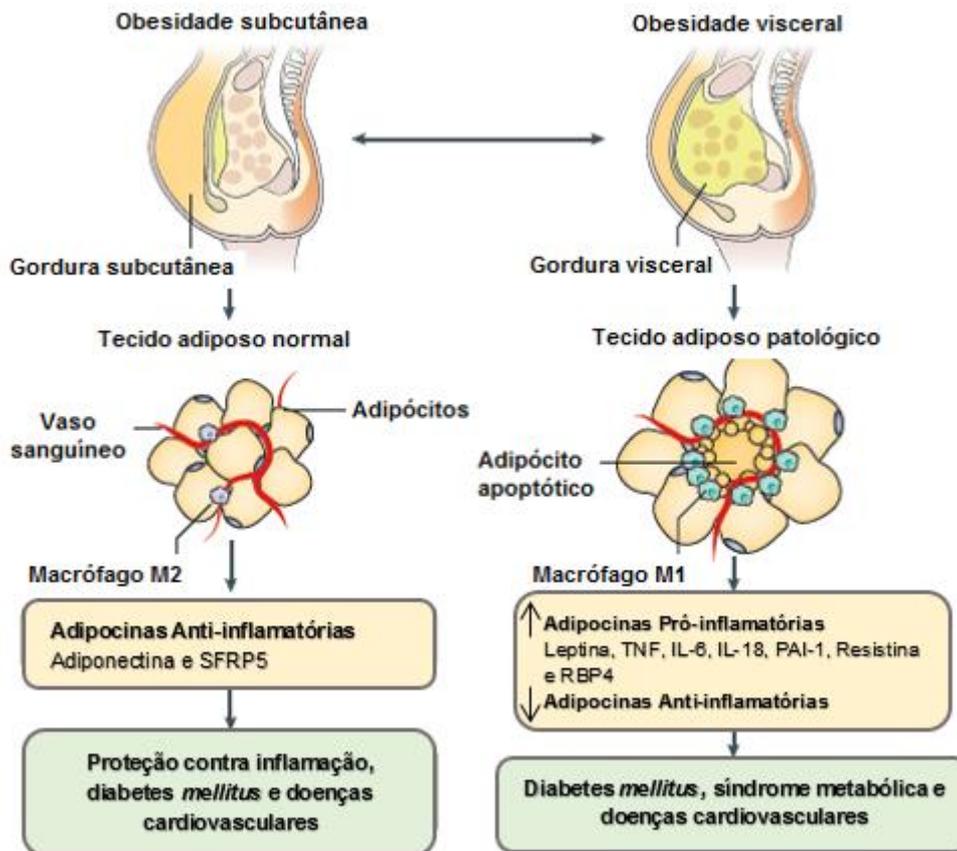


Figura 3: Alterações patológicas no tecido adiposo. PAI-1: Inibidor de ativador de plasminogênio 1. RBP4: Proteína de ligação ao retinol 4. SFRP5: Proteína secretada relacionada ao receptor Frizzled 5. TNF: Fator de necrose tumoral. IL: Interleucina. Fonte: Adaptado de González-Muniesa et al., 2017.

Os macrófagos M1 são induzidos por $\text{IFN-}\gamma$ ou em conjunto com estímulos microbianos, como o LPS, ou citocinas (MANTOVANI et al., 2013). Uma vez ativados, esses macrófagos são uma fonte importante de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e iNOS, que podem bloquear a ação da insulina em adipócitos, causando resistência sistêmica à insulina. Assim, tanto o recrutamento quanto a polarização de macrófagos de perfil M1 são necessários para o desenvolvimento da resistência à insulina (WEISBERG et al., 2003).

No tecido adiposo, os macrófagos M1 atuam como células efetoras e indutoras de respostas Th1 polarizadas, além de mediar a resistência contra parasitas intracelulares e tumores (MANTOVANI et al., 2013). Ademais, esse subtipo de macrófago secreta MCP-1, uma citocina diretamente relacionada à infiltração macrofágica no tecido adiposo, à resistência insulínica e à lesão hepática na obesidade. Assim, os macrófagos M1 desempenham importante papel também no

desenvolvimento da inflamação subclínica (KANDA et al., 2006; WEISBERG et al., 2006)

Em contrapartida, os macrófagos M2 são distribuídos em pelo menos 3 subtipos, onde os M2a (alternativamente ativados) são ativados por IL-4 e IL-13, os M2b (tipo II) são ativados pela exposição a agonistas de TLR e IL-1R e os M2c (desativados), gerados por exposição a glicocorticoides e IL-10 (FUGISAKA et al., 2009) (Figura 4). Em geral, a função dos macrófagos M2 é contribuir para a remodelação do tecido (MANTOVANI et al., 2013), promoção de angiogênese e progressão de tumor (BISWAS; MANTOVANI, 2010).

Recentemente, Zhang e col. (2017) demonstraram que a injeção intravenosa de macrófagos M2 em camundongos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica reduziu o peso do coxim adiposo inguinal dos animais e ocasionou o encolhimento dos adipócitos dos coxins adiposos inguinal e epididimal. Ainda, observaram redução na expressão de MCP-1 e aumento de UCP-1 no coxim epididimal, sugerindo que a injeção de macrófagos M2 pode melhorar a resistência à insulina e os níveis séricos de triglicérides e LDL-c (lipoproteína de baixa densidade).

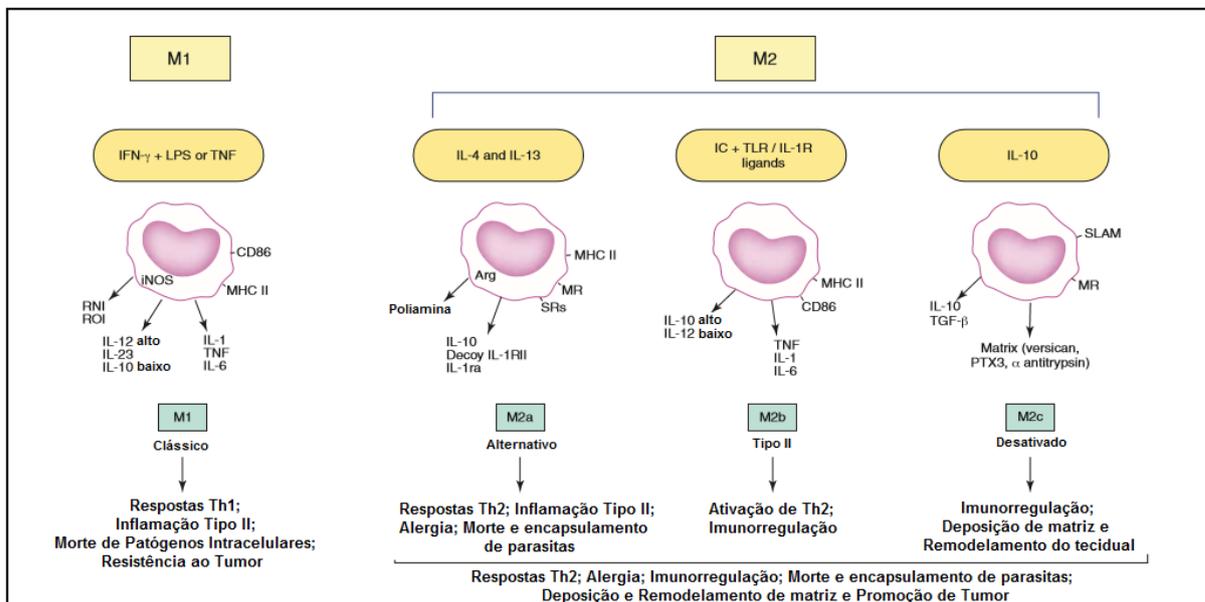


Figura 4: Modelo de macrófagos M1/M2. Fonte: Adaptado de MANTOVANI, 2004.

As citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e IFN- γ de macrófagos M1 suprarregulam genes como COX-2, iNOS e fosfolipase A2, que por sua vez estimulam a síntese de mediadores da inflamação, tais como PAI-1, PGE2 (prostaglandina E2) e NO, ativando a cascata inflamatória (CHARLES et al., 2000). Dessa forma, os

macrófagos M1 produzem NO em altas concentrações (MANTOVANI, et al., 2004), contribuindo com a manutenção da resposta inflamatória por ser um potente vasodilatador, além de causar dano tecidual (NATHAN; HIBBS, 1991). Entretanto, os macrófagos M2 não só produzem NO em baixas concentrações, como secretam altos níveis de arginase-1 (MILLS et al., 2000), sendo a arginina um substrato comum para arginase e iNOS. Ainda, os macrófagos M2 geram ornitina via arginase-1, promovendo a proliferação celular e a cicatrização tecidual por geração de poliaminas e colágeno (MORRIS, 2007; MILLS, 2012).

Assim, a inflamação subclínica observada em indivíduos obesos, e particularmente a síntese de adipocinas inflamatórias é relevante para o desenvolvimento de doenças associadas a um IMC elevado (TRAYHURN; WOOD, 2005).

Em suma, a leptina está implicada na patogênese da hipertensão arterial e aterosclerose; o PAI-1 na trombogênese; o TNF- α e a resistina na resistência à insulina, bem como o IL-6, que também contribui para o estado crônico inflamatório e o consequente surgimento de doenças como artrite reumatoide (BELTOWSKI, 2006). Ainda, a IL-6 induz hipertrigliceridemia ao estimular a lipólise e a secreção hepática de lipídeos, além de estimular o eixo hipotálamo-hipofiso-adrenérgico, cuja ativação está associada à obesidade central e resistência à insulina (BERG; SCHERER, 2005). Em lesões ateromatosas iniciais, as células espumosas macrofágicas e as células do músculo liso exprimem IL-6, sugerindo um papel dessa citocina nos estágios mais precoces da aterogênese (BERG; SCHERER, 2005). Outrossim, a importância dos macrófagos é fundamental na aterosclerose, pois o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), um agente quimiotático de monócitos e macrófagos, representa um dos mediadores mais importantes na transformação de uma lesão estável em instável (MANTOVANI, 2007).

Portanto, os indivíduos obesos são predispostos a desenvolver doenças cardiovasculares, resistência à insulina, síndrome metabólica e alguns tipos de câncer e doenças inflamatórias de caráter crônico (BOURLIER et al., 2008).

2.3 Plantas medicinais

Desde o surgimento da humanidade o poder curativo das plantas é explorado em busca do alívio da dor e combate às doenças. O uso de plantas medicinais foi,

durante muito tempo, o principal recurso terapêutico utilizado para tratar a saúde (VEIGA JUNIOR et al., 2005) e desde as civilizações antigas, este conhecimento é repassado de geração em geração (FEIJÓ et al., 2012).

Devido aos avanços técnico-científicos na área da saúde, surgiram novas maneiras de curar e tratar as doenças. Desde então, o uso de plantas medicinais foi sendo substituído pelos medicamentos alopáticos (BADKE et al., 2011). Entretanto, cerca de 80% da população brasileira ainda utiliza plantas medicinais como forma de complementar os cuidados com a saúde (BRASIL, 2012).

Dentre os fins terapêuticos esperados com a utilização de plantas medicinais está a perda de peso, seja ela motivada por razões estéticas ou para prevenção de doenças, visto que uma redução de 3 a 5% do peso corporal está associado à minimização de riscos cardiovasculares (OLIVEIRA; VENCIO, 2016). Assim, observa-se um aumento no incentivo à pesquisa de plantas popularmente consideradas antiobesogênicas (SIMÃO, 2013).

Nesse sentido, várias plantas com ação sobre a obesidade e comorbidades associadas já tiveram suas propriedades comprovadas, entre elas o extrato de chá verde (*Camellia sinensis*), que foi capaz de induzir a via lipolítica, atenuando a obesidade e a inflamação subclínica em camundongos tratados com dieta hiperlipídica (CUNHA et al., 2013). O efeito antiobesogênico do extrato de *C. sinensis* foi posteriormente confirmado por Vieira-Almeida, Pigoso e Almeida (2015) em ratas alimentadas com dieta hiperlipídica.

Estudo recente investigou as atividades antioxidante, antidiabética (por inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase) e inibidora da lipase pancreática *in vitro* dos extratos das folhas, frutos e tronco de *Ficus carica* (figos), revelando que o extrato etanólico dos frutos apresentou os melhores resultados para todas as atividades citadas, provavelmente devido à maior quantidade de flavonoides e polifenóis encontrada, em comparação com as outras partes da planta (MOPURI; ISLAM, 2017).

Lenquiste e col. (2015) demonstraram atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro* tanto da casca liofilizada, quanto do extrato aquoso da casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, sugerindo que elas possam ser utilizadas na forma de suplementação alimentar ou de chá para prevenir obesidade e resistência à insulina.

O efeito sinérgico dos extratos acetato de etila de *Commiphora mukul* e etanólico de *Lagenaria siceraria* (porongo), administrados por 30 dias a ratos

induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica, mostrou redução no peso corporal, glicemia de jejum, níveis séricos de colesterol, triglicerídeos, LDL, VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), porém elevação nos níveis de HDL dos animais (NADEEM, 2012).

Estudo recente revelou que o extrato etanólico das partes aéreas da *Valeriana dageletiana* suprimiram a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, sem apresentar citotoxicidade às células. Ainda, nos animais submetidos à dieta hiperlipídica e suplementados com o mesmo extrato, foram observados efeitos antiobesogênico, antiadipogênico e antilipogênico (WANG et al., 2017).

A graviola (*Annona muritaca*) é popularmente utilizada para perda de peso (CERCATO et al., 2015) e pesquisa recente mostrou que o tratamento com extrato aquoso das folhas de graviola, na concentração de 100 mg/kg, promoveu redução no peso corporal de animais previamente induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica (SASSO, 2017).

A combinação dos ácidos cafeico e ferúlico, isolados do extrato etanólico das partes aéreas de *Baccharis uncinella*, evitou o ganho de peso e o desenvolvimento de esteatose hepática, além de melhorar a hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica (BOCCO et al., 2016).

Um estudo *in vitro* sugeriu que o marmelinho (*Tournefortia paniculata*) pode ser utilizado como adjuvante no tratamento da obesidade, uma vez que seu extrato aquoso inibiu a atividade da α -amilase e da α -glicosidade. Ainda, a inibição da α -glicosidade também foi observada para o extrato de aloe (*Aloe vera*) e de carqueja (*B. trimera*) (SIMÃO; CORRÊA; CHAGAS, 2012).

O tratamento com extrato rico em polifenóis de *Vaccinium macrocarpon* Ailton (cranberry) demonstrou efeito protetor da obesidade, da resistência à insulina e da inflamação intestinal em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Ainda, os animais tratados com o extrato apresentaram aumento da população bacteriana de *Akkermansia spp* (ANHÊ, et al., 2015).

Outrossim, pesquisas demonstraram efeito antiobesidade do extrato metanólico de *B. trimera* em ratos submetidos à dieta hiperlipídica (SOUZA et al., 2012).

2.3.1 *Baccharis trimera* (carqueja)

O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae, compreende mais de 500 espécies, distribuídas no continente americano e predominantes no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, sendo cerca de 120 descritas no Brasil (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

A *Baccharis trimera* (Less) DC., conhecida popularmente como carqueja, carqueja-amarga, carqueja-do-mato, carquejinha e tiririca-de-balaio, é uma das principais espécies descritas, com grande utilização na medicina tradicional (BORELLA et al., 2006). Apresenta-se como subarbusto perene, de 50 a 80cm de altura e possui caules alados com ramos verdes de expansões trialadas e é nativa do sul e sudeste do Brasil (LORENZI, 2000) (Figura 5).



Figura 5: Plantas de *Baccharis trimera* Less (DC). em estado vegetativo (A), reprodutivo (B) e ramo com inflorescência (C). Fonte: CARREIRA, 2007.

Ressalta-se que espécie *B. trimera* foi anteriormente denominada *B. genistelloides* var. *trimera* Backer, sendo essa designação transformada em sinonímia (SOUZA et al., 1991).

O primeiro registro escrito do uso de Carqueja no Brasil data de 1931, sendo utilizada na forma de infusão das folhas e ramos para tratamento de esterilidade feminina e impotência masculina, atribuindo-lhe ainda propriedades tônicas, febrífugas e estomáquicas (CORREA, 1931). A partir daí o uso medicinal aumentou, e diversos autores relataram que a *B. trimera* está entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população, inclusive para perda de peso (NUNES et al., 2003; DICKEL; RATES; RITTER, 2007; CONDE et al., 2015; CERCATO et al., 2015). Atualmente a carqueja possui diversas finalidades terapêuticas descritas na literatura, como detalhado a seguir.

Soicke e Leng-Peschlow (1987), fazendo uso do extrato aquoso da *B. trimera* em animais, validaram suas propriedades hepatoprotetoras. Anos depois, Pádua e

col. (2014) confirmaram o efeito hepatoprotetor do extrato hidroetanólico das partes aéreas da planta em lesão induzida pelo analgésico paracetamol.

A propriedade antiulcerogênica foi validada em estudo com ratas *Wistar*, utilizando o extrato aquoso e o extrato aquoso da resina da *B. trimera* (DIAS, et. al., 2009). Posteriormente, a atividade antissecretória do extrato aquoso foi confirmada por Biondo e col. (2011) e, recentemente, Livero e col. (2016) confirmaram o efeito antiulcerogênico do extrato hidroetanólico das partes aéreas da carqueja em ratas *Wistar*.

A atividade anti-inflamatória da *B. trimera* foi demonstrada por Gené, Marin e Adzet (1992) e, na década seguinte, confirmada por Paul e col. (2009), Nogueira e col. (2011) e Oliveira e col. (2012). Outrossim, as ações analgésica e antiedematogênica da fração butanólica de carqueja foram observadas por Gené e col. (1996), sugerindo que os efeitos se devem a um complexo de saponinas, que tem como componente majoritário o ácido equinocístico.

Bara e Vanetti (1997) comprovaram que extratos alcoólicos de carqueja possuem potencial antimicrobiano. Avancini e col. (2000) confirmaram essa atividade *in vitro* a partir do decocto de *B. trimera* e, posteriormente, Betoni e col. (2006) confirmaram esse efeito utilizando extrato seco da planta em cepas de *Staphylococcus aureus*.

Paul e col. (2009) demonstraram efeito imunomodulador *in vitro* da planta sobre a proliferação de linfócitos de ratos.

O efeito antioxidante dos extratos de *B. trimera* foi observado por Rodrigues e col. (2009), confirmado por Oliveira e col. (2012), Paiva e col. (2015), Nascimento e col. (2017) e Rabelo e col. (2018), sugerindo que essa atividade se deve à presença de compostos fenólicos, como quercetina, rutina e derivados do ácido cafeoiquínico, bem como que a ação de *B. trimera* está possivelmente mais associada a efeitos de neutralização direta ou inibição de vias de produção de espécies reativas, em vez da modulação da atividade de enzimas antioxidantes.

Januário e col. (2004) reportaram as propriedades anti-hemorrágica e antiproteolítica do diterpenoide *neo-clerodano* de *B. trimera* contra o veneno de *Bothrops* sp.

O efeito anti-adipogênico em animais de extratos da *B. trimera* foi demonstrado recentemente por Nascimento e col. (2017). Ainda, a atividade antidiabética de extratos e frações da referida espécie foi sugerida por Oliveira e col. (2005).

Ao longo dos anos, diversos autores avaliaram as atividades toxicológicas da planta *in vivo* e *in vitro*. Grance e col. (2008) relataram efeitos tóxicos do extrato hidroetanólico da planta em células renais e hepáticas de ratas prenhas. Entretanto, observaram que os danos foram reversíveis após a interrupção da administração. No ano seguinte, Rodrigues e col. (2009) observaram aumento da frequência de micronúcleos na medula óssea de camundongos tratados, indicando atividade mutagênica cromossômica. Porém, não houve efeito genotóxico no sangue, nem no fígado dos animais. Ainda, foi possível observar efeito antígenotóxico no sangue dos animais. Assim, os autores apenas orientam precaução na preparação de medicamentos a partir dessa planta. Mais tarde, Nogueira e col. (2011) observaram ausência de mutagenicidade em células tratadas *in vitro* com extrato aquoso da carqueja, bem como de suas frações aquosa e etanólica. Entretanto, as células renais dos animais apresentaram genotoxicidade *in vivo* e efeitos tóxicos *in vitro*. Em contrapartida, Dias e col. (2009) não observaram efeito tóxico agudo em animais tratados com o extrato bruto da *B. trimeria* e, recentemente, Silva e col. (2016) demonstraram que animais tratados com a tintura da planta não apresentaram sinais de toxicidade aguda ou subcrônica. Lívero e col. (2016) também não observaram efeito tóxico agudo do extrato hidroetanólico de *B. trimeria* em camundongos.

Estudos mostram que os compostos mais frequentemente encontrados na espécie *B. trimeria* são os flavonoides, terpenoides (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005) e ácidos cafeoilquínicos (ABOY et al., 2012).

Em 1977, HERZ e col. identificaram diterpenoides do tipo ent-clerodano em extrato de *B. trimeria*. Posteriormente, Garcia e col. (2014) identificaram e compararam dois diterpenoides clerodanos, um *ent*-clerodano e um *neo*-clerodano, a partir do extrato aquoso da planta.

Dentre os compostos fenólicos identificados na *B. trimeria* estão a apigenina, luteolina, nepetina, quercetina, hispidulina (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987), cirsimaritina (CORRÊA, 1984), genkwanina (FRANCO, 1995), isoquercetina (SIMÕES-PIRES et al., 2005b).

Entre os derivados do ácido cafeico identificados na espécie *B. trimeria* citam-se o ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoil-1-metilquínico, ácido 4,5-O-dicafeoilquínico, ácido 3,4-O-dicafeoilquínico, o ácido 3,5-O-dicafeoilquínico (ABOY et al., 2012). Ainda, há na literatura alguns

trabalhos científicos que demonstraram o perfil fitoquímico dos óleos essenciais da *B. trimera* (SIMÕES-PIRES et al., 2005a; SILVA et al., 2007; PAROUL et al., 2016).

Quanto ao teor dos compostos presentes na carqueja, Borella e col. (2001) demonstraram que, devido à variação sazonal, as plantas colhidas no verão apresentaram-se ricas em flavonoides. Entretanto, Silva e col. (2006) não observaram mudanças no teor desses metabólitos em plantas cultivadas e colhidas em estações secas ou úmidas. Ainda, um estudo sazonal qualitativo mostrou que saponinas se mantiveram presentes em coletas de *B. trimera* realizadas na primavera, verão e inverno (CHICOUREL et al., 2006). ABOY e col. (2012) mostraram que as maiores quantidades de ácido cafeoilquínico das partes áreas da carqueja foram detectadas durante o período vegetativo.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o efeito da *Baccharis trimera* sobre as comorbidades e funções celulares de macrófagos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (DH).

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o perfil fitoquímico da amostra de infusão de *Baccharis trimera* (IBT).

- b) Avaliar as comorbidades, por meio:
 - da ingestão alimentar e calórica dos animais;
 - das alterações na composição corporal (ganho de peso, índice de adiposidade, peso dos órgãos e dos coxins adiposos);
 - das alterações no perfil glicêmico (teste de sensibilidade à insulina, glicemia de jejum e teste de tolerância oral à glicose);
 - dos parâmetros bioquímicos;
 - da análise histopatológica dos órgãos e tecido adiposo epididimal;
 - da quantificação do número de leucócitos totais na cavidade peritoneal.

- c) Avaliar as funções celulares de macrófagos peritoneais, por meio:
 - da viabilidade celular;
 - da produção e liberação de óxido nítrico;
 - da produção e liberação de peróxido de hidrogênio;
 - do espriamento celular;
 - da adesão celular;
 - da atividade fagocitária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal

A amostra de *Baccharis trimera* foi obtida da empresa Flor do Campo® (lote: C0719062, fabricação: 04/2016, validade: 04/2018) e as partes aéreas foram utilizadas para a preparação da infusão de *B. trimera*.

4.2 Preparação da infusão de *Baccharis trimera* (IBT)

Após remoção das sujidades, o material vegetal foi triturado em moinho de facas até a obtenção de um pó fino. Em seguida, a amostra foi preparada por infusão, conforme indicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC 10/2010, na dose de 7,5 g/dia (considerando-se um indivíduo de 70kg), que equivalem a 100 mg/kg/dia. Para tanto, adicionou-se 1800mL de água mili-Q fervente a 30g do pó, permanecendo por 10 minutos em repouso. Posteriormente o material foi filtrado em papel filtro qualitativo, liofilizado até obtenção de um pó seco e armazenado a 2-8°C até o momento do uso. O rendimento foi calculado em 14,1%, assim aproximadamente 15 mg do pó liofilizado da IBT equivalem a 100 mg da amostra comercial.

4.3 Análise da IBT por CLAE-DAD-EM/EM

Foi realizada uma cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodo e espectrofotômetro de massas (CLAE-DAD-EM/EM), a fim de verificar a presença dos principais compostos presentes na amostra comercial de *B. trimera* adquirida.

Para tanto, 2 µL (de uma solução de 1 mg/mL preparada com etanol e água 7:3 v/v) da IBT foram injetados em UFLC LC-20AD (Shimadzu) acoplado a um detector de arranjos de diodos (DAD) e um espectrofotômetro de massas micro TOF-Q III (BrukerDaltonics) equipado por uma fonte de ionização por *electrospray* e analisador qTOF. A coluna C-18 (kinetex, 2,6µm, 150 x 2,2 mm) protegida por uma pré-coluna empacotada com o mesmo material. A fase móvel foi constituída por água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos com 1% de ácido acético (v/v) e um perfil de eluição gradiente de: 0-2 min 3% de B; 2-25 min 3-25% de B; 25-40 min 25-80% de B, seguido de lavagem e condicionamento da coluna (8 min). O fluxo foi 0,3 mL/min

e a coluna mantida a 50 °C. A análise foi monitorada no comprimento de onda de 240-800 nm e o espectrofotômetro de massas operando em modo negativo e positivo de ionização (m/z 120-1200).

A identificação dos compostos foi realizada através de análise do espectro ultravioleta (UV), massa exata e padrões de fragmentação ESI (ionização por *electrospray*) comparados àqueles anteriormente publicados na literatura. Compostos foram comparados com o padrão descrito na literatura para o gênero ou espécie *Baccharis trimera* ou identificados por comparação com o padrão autêntico (ácido quínico (77-95-2), ácido cafeoilquínico (1241-87-8), rutina (153-18-4), ácido 3,4-dicafeoilquínico (57378-72-0), ácido 3,5-dicafeoilquínico (89919-62-0), ácido 4,5-dicafeoilquínico (89886-31-7) (Sigma Aldrich®).

4.4 Composição das dietas normo (DN) e hiperlipídica (DH)

Durante o período experimental os animais foram alimentados *ad libitum* com água e dieta para camundongos adultos, padronizadas pelo *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (Tabela 2) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

Neste estudo, a ração hiperlipídica utilizada foi baseada na AIN-93M, com redução de amido e acréscimo de banha, com o objetivo de aumentar o teor calórico da dieta e induzir o ganho de peso e alterações metabólicas nos animais. As dietas foram adquiridas da empresa PragSoluções Biociências (SP, Brasil), e mantidas em geladeira até o uso (LENQUISTE et al., 2015).

Tabela 2: Composição das dietas experimentais utilizadas (g/kg ração)

	Dieta AIN-93M (Normolipídica)	Dieta Hiperlipídica
Ingredientes (g/kg)		
Amido	620,7	308,7
Caseína	140	140
Sacarose	100	100
Óleo de Soja	40	40
Celulose	50	50
Mix Mineral AIN 93	35	35
Mix Vitamínico AIN 93	10	10
L-Cistina	1,8	1,8
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
BHT	0,008	0,008
Banha	-	312,0
Energia (kcal/kg)	3.802,8	5.119,8
Carboidratos (%)	75,81	31,93
Proteínas (%)	14,73	10,94
Lipídeos (%)	9,47	57,13
Calorias/g dieta	3,80	5,12

4.5 Animais

Foram utilizados 60 camundongos *Swiss*, machos, com 5 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UFMS. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno no Biotério de Experimentação do Setor de Biofisiofarmacologia à $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta padrão (Nuvital[®]) durante aclimação e estabilização do peso corporal (uma semana) e água à vontade. Após o período de indução da obesidade e tratamento com a IBT, os camundongos foram anestesiados com Halotano e submetidos à eutanásia por deslocamento da cervical.

Para os experimentos *in vitro* foram utilizados 10 camundongos *Swiss*, com o perfil acima descrito e provenientes do mesmo local e mantidos nas mesmas condições dos demais. Para os ensaios, os animais foram alimentados com dieta padrão (Nuvital[®]) e receberam água à vontade. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação

Animal) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS (Protocolo nº 770/2016) (ANEXO).

4.6 Delineamento experimental

4.6.1 Indução da obesidade e tratamento

Após o período de aclimação e estabilização do peso corporal (uma semana), os animais foram alimentados com dieta AIN-93M normolipídica (DN) ou dieta AIN-93M enriquecida com banha animal (DH) (LENQUISTE et al., 2015). Para tanto, o estudo foi conduzido por um período de oito semanas de indução da obesidade e concomitante tratamento com a infusão de *Baccharis trimera* (IBT), como demonstrado na Figura 6. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais, descritos a seguir:

- a) DN + água (10 mL/kg/dia, via oral (v.o.), gavagem);
- b) DN + IBT (15 mg/kg/dia, v.o., gavagem);
- c) DH + água (10 mL/kg/dia, v.o., gavagem);
- d) DH + IBT (15 mg/kg/dia, v.o., gavagem).

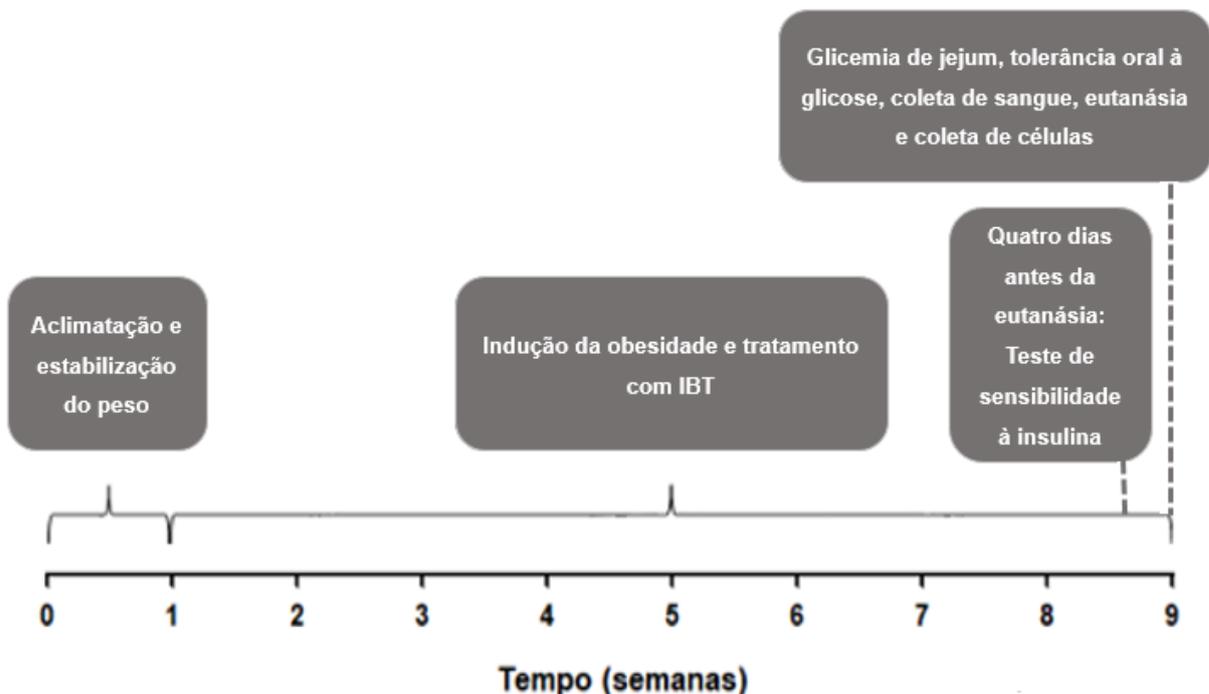


Figura 6: Esquema representativo do delineamento experimental.

4.7 Avaliação do consumo de ração e calorias, do ganho ponderal, peso dos órgãos e coxins adiposos e cálculo do índice de adiposidade.

O controle da ingestão de dieta foi realizado três vezes por semana. O consumo alimentar (CA) de cada animal foi obtido de acordo com a equação 1.

$$CA \text{ (g/dia)} = \frac{DO-DR}{n} \quad (1)$$

Onde, DO representa a dieta oferecida aos animais e DR a dieta restante, em gramas e n, o número de dias.

Da mesma forma, para avaliação do ganho ponderal, os animais foram pesados três vezes por semana, nos mesmos dias e horários, durante todo o período de experimentação, e a média do ganho de peso ao longo do período foi calculada.

A ingestão energética, expressa em kcal/dia, foi calculada multiplicando-se a quantidade de dieta ingerida pela densidade energética de cada dieta. A densidade energética foi calculada multiplicando-se as quantidades de proteínas e carboidratos por 4, e de lipídeos por 9 (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

Após a eutanásia, o coração, fígado, rim, pâncreas e duodeno foram pesados, além dos seguintes coxins adiposos: epididimal, mesentérico, omental, perirrenal e retroperitoneal, em balança analítica (AUW220D Shimadzu®), utilizando-se duas casas decimais.

O índice de adiposidade (IA) foi calculado obedecendo a equação 2.

$$IA \text{ (\%)} = \frac{\sum TA}{PF} \times 100 \quad (2)$$

Onde, TA representa o peso total dos sítios de tecido adiposo branco visceral e PF o peso corporal final do animal, em gramas.

4.8 Avaliação do perfil glicêmico

4.8.1 Sensibilidade à insulina

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado 96 horas antes da eutanásia dos animais e os mesmos encontravam-se em estado alimentado no momento da coleta de sangue. Para obtenção da amostra de sangue, fez-se uma incisão transversal na ponta da cauda dos animais. A glicemia foi dosada por meio de um aparelho medidor de glicose e tiras reativas (Accu-Chek Performa®) no tempo zero

(antes da injeção intraperitoneal de insulina regular (Humulin Lilly®) – 0,75 U/kg) e aos 15, 30 e 60 minutos após a injeção, de acordo com Santos e col. (2008).

4.8.2 Glicemia de jejum e tolerância oral à glicose

A determinação da glicemia de jejum e o teste de tolerância oral à glicose foram realizados no dia da eutanásia, com os animais em jejum de 8h. Para obtenção da amostra de sangue, fez-se uma incisão transversal na ponta da cauda dos animais. A glicose foi dosada por meio de um aparelho medidor de glicose e tiras reativas (Accu-Chek Performa®) e as dosagens ocorreram nos tempos zero (antes da administração oral de solução de D-glicose, 2g/kg, v.o., gavagem), 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração, de acordo com Santos e colaboradores (2008).

4.9 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

As concentrações séricas de triglicérides e colesterol total foram dosadas ao final do período experimental, utilizando o kit enzimático Labtest® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A análise foi realizada em microplaca de 96 poços, onde foram transferidos 2 µL de soro e adicionados 200 µL do reagente. Após incubação de 10 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 490nm em leitor de ELISA (HumareaderHS 16670). O ensaio foi realizado em triplicata.

As concentrações de triglicérides (Tg) e colesterol total (Col) foram calculadas obedecendo a equação 3.

$$\text{Tg ou Col (mg/dL)} = \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs padrão (média)}} \times 200 \quad (3)$$

Onde Abs representa o valor de absorbância.

Para a dosagem de colesterol de alta densidade (HDL) foi necessário realizar a precipitação das lipoproteínas de muito baixa (VLDL) e de baixa densidade (LDL), realizada por meio de centrifugação. Assim, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) foi determinado no sobrenadante. Após a centrifugação, a dosagem de colesterol HDL foi realizada utilizando o reagente para determinação do colesterol total seguindo o procedimento semelhante às demais análises bioquímicas citadas. Para o cálculo da concentração de colesterol HDL foi utilizada a equação 4.

$$\text{HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs padrão (média)}} \times 40 \quad (4)$$

As concentrações de Colesterol VLDL e LDL foram calculadas utilizando-se as equações 5 e 6, respectivamente.

$$\text{VLDL (mg/dL)} = \frac{Tg}{5} \quad (5)$$

$$\text{LDL (mg/dL)} = \text{Col} - (\text{HDL} + \text{VLDL}) \quad (6)$$

O índice aterogênico foi calculado de acordo com a equação 7.

$$\text{Índice aterogênico} = \frac{\text{Col}}{\text{HDL}} \quad (7)$$

4.10 Análise histológica dos órgãos e do coxim adiposo epididimal

Foi realizada a retirada e pesagem do coração, rim direito, duodeno, pâncreas e fígado, bem como dos coxins adiposos viscerais omental, retroperitoneal, mesentérico, perirrenal e epididimal. Em seguida, fragmentos desses órgãos e do coxim adiposo epididimal foram fixados em solução de formalina a 10% por 24h e depois mantidos em álcool 70% até o processamento histológico. Após a fixação, os espécimes foram incluídos em parafina, cortados em micrótomo com espessura de 5 µm cada e corados com hematoxilina-eosina (TEIXEIRA et al., 2006; MORAIS, 2013).

A análise histológica dos órgãos e coxim adiposo epididimal foi realizada pela Prof^a Dr^a Luciane Candeloro, do Instituto de Biociências (INBIO) da UFMS. Foram obtidas fotos em microscópio acoplado a uma câmera digital, com aumento final de 20 a 100x. As imagens foram analisadas com auxílio do software MOTIC (Motic Chine Group, Ltda).

Para análise histológica da mucosa intestinal foi observado o aspecto dos vilos e criptas intestinais, assim como presença e intensidade de infiltrado leucocitário. O escore intestinal foi baseado e adaptado pelos critérios descritos por Erben e colaboradores (2014), cujo sistema de classificação foi realizado por grau de alteração da mucosa. Para tanto, foram utilizadas as seguintes subdivisões de acordo com as mudanças das vilosidades e glândulas da mucosa intestinal:

grau 0 - mucosa normal;

grau 1 - desenvolvimento do espaço subepitelial de Gruenhagen na ponta da vilosidade;

grau 2 - presença de lise celular, formação do espaço subepitelial de Gruenhagen e espaçamento aumentado entre as vilosidades;

grau 3 - destruição da porção livre das vilosidades, presença de capilares dilatados e aumento das células inflamatórias.

Para as análises morfológicas do fígado e do rim foram observados a presença ou não dos seguintes parâmetros histopatológicos: esteatose (degeneração gordurosa), necrose, vasodilatação, infiltrado leucocitário, degeneração hialina, degeneração hidrópica e fibrose.

A análise do pâncreas foi separada em duas partes, sendo:

a) Porção endócrina (ilhotas pancreáticas): os parâmetros morfológicos analisados foram: vacuolização das células, tamanho das ilhotas e quantidade.

b) Porção exócrina: os parâmetros morfológicos analisados foram: corpos apoptóticos, necrose, infiltrado leucocitário, vasocongestão e as características morfológicas dos ácinos.

Para as avaliações do fígado, rim e pâncreas foi utilizado um sistema de escore, sendo: 2 - ausência de lesão; 4 - lesão leve; 6 - lesão moderada e 8 - lesão intensa.

Para análise morfométrica do tecido adiposo epididimal foram obtidas fotos em microscópio acoplado a uma câmera digital (Nikon D3100[®], acoplada ao microscópio Primo Star da marca Zeiss[®]), com aumento final de 100x. As imagens foram analisadas com auxílio do software Motic Images Plus 2.0. (Motic Chine Group, Ltda.), e a média da área (μm^2) de 100 adipócitos por amostra foi determinada (PEREIRA et al, 2012). Para a contagem das coroas de macrófagos, 20 campos de cada amostra foram analisados em microscópio com aumento final de 20x e as estruturas tipo coroa foram quantificadas em cada campo. O resultado foi expresso em número de estruturas tipo coroa por campo.

4.11 Obtenção e quantificação dos leucócitos peritoneais

Após a eutanásia, a cavidade peritoneal dos animais foi lavada com cinco mL de solução salina estéril (0,9% NaCl) em câmara de fluxo laminar. O exsudato peritoneal foi coletado para contagem total de leucócitos peritoneais e obtenção dos macrófagos. Para a contagem total, foram retirados 10 μL do exsudato e acrescidos de 190 μL de Solução de Turk (0,02g de cristal violeta, 2 mL de ácido acético e q.s.p

100 mL de água destilada). Os resultados foram expressos em número de células por mm³.

Em seguida, o exsudato foi centrifugado (1000 rpm / 8 min) e o sobrenadante alíquotado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. O precipitado celular foi ressuspenso em meio de cultura RPMI 1640 (R6504, Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (F7524, Sigma-Aldrich®) e o volume ajustado para obtenção de 1x10⁶ células/mL.

4.12 Avaliação dos parâmetros celulares

A avaliação dos parâmetros celulares foi realizada de duas maneiras:

a) Ensaio **ex vivo**: foram utilizados macrófagos peritoneais de animais que receberam as diferentes dietas (DN ou DH) e tratamentos (água ou IBT) durante oito semanas (conforme descrito no item 4.6). As células foram plaqueadas em microplaca de 96 poços e os ensaios realizados sem estímulo posterior.

b) Ensaio **in vitro**: foram utilizados macrófagos peritoneais de animais **não** alimentados com as dietas DN ou DH e sim, com dieta padrão (Nuvital®). As células foram plaqueadas em microplaca de 96 poços e os ensaios realizados após a estimulação das células com Lipopolissacarídeo de *E.coli* (LPS 1 µg/mL; L2630, Sigma-Aldrich®) na presença ou não de diferentes concentrações de IBT (0,06; 0,6 ou 6 mg/mL). As concentrações utilizadas correspondem às doses de 1,5; 15 e 150 mg/kg, respectivamente.

4.12.1 Viabilidade celular (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - MTT)

O ensaio de viabilidade celular foi avaliado pelo método da redução do sal de tetrazolium e formação do produto solúvel formazan, conduzido de acordo com o método descrito por Mosmann (1983) e foi realizado em conjunto com o ensaio de NO.

Para determinar a viabilidade da cultura celular, após o período de incubação e remoção do sobrenadante para a determinação da liberação de NO (descrito no item 4.12.2), 100 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB foram adicionados aos poços, juntamente com 20 µL de solução de MTT (M5655, Sigma-Aldrich®) (5 mg/mL PBS). Após 2h de incubação a 37°C, o meio contendo MTT foi removido e então, adicionados 200 µL da solução de lise (DMSO) (03014, Neon®) a

cada poço. Após solubilização dos precipitados, foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm no mesmo leitor de ELISA acima citado. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade comparados ao grupo controle negativo.

Como controle negativo de viabilidade celular, células foram incubadas com 10 µL de DMSO.

4.12.2 Determinação da produção e liberação de NO por macrófagos peritoneais

A produção e liberação de NO foi avaliada conforme descrito por Ding, Nathan e Stuehr (1988). Para tanto, as células foram dispensadas em uma concentração de 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços (TPP®) e incubadas em estufa com ambiente umidificado a 37°C e 5% de CO₂. Após 24h, as células foram lavadas por três vezes com solução salina tamponada (PBS) para a remoção das células não aderentes. Em seguida, as células foram estimuladas ou não, dependendo se o ensaio era *in vitro* ou *ex vivo*, e novamente incubadas por 48h nas mesmas condições citadas. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para os ensaios *ex vivo*, as células foram incubadas apenas com 100 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB.

Nos ensaios *in vitro*, além do meio de cultura, foram feitas incubações com 10 µL de LPS (1 µg/mL) na presença ou não de 10 µL de IBT (0,06; 0,6 e 6 mg/mL).

Como controle negativo da liberação de NO, células foram mantidas sem estímulo.

Afim de determinar a liberação de NO pelos macrófagos peritoneais, após o período incubação, os sobrenadantes das células foram transferidos para a placa de leitura, onde foi adicionado o Reagente de Griess na proporção de 1:1 (v/v) com o sobrenadante da cultura. A densidade óptica foi determinada em leitor de ELISA a 540 nm e os valores de leitura foram comparados com a curva padrão de NaNO₂ (5-80 µM). Os resultados foram expressos em µM de NO₂⁻.

4.12.3 Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais

A determinação da liberação de peróxido de hidrogênio foi realizada pelo método de oxidação da peroxidase dependente do vermelho de fenol descrito por Pick e Keisari (1980), adaptado para microensaio por Pick e Mizel (1981) e modificado por Russo e colaboradores (1989). As células foram dispensadas em uma concentração

de 1×10^5 células/poço em solução de vermelho de fenol em placas de 96 poços (TPP®). O ensaio foi realizado em triplicada, sendo que em três poços foram adicionados 10 ng de acetato miristato de forbol (PMA) (79346, Sigma-Aldrich®) diluído em DMSO e os demais, utilizados como controle.

Para os ensaios *ex vivo*, as células foram incubadas com 100 μ L de solução final de vermelho de fenol e 10 μ L de PMA (100 ng/mL).

Nos ensaios *in vitro*, além da solução final de vermelho de fenol, foram feitas incubações com 10 μ L de PMA (100 ng/mL), na presença ou ausência de 10 μ L de IBT (0,06 e 0,6 mg/mL).

Para controle negativo, células foram mantidas sem estímulo. A placa foi então incubada por 1h em estufa com ambiente umidificado a 37°C e 5% de CO₂. Após, o sobrenadante foi transferido para a placa de leitura e a reação foi interrompida pela adição de 10 μ L NaOH 1N. A placa foi mantida ao abrigo da luz por 15 minutos até a realização da leitura da absorbância a 620 nm em leitor de ELISA acima citado. A concentração de peróxido de hidrogênio foi obtida por comparação com curva padrão (5-40 μ M) e os resultados foram expressos em μ M de H₂O₂.

4.12.4 Espriamento de macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram dispensados em uma concentração de 1×10^5 células/poço, em duplicata, em placas de 24 poços contendo, em cada poço, uma lamínula de vidro circular (13 mm de diâmetro). A placa foi incubada por 2h em estufa com ambiente umidificado a 37°C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, os poços foram lavados por três vezes com PBS para a remoção das células não aderentes. Em seguida, as células foram estimuladas ou não e novamente incubadas por 2h nas mesmas condições citadas.

Para os ensaios *ex vivo*, as células foram incubadas apenas com 100 μ L de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB.

Nos ensaios *in vitro*, além do meio de cultura, foram feitas incubações com 10 μ L de LPS (1 μ g/mL), na presença ou ausência de 10 μ L de IBT (0,06 e 0,6 mg/mL).

Para controle negativo, células foram mantidas sem estímulo. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e adicionados 600 μ L de glutaraldeído (G5882, Sigma-Aldrich®) em todos os poços, para fixação das células. Após 20 min, o glutaraldeído foi removido e adicionado 1mL de água destilada em cada poço, sendo as placas vedadas e armazenadas em geladeira (2-8°C) para a contagem das células

em microscópio óptico invertido (Optiphase INV-403). Considerou-se como espreiadas as células que estavam aderidas à lamínula, emitindo pseudópodes (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973). Foram contadas 100 células por poço e os resultados expressos em porcentagem de células espreiadas.

4.12.5 Adesão celular

A capacidade de adesão celular foi avaliada pelo método do cristal violeta (LEE; WARREN, 1987), modificado por Santos e colaboradores (2016). As células foram dispensadas em uma concentração de 1×10^5 células/poço, em placas de 96 poços (TPP®) e incubadas por 2h em estufa com ambiente umidificado a 37°C e 5% de CO₂. Após, as células foram lavadas por três vezes com PBS para a remoção das não aderentes. As células aderidas foram estimuladas ou não e novamente incubadas por 2h nas mesmas condições citadas. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para os ensaios *ex vivo*, as células foram incubadas apenas com 100 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB.

Nos ensaios *in vitro*, além do meio de cultura, foram feitas incubações com 10 µL de LPS (1µg/mL), na presença ou ausência de 10 µL de IBT (0,06 e 0,6 mg/mL).

Para controle negativo, células foram mantidas sem estímulo. Após o período de incubação, o meio de cultura de removido, os poços lavados com PBS e as células fixadas com 30 µL de paraformaldeído 4% durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação, 50 µL de solução de cristal violeta em metanol (0,25g de cristal violeta; 10 mL de metanol PA; 40 mL de água destilada) foram adicionados em cada poço. A placa foi mantida por 30 minutos ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. Após, as células foram lavadas por três vezes com PBS e foram adicionados 50 µL de citrato de sódio 0,1M pH 4,2 em cada poço. O sobrenadante foi então transferido para a placa de leitura e realizada a leitura da absorbância a 540 nm em leitor de ELISA acima citado. Os resultados foram expressos em absorbância/ 1×10^5 células.

4.12.6 Atividade fagocitária dos macrófagos peritoneais

4.12.6.1 Obtenção do Zimosan e opsonização com soro de camundongo

Foi preparada uma suspensão de Zimosan (Z4250, Sigma-Aldrich®) 5 mg/mL em PBS, pH 7,2. O material foi incubado com soro de camundongo na proporção 1:1,

a 37°C, sob agitação constante. Após 30 minutos, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos e o precipitado ressuscitado em 1 mL de PBS. Esse procedimento foi repetido por três vezes e ao final, o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de RPMI contendo glicose 5mM e albumina 2% (COSTA ROSA; SAFI; CURI, 1994).

4.12.6.2 Determinação da atividade fagocitária dos macrófagos

Após obtenção dos macrófagos peritoneais, a suspensão celular teve sua concentração ajustada para 1×10^6 células/100 μ L de meio RPMI contendo glicose 5 mM e albumina 2% e mantida em banho de gelo até o momento do ensaio.

Para os ensaios *ex vivo*, foram adicionados 100 μ L da suspensão de macrófagos e 100 μ L da suspensão de Zimosan ou RPMI (controle) em tubos plásticos e incubados por 40 minutos a 37°C, em estufa de cultura com ambiente umidificado e 5% de CO₂.

Nos ensaios *in vitro*, além de adicionados 100 μ L da suspensão de macrófagos e 100 μ L da suspensão de Zimosan, foram também adicionados aos tubos plásticos 100 μ L de IBT em diferentes concentrações (0,06 mg/mL e 0,6 mg/mL) ou RPMI (controle), incubados como citado acima. Posteriormente, alíquotas de 100 μ L das amostras foram coletadas, espalhadas em lâminas de vidro com auxílio de ponteira e após secagem, coradas com corante HEMA 3 para determinação da fagocitose em microscópio de luz. Foram contadas 100 células por campo e considerados os macrófagos que englobaram 1 ou mais partículas de zimosan. Os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose.

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por meio do software GraphPad Prism® 5.0. Para análise de dados paramétricos foi realizada a análise de variância (ANOVA), para comparação múltipla, seguida de pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos. Para a comparação múltipla de dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Mann-Whitney. Valores menores que 5% ($p < 0,05$) foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil fitoquímico da amostra de IBT

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrofotômetro de massas da amostra de IBT, revelou a presença de 15 compostos (Figura 7) distribuídos em três principais classes: derivados do ácido cafeico (picos 1, 2, 3, 8, 9, 10 e 13), os derivados de flavonoides (picos 4, 5, 6, 7 e 15) e os diterpenoides do tipo clerodano (picos 11 e 12) (Tabela 3).

Os compostos ácido quínico (pico 1), ácido cafeoilquínico, também chamado ácido clorogênico (pico 2), rutina (pico 7), ácido 3,4-dicafeoilquínico (pico 8), ácido 3,5-dicafeoilquínico (pico 9) e ácido 4,5-dicafeoilquínico (pico 10) tiveram sua identificação confirmada por comparação com padrões autênticos.

O pico 3 m/z 367.1035 ($C_{17}H_{19}O_9$)⁻ mostrou um espectro de UV compatível com o ácido cafeico e o fragmento m/z 191 compatível com o ácido 5-feruloilquínico (CLIFFORD et al., 2003).

Os picos 4, 5 e 6 apresentaram um m/z 563.1406 ($C_{26}H_{27}O_{14}$)⁻ e uma fragmentação característica para flavonoides C-glicosilados (CUYCKENS, F.; MAGDA., 2004; ZHOU et al., 2012). Os picos 4 e 5 exibiram o fragmento m/z 503 [M-H-60]⁻ que indica uma pentose na posição 6, o que não foi observado para o composto 6.

Os picos 11 ($C_{20}H_{26}O_5$) e 12 ($C_{20}H_{28}O_5$) foram identificados putativamente como diterpenoides do tipo clerodano. Estes compostos não absorvem no UV e apresentaram a formação de aduto com ácido fórmico no modo negativo.

O pico 13 apresentou um UV compatível com o ácido cafeico e fragmentos em m/z 679 ($C_{36}H_{55}O_{12}$)⁻ relativo a perda de um fenilpropanoide, além do m/z 179 ($C_9H_7O_4$)⁻ e m/z 161 ($C_9H_5O_3$)⁻ que caracterizam a presença deste fragmento.

O espectro de massa referente ao pico 15 mostrou um m/z 343.0822 ($C_{18}H_{15}O_7$)⁻, além de fragmentos m/z 313 e 285, sendo identificado como dihidroxitrimetoxiflavona.

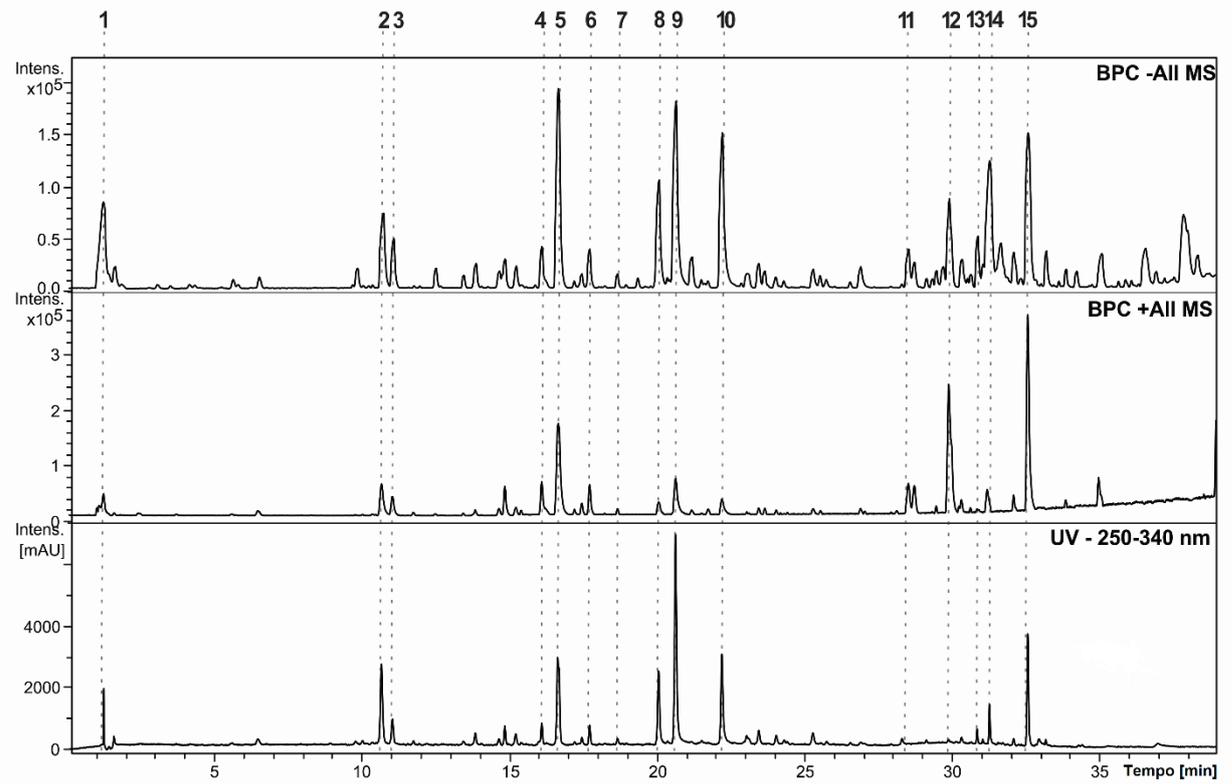


Figura 7: Perfil cromatográfico da infusão da amostra comercial de *Baccharis trimera*.

Tabela 3: Compostos identificados por CLAE-DAD-EM/EM a partir da infusão de *Baccharis trimera*.

Pico	Compostos (CAS)	Nível Ident. ^a	TR (min)	UV (nm)	[M+H] ⁺ m/z	[M-H] ⁻ m/z	Fórmula Molecular	MS/MS (modo negativo) m/z
1	ácido quínico (77-95-2)	1	1.2	-	193.0707	191.0561	C ₇ H ₁₂ O ₆	-
2	ácido cafeoilquínico (1241-87-8)	1	10.6	217-328	355.1024	353.0878	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191(C ₇ H ₁₁ O ₆) ⁻
3	ácido 5-feruloilquínico	2	11.0	215-322	369.1552	367.1035	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	191(C ₇ H ₁₁ O ₆) ⁻
4	vicenina 1	2	16.1	216-340	565.1552	563.1406	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	503 (C ₂₄ H ₂₃ O ₁₂) ⁻ ; 473(C ₂₃ H ₂₁ O ₁₁) ⁻ ; 443(C ₂₂ H ₁₉ O ₁₀) ⁻ ; 425(C ₂₂ H ₁₇ O ₉) ⁻ ; 413(C ₂₅ H ₁₇ O ₆) ⁻ ; 383(C ₂₀ H ₁₅ O ₈) ⁻ ; 353(C ₁₉ H ₁₃ O ₇) ⁻ ; 297(C ₁₇ H ₁₃ O ₅) ⁻
5	isoschaftosídeo	2	16.6	216-340	565.1552	563.1406	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	545 (C ₂₆ H ₂₅ O ₁₃) ⁻ ; 503 (C ₂₄ H ₂₃ O ₁₂) ⁻ ; 473(C ₂₃ H ₂₁ O ₁₁) ⁻ ; 443(C ₂₂ H ₁₉ O ₁₀) ⁻ ; 425(C ₂₂ H ₁₇ O ₉) ⁻ ; 413(C ₂₁ H ₁₇ O ₉) ⁻ ; 383(C ₂₀ H ₁₅ O ₈) ⁻ ; 353(C ₁₉ H ₁₃ O ₇) ⁻ ; 297(C ₁₇ H ₁₃ O ₅) ⁻
6	schaftosídeo	2	17.7	217-340	565.1552	563.14.06	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	473(C ₂₃ H ₂₁ O ₁₁) ⁻ ; 443(C ₂₂ H ₁₉ O ₁₀) ⁻ ; 425(C ₂₂ H ₁₇ O ₉) ⁻ ; 413(C ₂₁ H ₁₇ O ₉) ⁻ ; 383(C ₂₀ H ₁₅ O ₈) ⁻ ; 353(C ₁₉ H ₁₃ O ₇) ⁻ ; 297(C ₁₇ H ₁₃ O ₅) ⁻
7	rutina (153-18-4)	1	18.6	279/350	607.1607	609.1461	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301(C ₁₅ H ₉ O ₇) ⁻ ; 271(C ₁₄ H ₇ O ₆) ⁻ ; 255(C ₁₄ H ₇ O ₅) ⁻
8	ácido 3,4-dicafeoilquínico (57378-72-0)	1	20.0	217-325	517.1341	515.1195	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	191(C ₇ H ₁₁ O ₆) ⁻ ; 179(C ₉ H ₇ O ₄) ⁻ ; 173(C ₇ H ₉ O ₅) ⁻ ; 161(C ₉ H ₇ O ₄) ⁻
9	ácido 3,5-dicafeoilquínico (89919-62-0)	1	20.6	218-325	517.1341	515.1195	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	191(C ₇ H ₁₁ O ₆) ⁻ ; 179(C ₉ H ₇ O ₄) ⁻ ; 161(C ₉ H ₇ O ₄) ⁻
10	ácido 4,5-dicafeoilquínico (89886-31-7)	1	22.2	219-325	517.1341	515.11995	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	191(C ₇ H ₁₁ O ₆) ⁻ ; 179(C ₉ H ₇ O ₄) ⁻ ; 173(C ₇ H ₉ O ₅) ⁻
11	putativo diterpenoide clerodano	3	28.5	-	347.1856	391.1762*	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345(C ₂₀ H ₂₅ O ₅) ⁻ ; 217(C ₁₄ H ₁₇ O ₂) ⁻

12	putativo diterpenoide clerodano	3	29.9	-	349.2005	393.1919*	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	—
13	putativo hexosil-coumaroil-triterpeno	3	30.8	310	843.4161	420.2009**	C ₄₅ H ₆₂ O ₁₅	679(C ₃₆ H ₅₅ O ₁₂) ⁻ , 599(C ₃₁ H ₅₁ O ₁₁) ⁻ , 179(C ₉ H ₇ O ₄) ⁻ , 161(C ₉ H ₅ O ₃) ⁻
14	Desconhecido	4	31.3	287-325	-	441.2041**	C ₄₇ H ₆₄ O ₁₆	—
15	dihidroxi-trimetoxiflavona	3	32.6	276-339	345.0969	343.0822	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	313(C ₁₆ H ₉ O ₇) ⁻ , 285(C ₁₅ H ₉ O ₆) ⁻

^aNível de identificação de metabólitos de acordo com a Metabolomics Standards Initiative (MSI). Níveis: (1) metabólitos identificados por comparação com padrão, (2) compostos anotados putativamente, (3) classes de compostos putativamente caracterizados e (4) compostos desconhecidos. TR: tempo de retenção; erros de massa e mSigma abaixo de 5 ppm e 30, respectivamente. * [M + HCOOH-H], ** [2M-H]⁻

5.2 Efeito do tratamento com IBT sobre a ingestão alimentar e calórica dos animais.

Durante o período de oito semanas de indução da obesidade, os animais que receberam dieta hiperlipídica (DH) e água ingeriram menos ração ($3,41 \pm 0,05$ g) que aqueles que consumiram dieta normolipídica (DN) e água ($4,22 \pm 0,03$ g). Independente da dieta, o tratamento diário com IBT (DN + IBT, $3,75 \pm 0,06$ g e DH + IBT, $3,04 \pm 0,04$ g) reduziu o consumo de ração pelos animais, quando comparados aos tratados com água (Figura 8A).

A análise das calorias ingeridas mostrou que, mesmo consumindo menos ração, os animais alimentados com DH ingeriram uma maior quantidade de quilocalorias por dia (DH + água, $17,46 \pm 0,25$ kcal e DH + IBT, $15,55 \pm 0,18$ kcal) que os alimentados com DN (DN + água, $16,03 \pm 0,13$ kcal e DN + IBT, $14,26 \pm 0,22$ kcal) (Figura 8B).

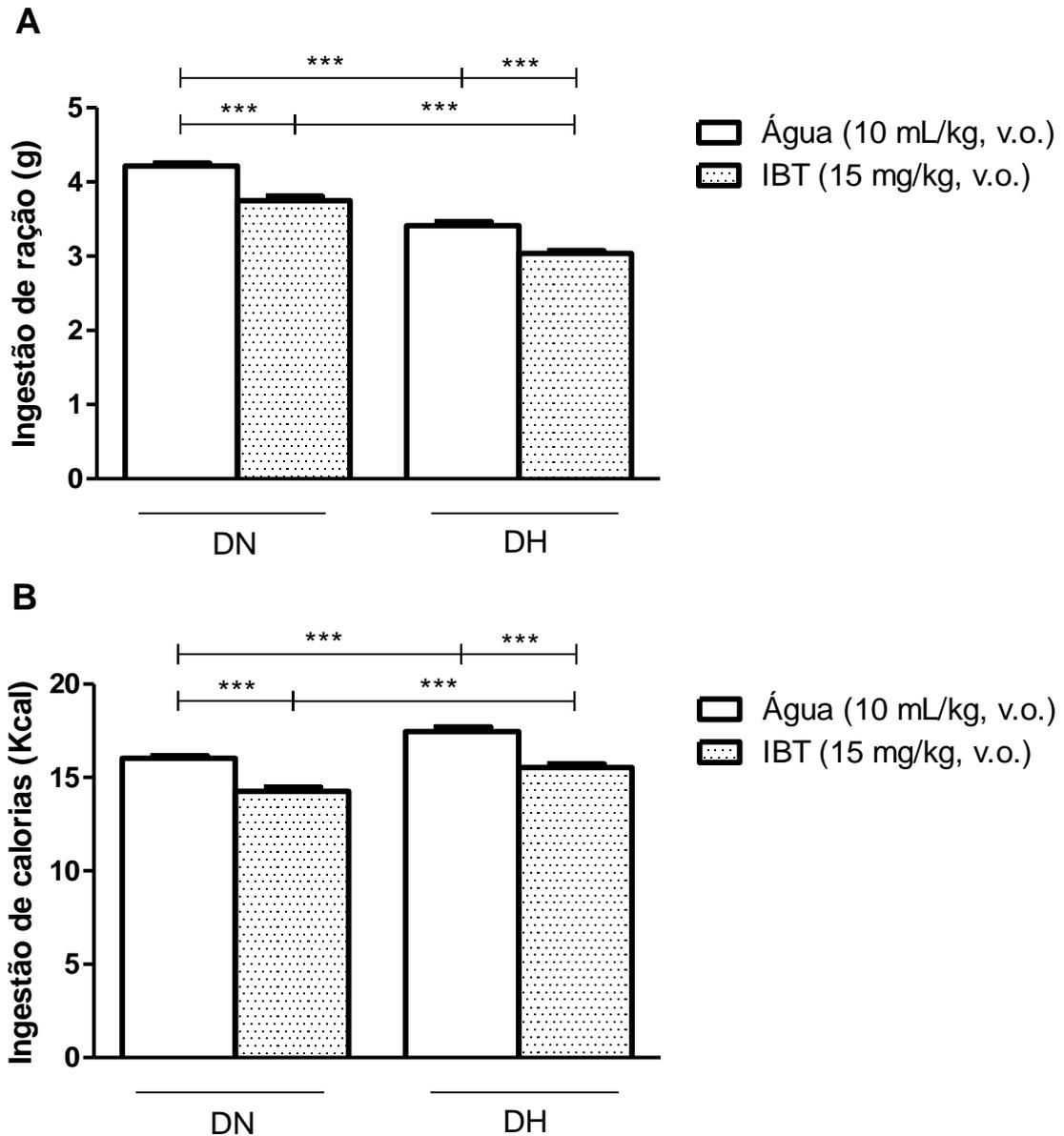


Figura 8: Efeito do tratamento com a IBT sobre o consumo diário de ração (A) e calorias (B). Resultados expressos como média \pm EPM, $n=8$ /grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.3 Efeito do tratamento com IBT sobre o ganho ponderal, massa dos órgãos e coxins adiposos e índice de adiposidade dos animais

Com relação à massa dos animais, todos os grupos partiram de valores semelhantes ($p>0,05$) no início do tratamento (DN + água, $32,62 \pm 0,76$ g; DN + IBT, $30,28 \pm 0,84$ g; DH + água, $30,89 \pm 1,16$ g e DH + IBT, $30,33 \pm 1,07$ g).

Após oito semanas, a massa final dos animais alimentados com DH e tratados com água foi significativamente maior que dos demais grupos. Vale destacar que o

grupo alimentado com DH e tratado com IBT apresentou massa final ($47,22 \pm 1,84$ g) estatisticamente semelhante ao do grupo que ingeriu DN e água ($48,03 \pm 0,90$ g). Ainda, independente da dieta, o tratamento com IBT (DN + IBT, $41,14 \pm 1,41$ g e DH + IBT, $47,22 \pm 1,84$ g) reduziu a massa final dos animais, quando comparados aos tratados com água (DN + água, $48,03 \pm 0,90$ g e DH + água, $55,71 \pm 1,24$ g) (Figura 9A).

Assim, no decorrer das oito semanas houve diferença estatística entre o ganho de massa corporal dos grupos analisados, exceto entre o grupo que recebeu DN e água ($14,76 \pm 0,83$ g) e o que recebeu DH e IBT ($16,89 \pm 0,94$ g) ($p > 0,05$). Os animais alimentados com DH e tratados com água apresentaram ganho de massa corporal maior ($24,82 \pm 1,19$ g) que dos demais grupos. Entretanto, independente da dieta, o tratamento com IBT reduziu o ganho de massa dos animais (DN + IBT, $10,86 \pm 0,86$ g e DH + IBT, $16,89 \pm 0,94$ g) ao longo do tempo, em relação aos tratados com água (DN + água, $14,76 \pm 0,83$ g e DH + água, $24,82 \pm 1,19$ g) (Figura 9B).

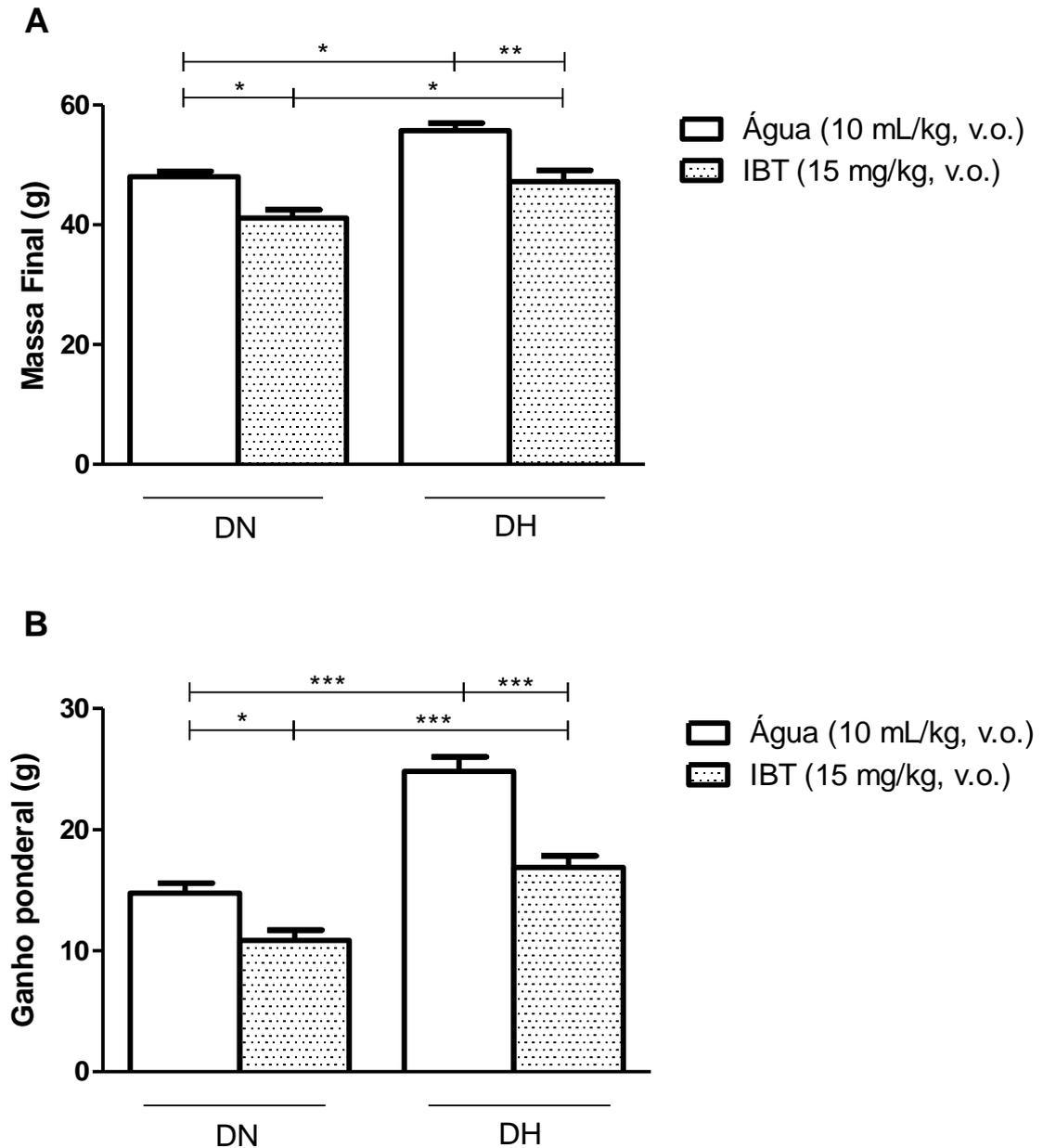


Figura 9: Efeito do tratamento com a IBT sobre a massa final (A) e o ganho ponderal (B). Resultados expressos como média \pm EPM, $n=8$ /grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. * $p<0,05$. ** $p<0,01$. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

Também houve aumento na massa dos coxins adiposos viscerais dos animais alimentados com DH, em relação aos alimentados com DN, sendo que o tratamento com IBT reduziu a massa dos coxins adiposos retroperitoneal e mesentérico dos animais que ingeriram DH, quando comparados aos que receberam a mesma dieta e água (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito do tratamento com a IBT sobre a massa dos órgãos e coxins adiposos.

Parâmetros	DN		DH	
	Água	IBT	Água	IBT
Massa (g)				
Coração	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,27 ± 0,01
Rim	0,46 ± 0,02	0,49 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,51 ± 0,02
Pâncreas	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,02
Duodeno	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Fígado	2,00 ± 0,12	1,79 ± 0,10	2,69 ± 0,20*	1,95 ± 0,15 [#]
Omental	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01*
Retroperitoneal	1,26 ± 0,13	0,65 ± 0,07*	1,76 ± 0,12*	1,13 ± 0,08 ^{&#}
Epididimal	1,98 ± 0,07	1,57 ± 0,09	2,89 ± 0,20*	2,41 ± 0,13 ^{&}
Mesentérico	1,08 ± 0,05	0,79 ± 0,05	2,21 ± 0,15*	1,26 ± 0,11 ^{&#}
Perirrenal	0,28 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,45 ± 0,06*	0,35 ± 0,04

Resultados expressos como média ± EPM, n=8/grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B. trimera*. *Diferença em relação a DN + água. &Diferença em relação a DN + IBT. [#]Diferença em relação a DH + água. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey. $p < 0,05$.

Como demonstrado na tabela acima, o fígado dos animais alimentados com DH e tratados com água apresentou maior massa que dos demais grupos. Destaca-se que o tratamento com IBT manteve a massa do fígado dos animais alimentados com DH semelhante à daqueles que receberam DN e foram tratados com água.

Tanto a dieta quanto o tratamento com a IBT não alteraram a massa dos demais órgãos avaliados (Tabela 4).

Ao calcularmos a massa do tecido adiposo visceral (somatório da massa dos cinco coxins adiposos), observamos que a DH em animais tratados com água promoveu ganho de massa adiposa ($7,39 \pm 0,43$ g) maior que nos demais grupos. Ainda, dentre os animais alimentados com DH, o tratamento com IBT ($5,24 \pm 0,22$ g) preveniu o excessivo ganho de massa adiposa, em relação aos tratados com água ($7,39 \pm 0,43$ g) (Figura 10).

Vale destacar que o tratamento diário com IBT manteve o ganho de massa adiposa dos animais alimentados com DH ($5,24 \pm 0,22$ g) semelhante ao daqueles alimentados com DN e água ($4,15 \pm 0,48$ g) ($p > 0,05$) (Figura 10).

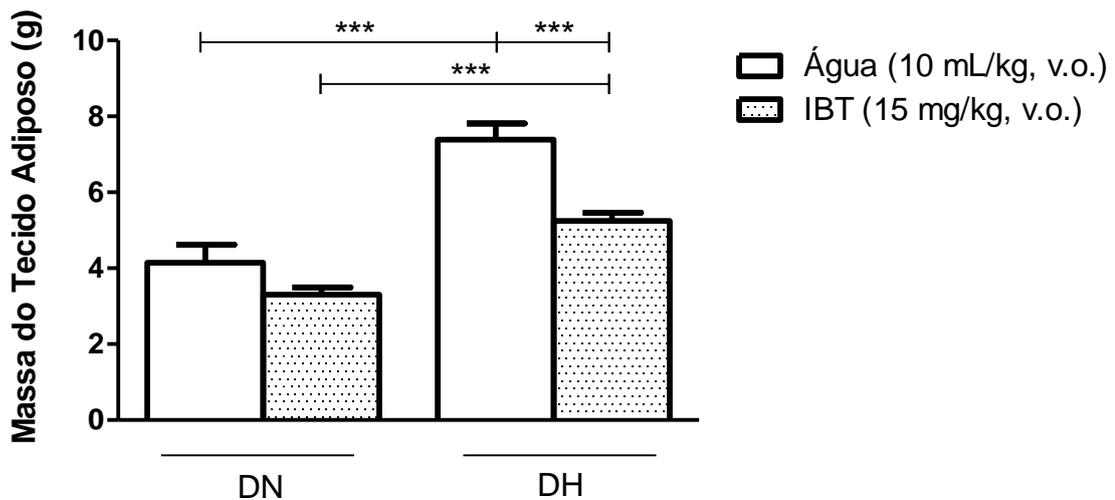


Figura 10: Efeito do tratamento com a IBT sobre a massa do tecido adiposo visceral. Resultados expressos como média \pm EPM, $n=8$ /grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

Ainda, o índice de adiposidade dos animais demonstrou o mesmo padrão de resposta observado na variação do ganho de massa corporal, corroborando tal resultado. Sendo assim, verificamos que a DH induziu obesidade nos animais tratados com água ($13,25 \pm 0,62$ %), quando comparados àqueles que receberam DN e água ($9,67 \pm 0,36$ %). Em contrapartida, os animais alimentados com DH que receberam IBT ($11,09 \pm 0,29$ %) não desenvolveram obesidade, uma vez que não houve diferença entre o índice de adiposidade desse grupo em relação ao alimentado com DN e tratado com água ($9,67 \pm 0,36$ %) ($p>0,05$). Também observamos que o tratamento diário com a IBT reduziu o índice de adiposidade dos animais, independente da dieta (DN + água, $9,67 \pm 0,36$ %; DN + IBT, $7,94 \pm 0,26$ %; DH + água, $13,25 \pm 0,62$ % e DH + IBT, $11,09 \pm 0,29$ %) (Figura 11).

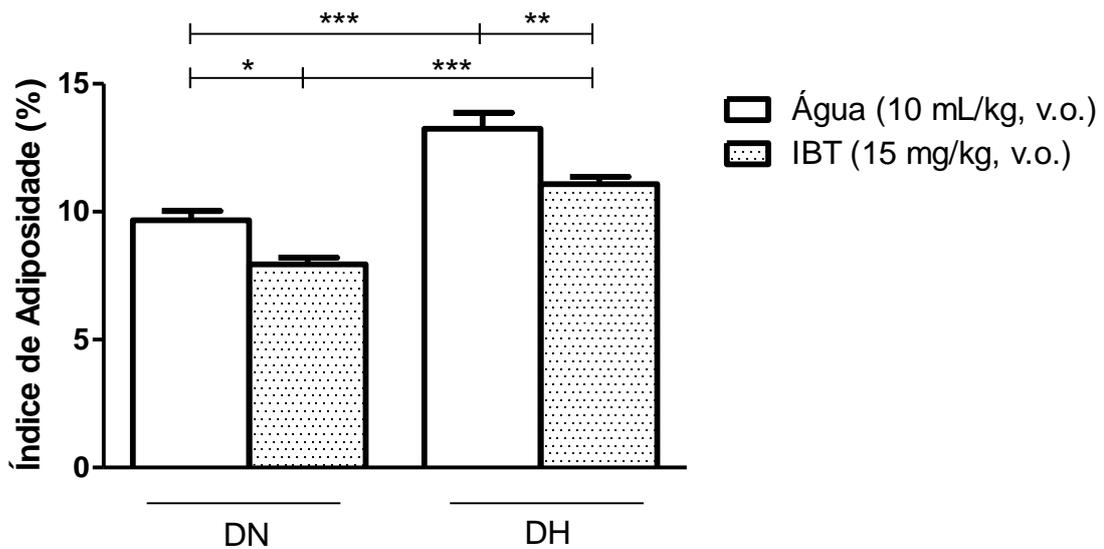


Figura 11: Efeito do tratamento com a IBT sobre o índice de adiposidade. Resultados expressos como média \pm EPM, $n=8$ /grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. * $p<0,05$. ** $p<0,01$. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.4 Efeito do tratamento com IBT sobre o perfil glicêmico dos animais

5.4.1 Teste de sensibilidade à insulina

O gráfico da área sob a curva (ASC) revelou que entre os animais tratados com água, aqueles alimentados com DH (10763 ± 640 ASC) tornaram-se resistentes à insulina, quando comparados aos alimentados com DN (7784 ± 312 ASC) (Figura 12B). Em contrapartida, o tratamento com IBT impediu que os animais alimentados com DH desenvolvessem resistência insulínica (7759 ± 477 ASC), uma vez que o teste de sensibilidade à insulina desses animais apresentou resultado semelhante ao daqueles que receberam DN e água (7784 ± 312 ASC).

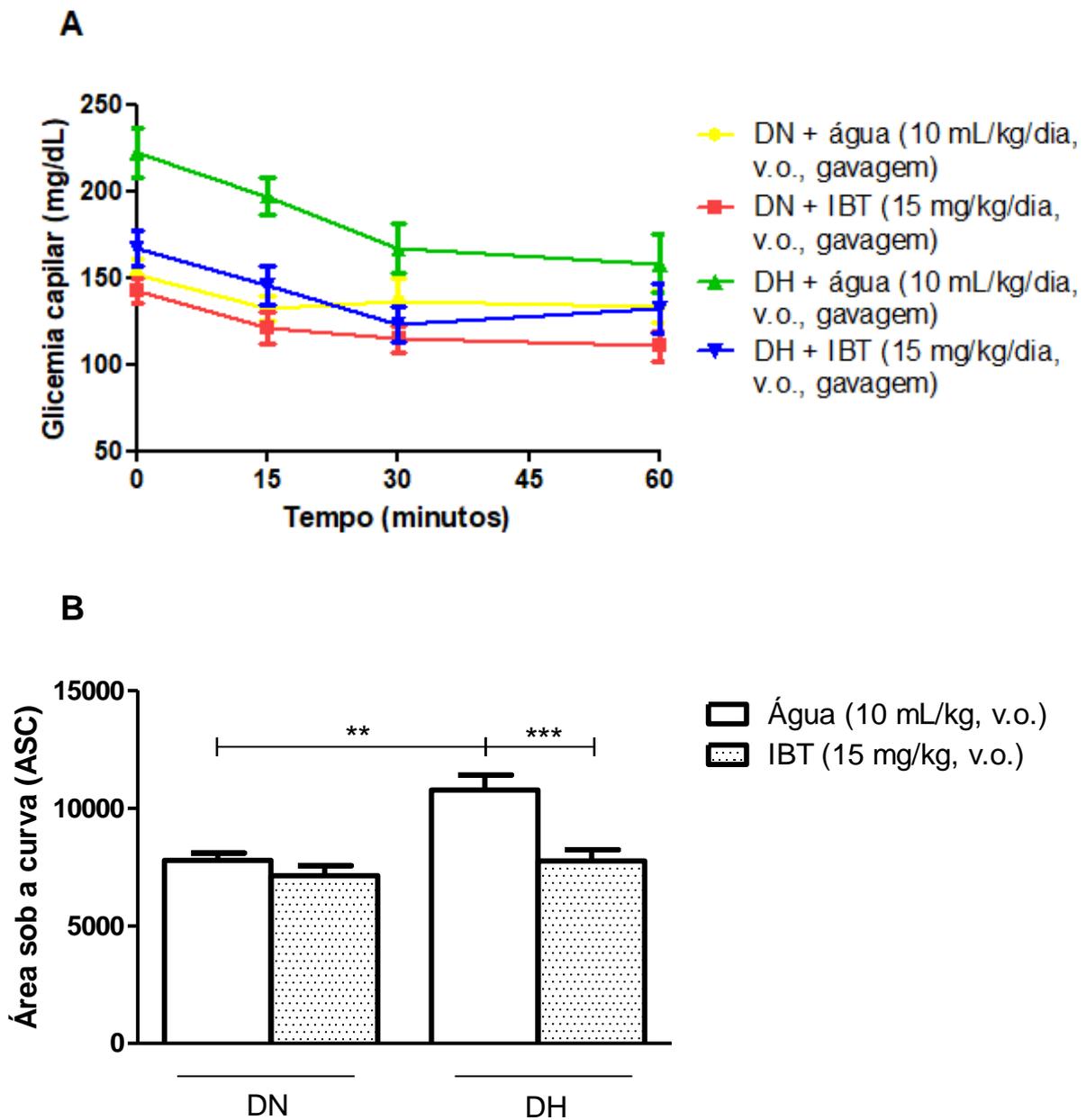


Figura 12: Efeito do tratamento com IBT sobre a sensibilidade à insulina. (A) Curva de sensibilidade à insulina, de acordo com o grupo experimental, em cada tempo. (B) Área sob a curva da sensibilidade à insulina, de acordo com o grupo experimental. Resultados expressos como média \pm EPM. $n=8/\text{grupo}$. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. ** $p<0,01$. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

Observamos que no tempo zero, antes da administração intraperitoneal de insulina, os animais alimentados com DH e tratados com água apresentavam glicemia maior ($222,00 \pm 14,27$ mg/dL) que os animais alimentados com DN, independente do tratamento (DN + água, $151,50 \pm 9,57$ mg/dL; DN + IBT, $142,75 \pm 6,96$ mg/dL) ($p<0,001$), bem como daqueles alimentados com DH e tratados com IBT ($167,22 \pm$

10,12 mg/dL) ($p < 0,01$). Ainda, esse perfil de resposta foi mantido após 15 minutos da injeção de insulina (DN + água, $132,50 \pm 6,84$ mg/dL; DN + IBT, $120,88 \pm 9,35$ mg/dL; DH + água, $197,29 \pm 10,22$ mg/dL e DH + IBT, $145,89 \pm 11,46$ mg/dL) e depois de 30 minutos ainda havia diferença entre os animais alimentados com DH, apresentando o grupo tratado com IBT menor glicemia ($123,44 \pm 10,26$ mg/dL) que o tratado com água ($167,29 \pm 14,07$ mg/dL) ($p < 0,05$). Após uma hora da injeção de insulina, não havia diferença na glicemia dos animais de nenhum dos grupos analisados (DN + água, $133,25 \pm 9,26$ mg/dL; DN + IBT, $110,88 \pm 8,56$ mg/dL; DH + água, $158,29 \pm 16,87$ mg/dL e DH + IBT, $132,44 \pm 14,36$ mg/dL) ($p > 0,05$) (Figura 12A).

Vale destacar que, entre os grupos que receberam DN, não houve diferença entre a curva glicêmica em resposta à injeção de insulina dos animais que tomaram água (7784 ± 312 ASC), quando comparados aos que ingeriram IBT (7129 ± 426 ASC) ($p > 0,05$).

5.4.2 Glicemia de Jejum

Em relação à glicemia dos animais, em jejum, observamos que a DH induziu um quadro de hiperglicemia nos animais tratados com água ($151,8 \pm 14,68$ mg/dL), quando comparados a ambos os grupos que receberam DN (DN + água, $91,11 \pm 4,38$ mg/dL; DN + IBT, $94,00 \pm 5,60$ mg/dL). Em compensação, o tratamento diário com IBT modulou a hiperglicemia gerada pela DH, uma vez que não houve diferença entre a glicemia do grupo alimentado com DH e tratado com IBT ($120,5 \pm 6,48$ mg/dL) e do grupo que recebeu DN e água ($91,11 \pm 4,38$ mg/dL) ($p > 0,05$).

Ainda, assim como no teste de sensibilidade à insulina, ao compararmos a glicemia de jejum dos animais alimentados com DN, observamos que o tratamento com IBT não provocou alteração nesse parâmetro (DN + água, $91,11 \pm 4,38$ mg/dL; DN + IBT, $94,00 \pm 5,60$ mg/dL) ($p > 0,05$) (Figura 13).

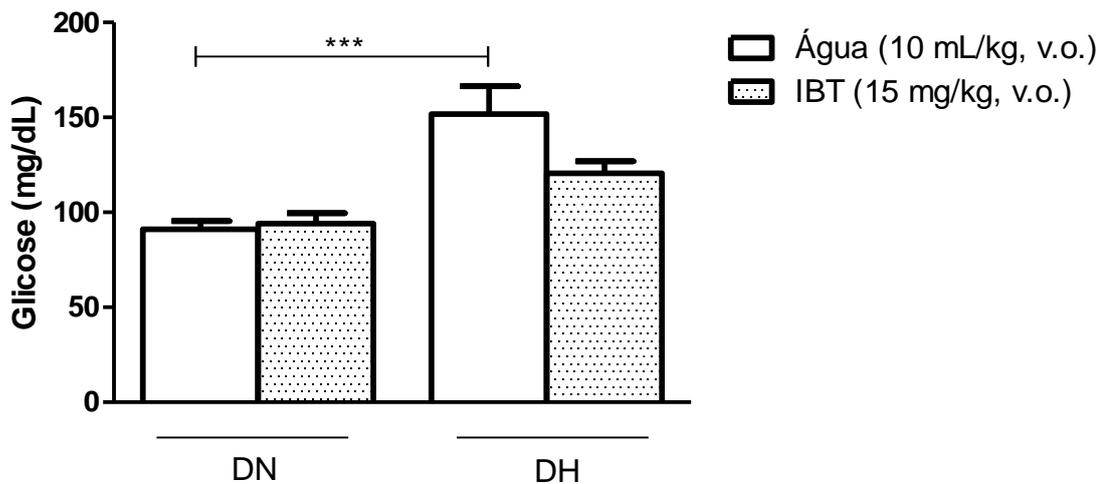


Figura 13: Efeito do tratamento com a IBT sobre a glicemia de jejum. Resultados expressos como média \pm EPM. $n=8$ /grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.4.3 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)

Assim como no teste de sensibilidade à insulina, a área sob a curva do TTOG mostrou que os animais alimentados com DH e tratados com água desenvolveram hiperglicemia (27059 ± 2317 ASC), quando comparados aos grupos que ingeriram DN (DN + água, 17370 ± 1435 ASC; DN + IBT, 13382 ± 1410 ASC). Em contrapartida, foi observado efeito modulador da glicemia nos animais alimentados com DH e tratados com IBT, uma vez que não houve diferença entre a área sob a curva desse grupo (25530 ± 1849 ASC) em relação ao que recebeu DN e água (21308 ± 1267 ASC) ($p>0,05$) (Figura 14B).

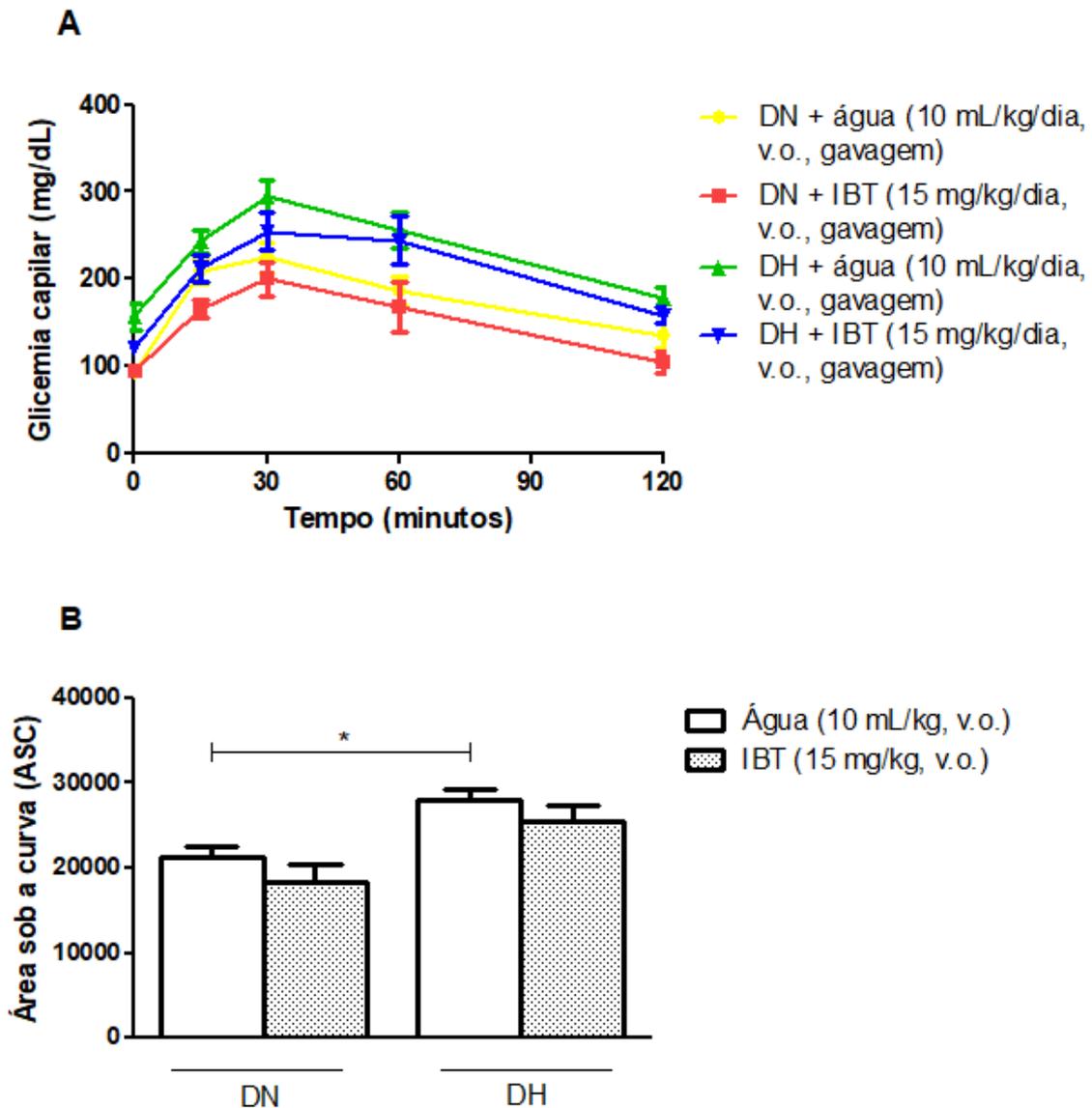


Figura 14: Efeito do tratamento com a IBT sobre a tolerância oral à glicose. (A) Curva de tolerância oral à glicose, de acordo com o grupo experimental, em cada tempo. (B) Área sob a curva da tolerância oral à glicose, de acordo com o grupo experimental. Resultados expressos como média \pm EPM. $n=8$ /grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. $*p<0,05$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.5 Efeito do tratamento com IBT sobre os parâmetros bioquímicos dos animais

Tanto a dieta quanto o tratamento não alteraram o nível sérico de triglicérides em nenhum dos grupos estudados (DN + água, $149,7 \pm 14,21$ mg/dL; DN + IBT, $121,3 \pm 11,87$ mg/dL; DH + água, $142,4 \pm 7,31$ mg/dL e DH + IBT, $149,7 \pm 8,48$ mg/dL) ($p>0,05$) (Figura 15A). O mesmo perfil foi observado com relação ao colesterol de alta densidade (HDL) (DN + água, $90,00 \pm 9,65$ mg/dL; DN + IBT, $80,89 \pm 6,37$ mg/dL; DH + água, $92,98 \pm 3,41$ mg/dL e DH + IBT, $95,30 \pm 4,56$ mg/dL) ($p>0,05$) (Figura 15B).

Entretanto, ao compararmos o nível sérico do colesterol de baixa densidade (LDL), observamos que a DH promoveu um aumento significativo desse parâmetro nos animais tratados com água ($97,12 \pm 3,97$ mg/dL), em relação aos alimentados com DN (DN + água, $40,04 \pm 8,36$ mg/dL; DN + IBT, $26,72 \pm 3,48$ mg/dL).

Vale destacar que o tratamento diário com a IBT preveniu a elevação do nível de LDL nos animais alimentados com DH ($39,32 \pm 5,84$ mg/dL), quando comparados aos tratados com água ($97,12 \pm 3,97$ mg/dL). Assim, o tratamento com IBT manteve o nível de LDL daqueles animais semelhante ao dos animais que ingeriram DN, independente do tratamento (DN + água, $40,04 \pm 8,36$ mg/dL; DN + IBT, $26,72 \pm 3,48$ mg/dL) ($p > 0,05$) (Figura 15C).

Outrossim, a análise do nível sérico de colesterol total nos animais tratados com água revelou que a DH foi eficaz no desenvolvimento de hipercolesterolemia, quando comparada à DN ($218,6 \pm 5,86$ mg/dL e $160,0 \pm 17,32$ mg/dL, respectivamente). Entretanto, dentre os animais alimentados com DH, os tratados com IBT apresentaram menor nível sérico de colesterol total ($164,6 \pm 9,92$ mg/dL) que aqueles tratados com água ($218,6 \pm 5,86$ mg/dL), além de apresentarem nível semelhante ao dos animais que receberam DN e água ($160,0 \pm 17,32$ mg/dL) ($p > 0,05$) (Figura 15D).

Ao calcularmos o índice aterogênico (IA) dos animais, observamos que esses resultados corroboram os encontrados para os níveis séricos de colesterol total e de LDL. O grupo alimentado com DH e tratado com água apresentou maior índice glicêmico ($2,38 \pm 0,06$ IA) que os alimentados com DN (DN + água, $1,78 \pm 0,05$ IA e DN + IBT, $1,66 \pm 0,04$ IA). Em contrapartida, o tratamento com IBT manteve o índice aterogênico dos animais alimentados com DH ($1,72 \pm 0,05$ IA) menor que dos tratados com água ($2,38 \pm 0,06$ IA), e semelhante ao dos animais alimentados com DN (DN + água, $1,78 \pm 0,05$ IA e DN + IBT, $1,66 \pm 0,04$ IA) ($p > 0,05$) (Figura 15E). Assim, destacamos a relevância do tratamento diário com IBT para a prevenção do surgimento de doenças ateroscleróticas.

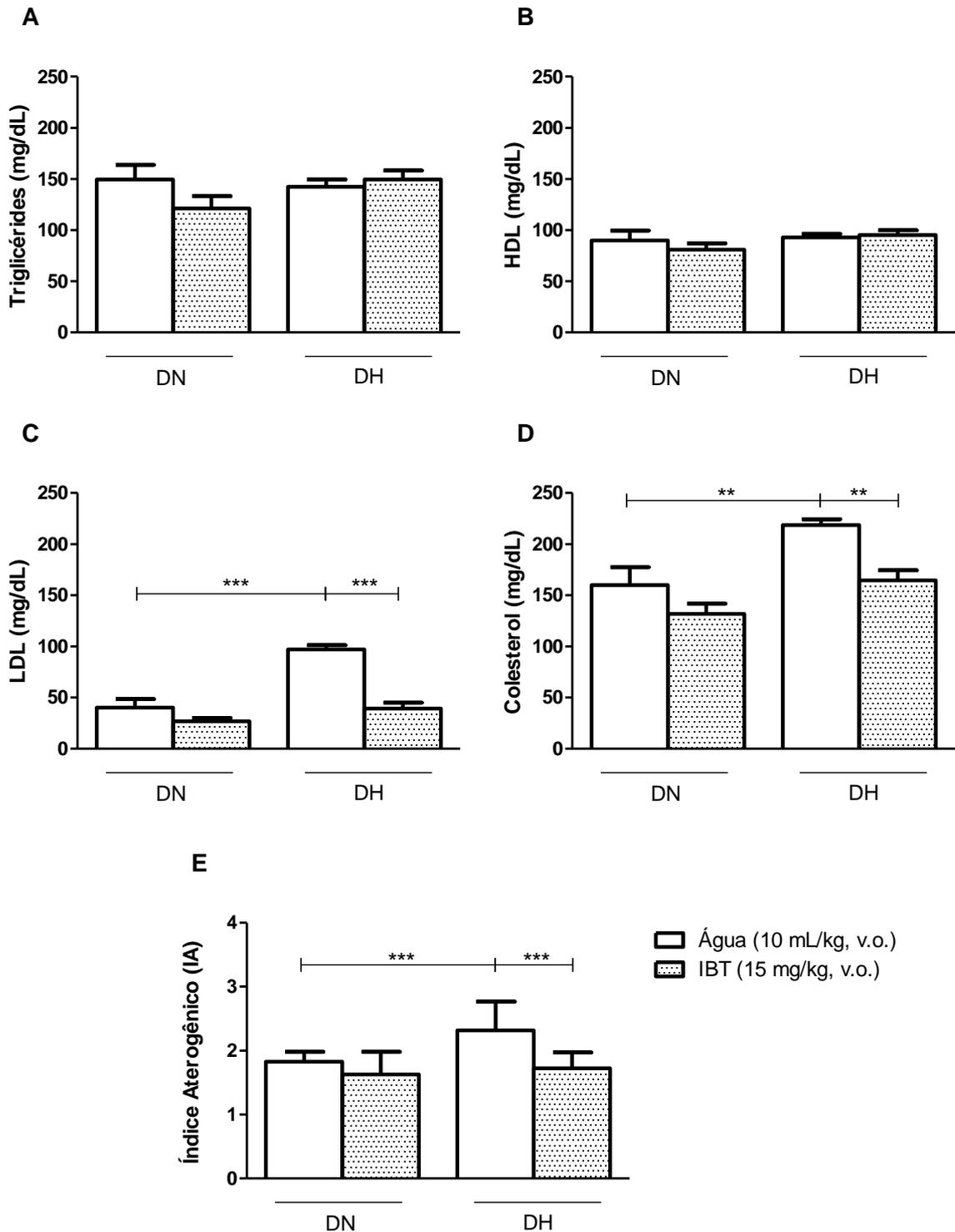


Figura 15: Efeito do tratamento com a IBT sobre os níveis séricos de Triglicérides (A), Colesterol HDL (B), Colesterol LDL (C), Colesterol total (D) e sobre o Índice Aterogênico (E). Resultados expressos como média \pm EPM, $n=6$ /grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. $p^{**}<0,01$. $p^{***}<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.6 Efeito do tratamento com IBT sobre a histologia dos órgãos e coxim adiposo epididimal dos animais

A análise histológica do fígado mostrou que a DH foi eficaz na indução de esteatose hepática nos animais tratados com água. Em contrapartida, o tratamento com IBT preveniu o desenvolvimento dessa comorbidade nos animais que ingeriram DH (Figura 16).

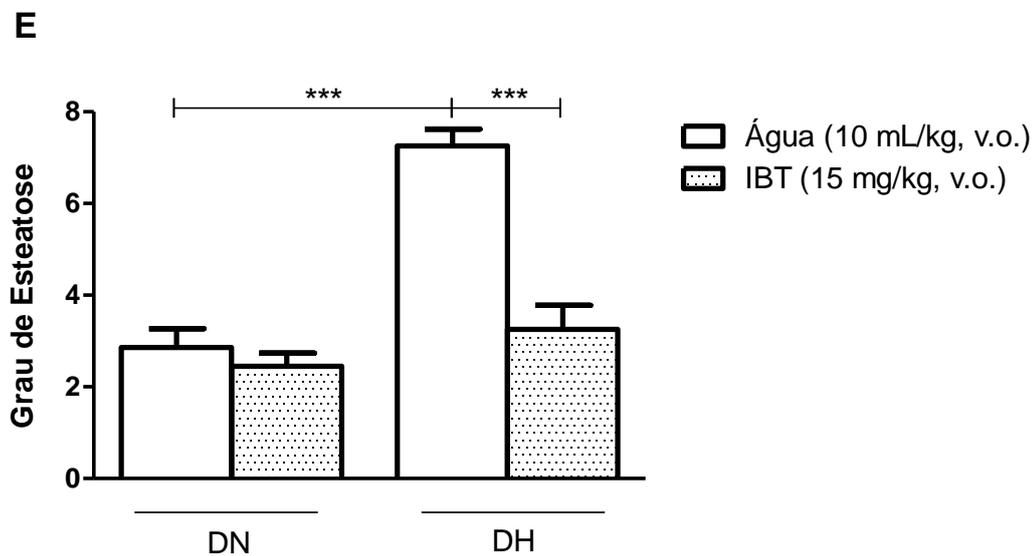
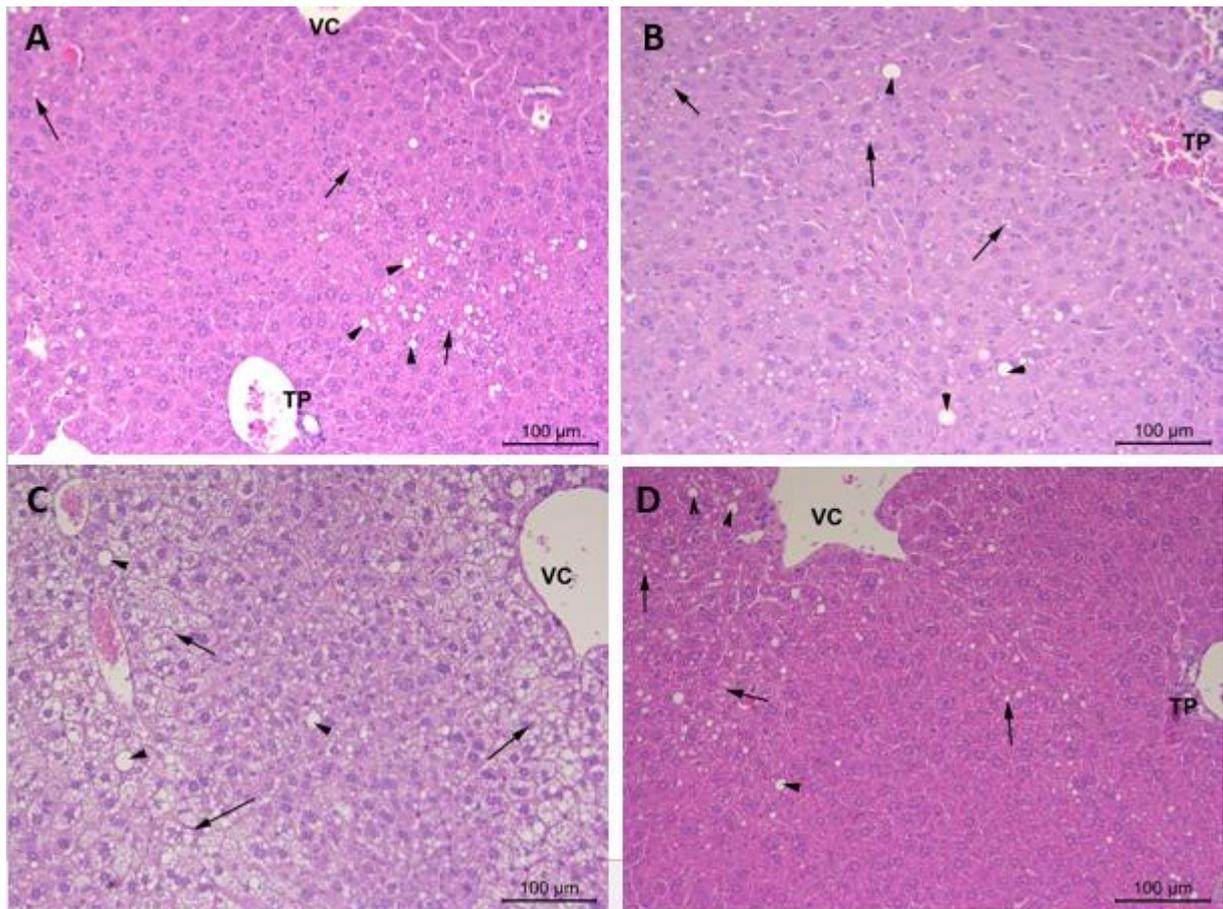


Figura 16: Efeito do tratamento com a IBT sobre a histologia do fígado. Cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina. Aumento de 20x. **(A)** DN + água, **(B)** DN + IBT, **(C)** DH + água, **(D)** DH + IBT e **(E)** Grau de esteatose. VC: Veia centro lobular, TP: tríade portal, Cabeça de seta: esteatose macrovesicular, Seta longa: esteatose microvesicular. Resultados expressos como mediana em escore, n=5/grupo. Ausência da lesão - 2 pontos; lesão leve - 4 pontos; lesão moderada - 6 pontos e lesão intensa - 8 pontos. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. *** $p < 0,001$. Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Mann-Whitney.

Conforme demonstrado, ambos os grupos de animais alimentados com DN apresentaram padrões morfológicos hepáticos normais, sem nenhuma alteração ($p>0,05$). Já os animais não tratados e alimentados com DH apresentaram padrão de esteatose intensa microvesicular, nas zonas 1, 2 e 3 e macrovesicular, nas zonas 2 e 3 dos lóbulos hepáticos. Em contrapartida, os tratados com IBT e alimentados com DH apresentaram um padrão de esteatose leve, micro e macrovesicular nas zonas 2 e 3 dos lóbulos hepáticos (Figura 16). Apesar da mediana da esteatose hepática desse grupo ter sido leve, não houve diferença significativa em relação à mediana dos grupos alimentados com DN, onde a esteatose foi ausente ($p>0,05$).

Tanto a dieta quanto o tratamento com IBT não alteraram a histologia dos demais órgãos avaliados ($p>0,05$) (dados não mostrados).

Com relação à análise histológica do coxim adiposo epididimal dos animais, observamos que houve diferença na área dos adipócitos de todos os grupos avaliados (DN + água, $580,1 \pm 6,60 \mu\text{m}^2$; DN + IBT, $525,3 \pm 5,43 \mu\text{m}^2$; DH + água, $740,3 \pm 6,43 \mu\text{m}^2$ e DH + IBT, $695,1 \pm 7,75 \mu\text{m}^2$). Ressaltamos que o tratamento com a IBT reduziu a área dos adipócitos de ambos os grupos, independente da dieta oferecida aos animais, quando comparados aos tratados com água, conforme demonstrado na figura 17.

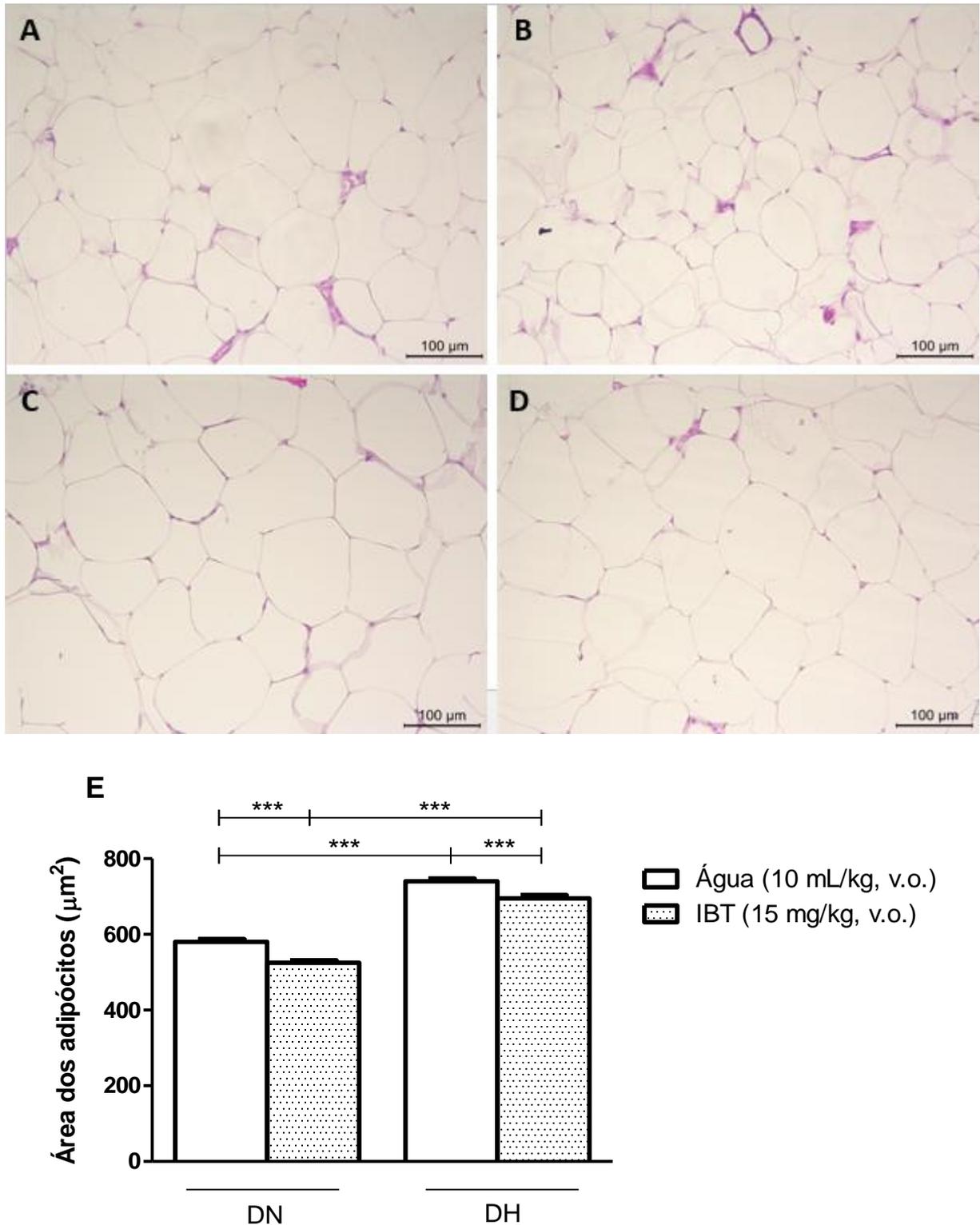


Figura 17: Efeito do tratamento com a IBT sobre a área dos adipócitos do coxim adiposo epididimal. Cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina. Aumento de 20x. **(A)** DN + água, **(B)** DN + IBT, **(C)** DH + água, **(D)** DH + IBT e **(E)** Área dos adipócitos (µm²). Resultados expressos como média ± EPM, n=5/grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. ****p*<0,001. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

Também observamos que nos animais alimentados com DH e tratados com água houve maior formação de estruturas tipo coroa (ETC) formadas por macrófagos, ao redor dos adipócitos ($4,20 \pm 0,61$ ETC), quando comparados aos animais alimentados com DN (DN + água, $0,82 \pm 0,20$ ETC; DN + IBT, $0,76 \pm 0,12$ ETC). Porém, ressaltamos que o tratamento com IBT preveniu a formação dessas estruturas em animais alimentados com DH ($1,36 \pm 0,30$ ETC), com relação aos tratados com água ($4,20 \pm 0,61$ ETC), bem como manteve esse parâmetro semelhante ao dos animais alimentados com DN, já descritos acima ($p > 0,05$) (Figura 18).

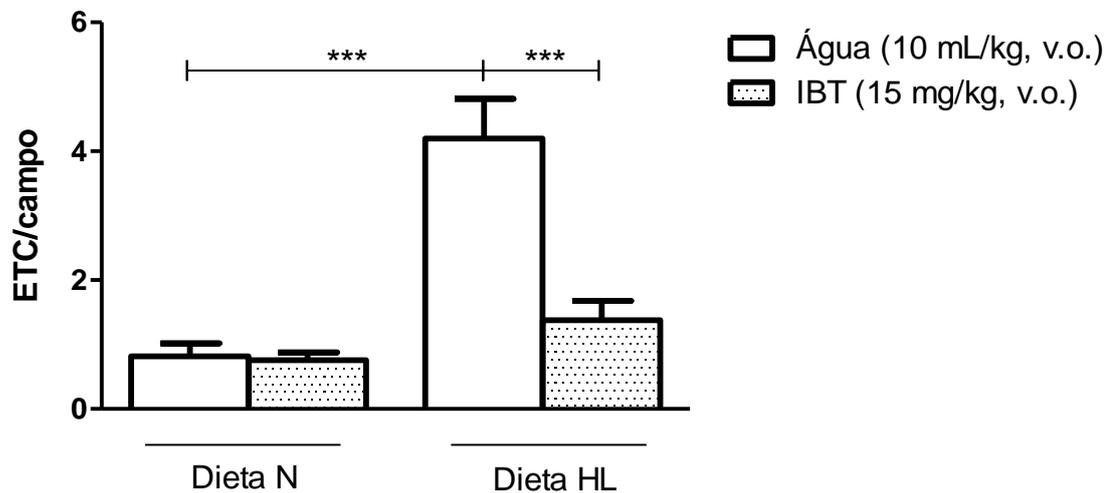
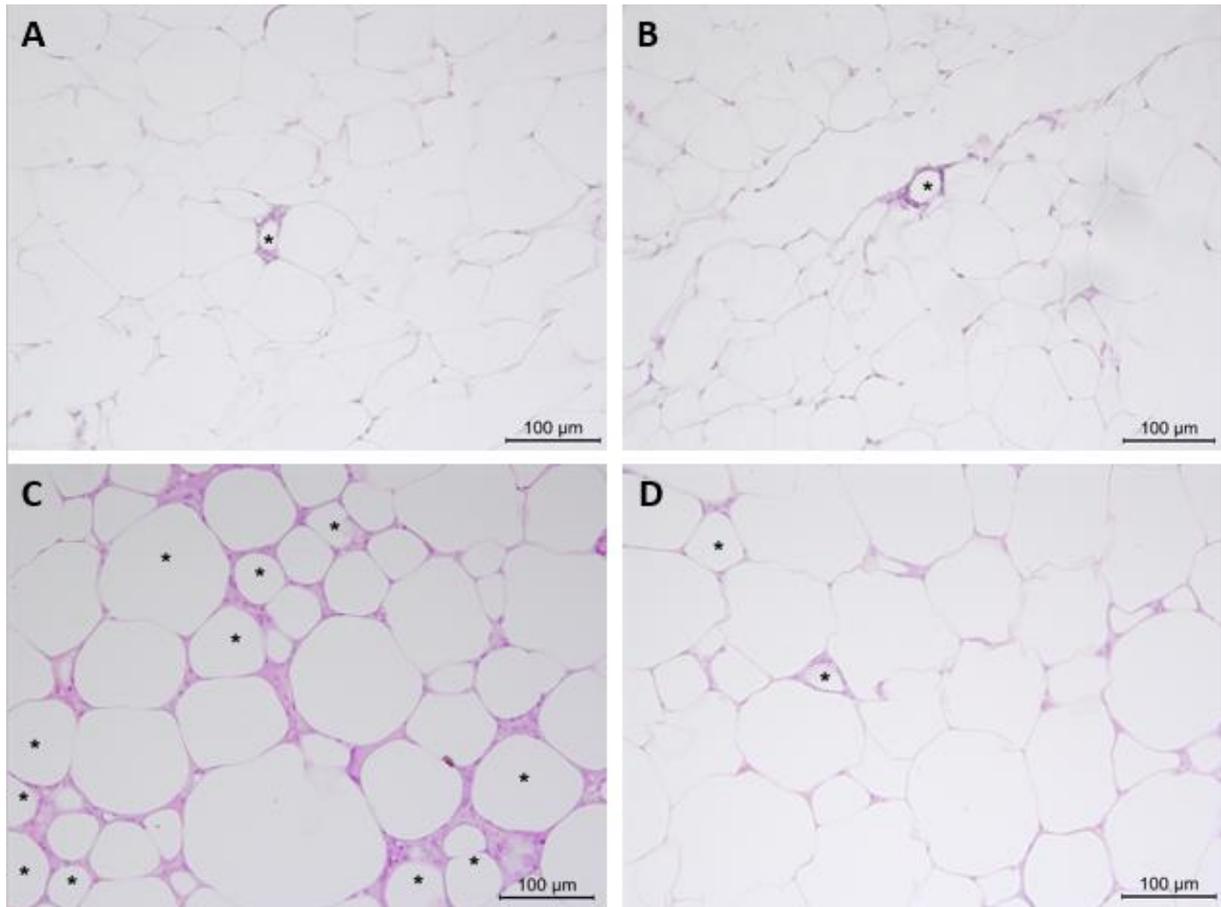


Figura 18: Efeito do tratamento com a IBT sobre a formação de estruturas tipo coroa (ETC) por macrófagos, ao redor dos adipócitos. Cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina. Aumento de 20x. (A) DN + água, (B) DN + IBT, (C) DH + água, (D) DH + IBT e (E) ETC/campo. Resultados expressos como média ± EPM, n=5/grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B. trimer*. *** $p < 0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.7 Efeito do tratamento com IBT sobre o infiltrado leucocitário

A ingestão de DH aumentou o número de células peritoneais nos animais tratados com água (2280 ± 127 células/mm³), quando comparados a ambos os grupos alimentados com DN (DN + água, 1540 ± 95 células/mm³ e DN + IBT, 1531 ± 132 células/mm³). Ainda, o tratamento com IBT inibiu o aumento dessas células nos animais alimentados com DH (1481 ± 81 células/mm³), quando comparados aos que receberam a mesma dieta e foram tratados com água (2280 ± 127 células/mm³).

Vale destacar que o número de células peritoneais dos animais alimentados com DH e tratados com IBT (1481 ± 81 células/mm³) foi semelhante ao dos animais alimentados com DN (DN + água, 1540 ± 95 células/mm³ e DN + IBT, 1531 ± 132 células/mm³) (Figura 19).

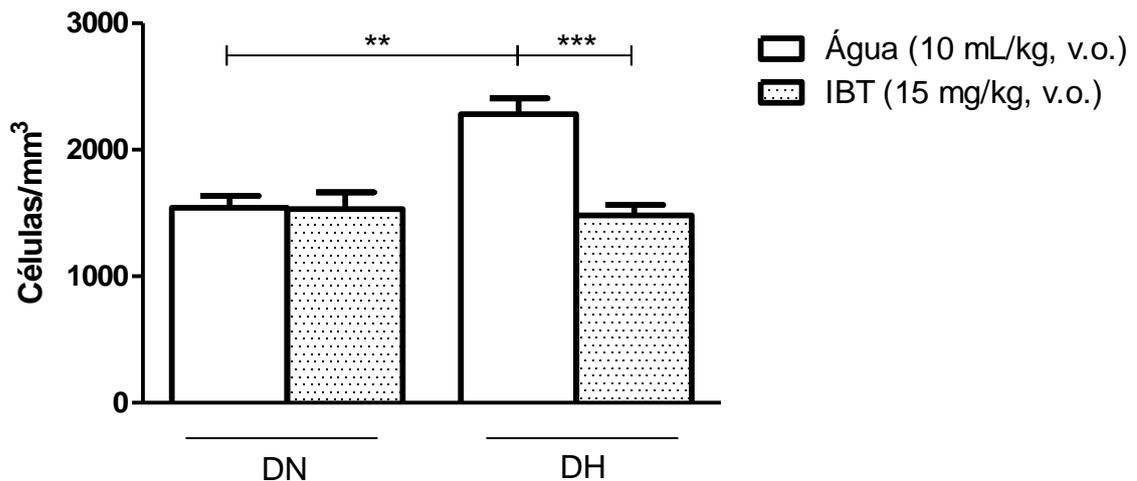


Figura 19: Efeito do tratamento com a IBT sobre o número de células peritoneais. Resultados expressos como média \pm EPM. $n=8$ /grupo. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. ** $p<0,01$. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.8 Efeito do tratamento com IBT sobre as funções celulares de macrófagos peritoneais murinos

5.8.1 Viabilidade celular (MTT)

As dietas e o tratamento com IBT não alteraram a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais dos animais (DN + água, $98,21 \pm 0,98$ %; DN + IBT, $92,91 \pm$

1,96 %; DH + água, $94,49 \pm 2,38$ % e DH + IBT, $95,89 \pm 1,36$ %) ($p > 0,05$), como demonstrado na figura 20A.

Entretanto, nos ensaios *in vitro*, o estímulo com IBT em concentração equivalente a 10x mais (6 mg/mL) que o administrado *in vivo* (0,6 mg/mL), provocou redução significativa na viabilidade celular dos macrófagos, tanto na presença quanto na ausência de LPS ($79,85 \pm 2,38$ e $84,82 \pm 2,88$ %, respectivamente), quando comparada aos controles negativos ($92,44 \pm 1,80$ e 100,0 %, respectivamente) (Figura 20B).

Por isso, procedemos todos os ensaios *in vitro* subsequentes utilizando a IBT apenas nas concentrações 0,06 e 0,6 mg/mL.

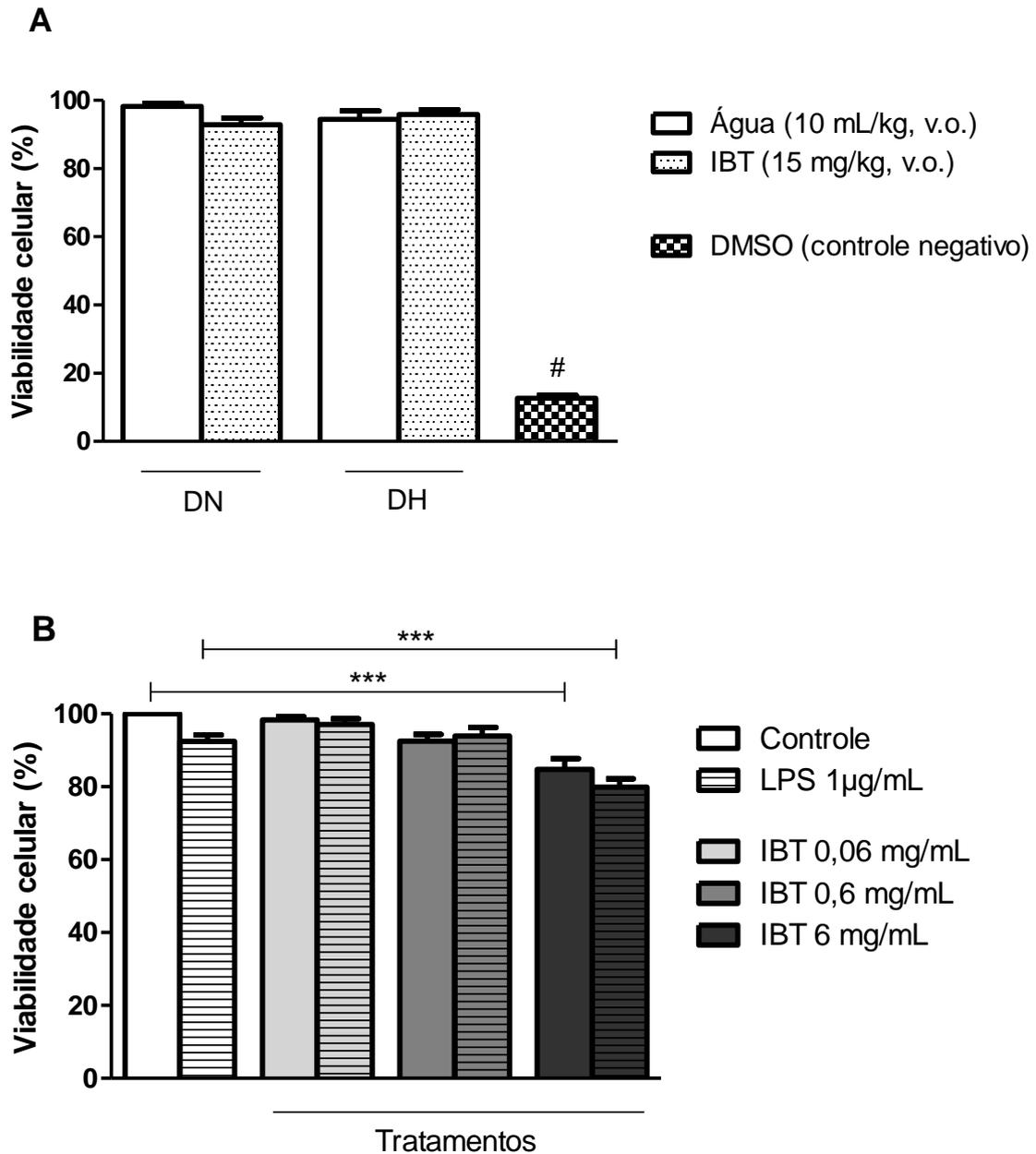


Figura 20: Efeito do tratamento com a IBT sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais *ex vivo* (A) e *in vitro* (B). Resultados expressos como média \pm EPM, $n=6$ /grupo para *ex vivo* e $n=3$ /grupo para *in vitro*. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. LPS: Lipopolissacarídeo de *E. coli*. *** $p < 0,001$. #Diferença estatística em relação aos demais grupos. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.8.2 Produção e liberação de Óxido Nítrico (NO)

Nos ensaios com macrófagos peritoneais *ex vivo*, ou seja, oriundos de animais que receberam as diferentes dietas (DN ou DH) e tratamentos (água ou IBT) por oito semanas, observamos que a produção e liberação de NO por essas células foi maior

nos animais alimentados com DH e tratados com água ($34,12 \pm 4,34 \mu\text{M NO}_2^-$), quando comparados aos alimentados com DN (DN + água, $7,09 \pm 1,61$ e DN + IBT, $10,41 \pm 1,00 \mu\text{M NO}_2^-$). Ainda, os macrófagos oriundos de animais alimentados com DH e tratados com IBT apresentaram níveis de nitrito menores ($8,36 \pm 1,14 \mu\text{M NO}_2^-$) que os alimentados com essa dieta e tratados com água ($34,12 \pm 4,34 \mu\text{M NO}_2^-$), e semelhantes aos dos animais alimentados com DN, independente do tratamento (DN + água, $7,09 \pm 1,61 \mu\text{M NO}_2^-$ e DN + IBT, $10,41 \pm 1,00 \mu\text{M NO}_2^-$) ($p > 0,05$) (Figura 21A).

Ao analisarmos a liberação de NO *in vitro*, por macrófagos oriundos de animais não tratados e alimentados com dieta padrão Nuvital®, observamos que o LPS, aqui utilizado como estímulo positivo para mimetizar o processo inflamatório subclínico gerado pela obesidade, aumentou significativamente a produção e liberação de NO quando comparado ao controle negativo (macrófagos sem estímulo) ($28,39 \pm 0,45$ e $6,68 \pm 0,51 \mu\text{M NO}_2^-$, respectivamente). Outrossim, o estímulo *in vitro* com IBT não provocou alteração na liberação basal de NO, independente da concentração utilizada (IBT 0,06 mg/mL, $6,60 \pm 0,97 \mu\text{M NO}_2^-$; IBT 0,6 mg/mL, $6,66 \pm 0,59 \mu\text{M NO}_2^-$ e Controle, $6,68 \pm 0,51 \mu\text{M NO}_2^-$) ($p > 0,05$).

Ainda, na presença de LPS, os macrófagos estimulados com IBT em concentração equivalente (0,6 mg/mL) à dose utilizada *in vivo* (15 mg/kg/dia) apresentaram liberação de NO menor ($10,68 \pm 0,55 \mu\text{M NO}_2^-$) que do controle positivo ($28,39 \pm 0,45 \mu\text{M NO}_2^-$), indicando efeito modulador negativo dessa dose de IBT sob a inflamação (Figura 21B).

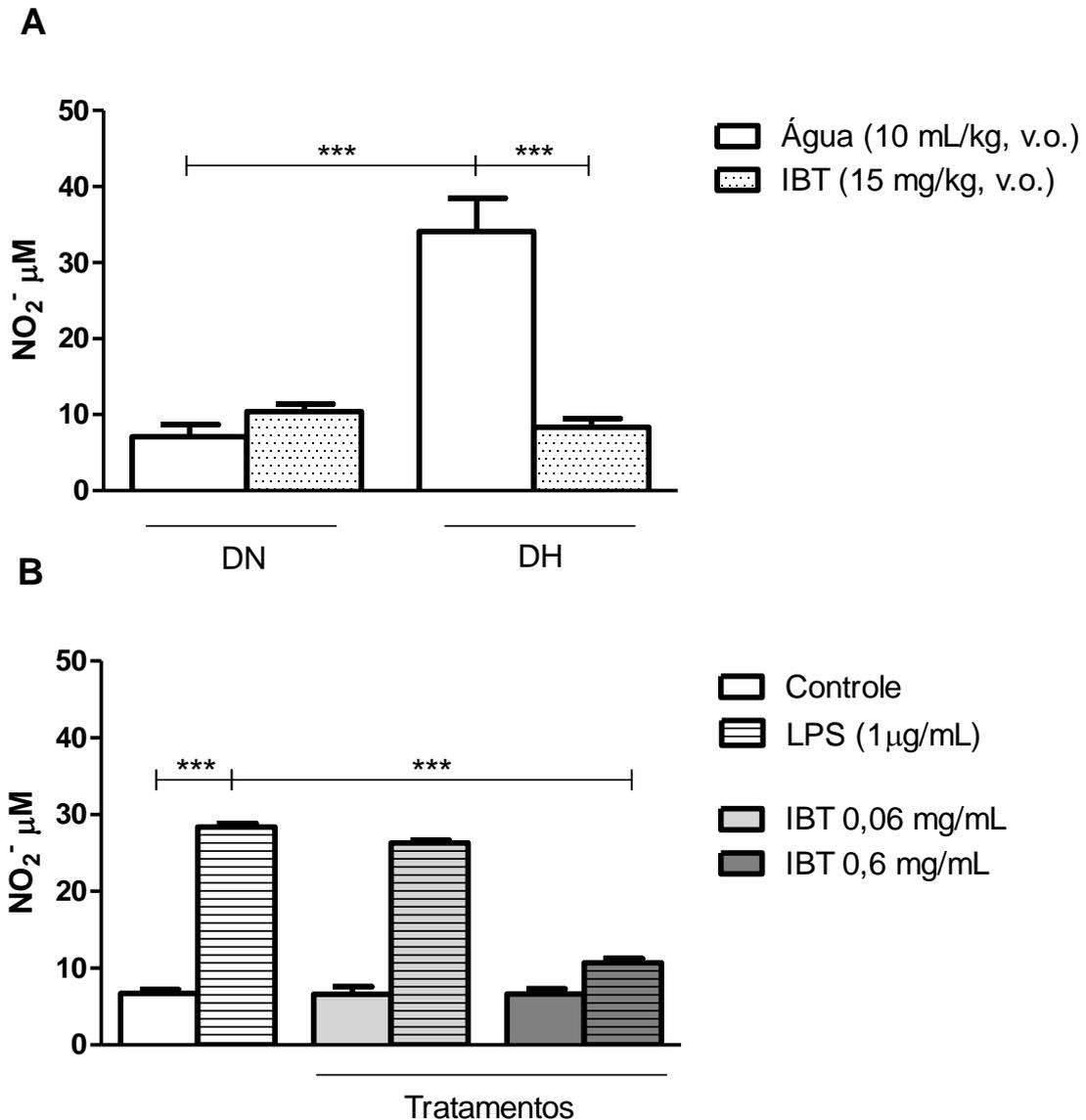


Figura 21: Efeito do tratamento com a IBT a produção e liberação de NO por macrófagos peritoneais *ex vivo* (A) e *in vitro* (B). Resultados expressos como média \pm EPM, $n=6/\text{grupo}$ para *ex vivo* e $n=3/\text{grupo}$ para *in vitro*. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B. trimera*. LPS: Lipopolissacarídeo de *E. coli*. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.8.3 Produção e liberação de Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Observamos que tanto as diferentes dietas quanto os tratamentos não alteraram a produção e liberação de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais no ensaio *ex vivo* (DN + água, $28,16 \pm 1,61 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$; DN + IBT, $34,09 \pm 2,60 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$; DH + água, $28,60 \pm 2,32 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ e DH + IBT, $34,56 \pm 2,21 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$) ($p>0,05$) (Figura 22A).

Entretanto, ao analisarmos o ensaio *in vitro*, observamos que o PMA, aqui utilizado como estímulo positivo para mimetizar o *burst* oxidativo gerado pela obesidade, aumentou significativamente a produção e liberação de H₂O₂ quando comparado ao controle negativo (35,43 ± 1,87 μM H₂O₂ e 27,35 ± 0,66 μM H₂O₂, respectivamente).

Ainda, o tratamento *in vitro* com IBT não alterou a liberação basal de H₂O₂, independente da concentração utilizada (IBT 0,06 mg/mL, 26,09 ± 0,53 μM H₂O₂; IBT 0,6 mg/mL, 26,11 ± 0,40 μM H₂O₂; Controle negativo: 27,35 ± 0,66 μM H₂O₂) ($p > 0,05$).

Vale destacar que na presença do estímulo positivo (PMA), os macrófagos tratados *in vitro* com IBT em ambas as concentrações apresentaram liberação de H₂O₂ menor (IBT 0,06 + PMA, 28,14 ± 0,72 μM H₂O₂ e IBT 0,6 + PMA, 26,52 ± 0,38 μM H₂O₂) que do controle positivo (35,43 ± 1,87 μM H₂O₂) (Figura 22B).

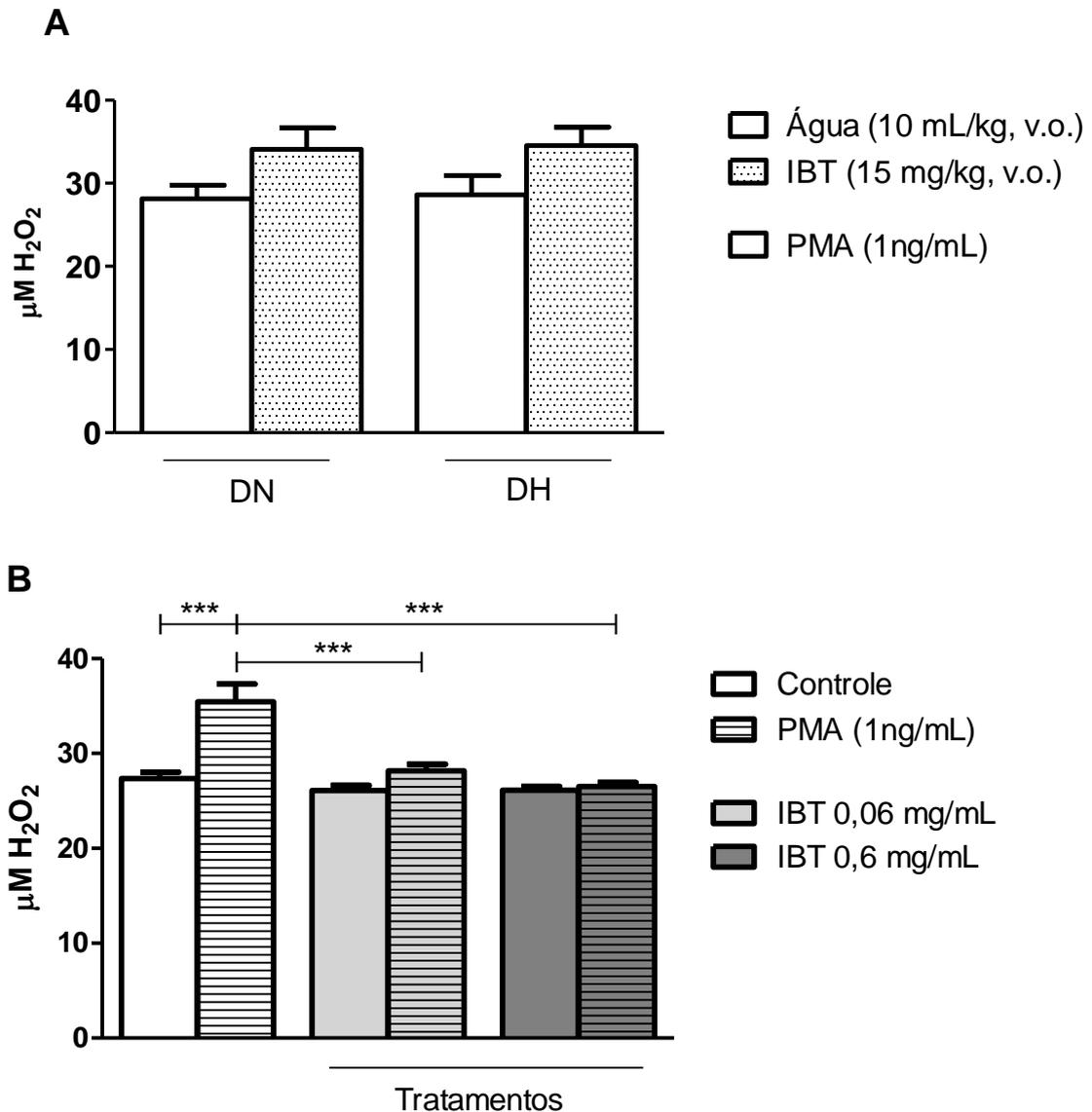


Figura 22: Efeito do tratamento com a IBT sob a produção e liberação de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais *ex vivo* (A) e *in vitro* (B). Resultados expressos como média \pm EPM, $n=6$ /grupo para *ex vivo* e $n=3$ /grupo para *in vitro*. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. LPS: Lipopolissacarídeo de *E. coli*. *** $p<0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.8.4 Espreadimento de macrófagos peritoneais

Nos ensaios *ex vivo* foi observado que os macrófagos provenientes de animais alimentados com DH e tratados com água espalharam mais ($25,00 \pm 4,96$ %) que aqueles obtidos de animais alimentados com DN (DN + água, $10,47 \pm 0,83$ % e DN + IBT, $11,37 \pm 0,69$ %). Ainda, os macrófagos oriundos de animais alimentados com DH e tratados com IBT apresentaram menor porcentagem de espreadimento ($9,79 \pm 0,96$ %).

%) que os alimentados com a mesma dieta e tratados com água ($25,00 \pm 4,96$ %), além de porcentagem semelhante ao dos animais alimentados com DN (DN + água: $10,47 \pm 0,83$ % e DN + IBT: $11,37 \pm 0,69$ %) ($p > 0,05$) (Figura 23A).

A análise da porcentagem de espraiamento por macrófagos peritoneais, revelou que o tratamento *in vitro* com IBT em ambas as concentrações (IBT 0,06 mg/dL, $6,50 \pm 0,62$ % e IBT 0,6 mg/dL, $2,33 \pm 0,49$ %) reduziu a porcentagem basal ($10,00 \pm 1,07$ %) de espraiamento celular (Figura 23A). A adição de LPS não alterou a porcentagem de espraiamento em nenhum dos grupos analisados ($p > 0,05$), como observado na figura 23B.

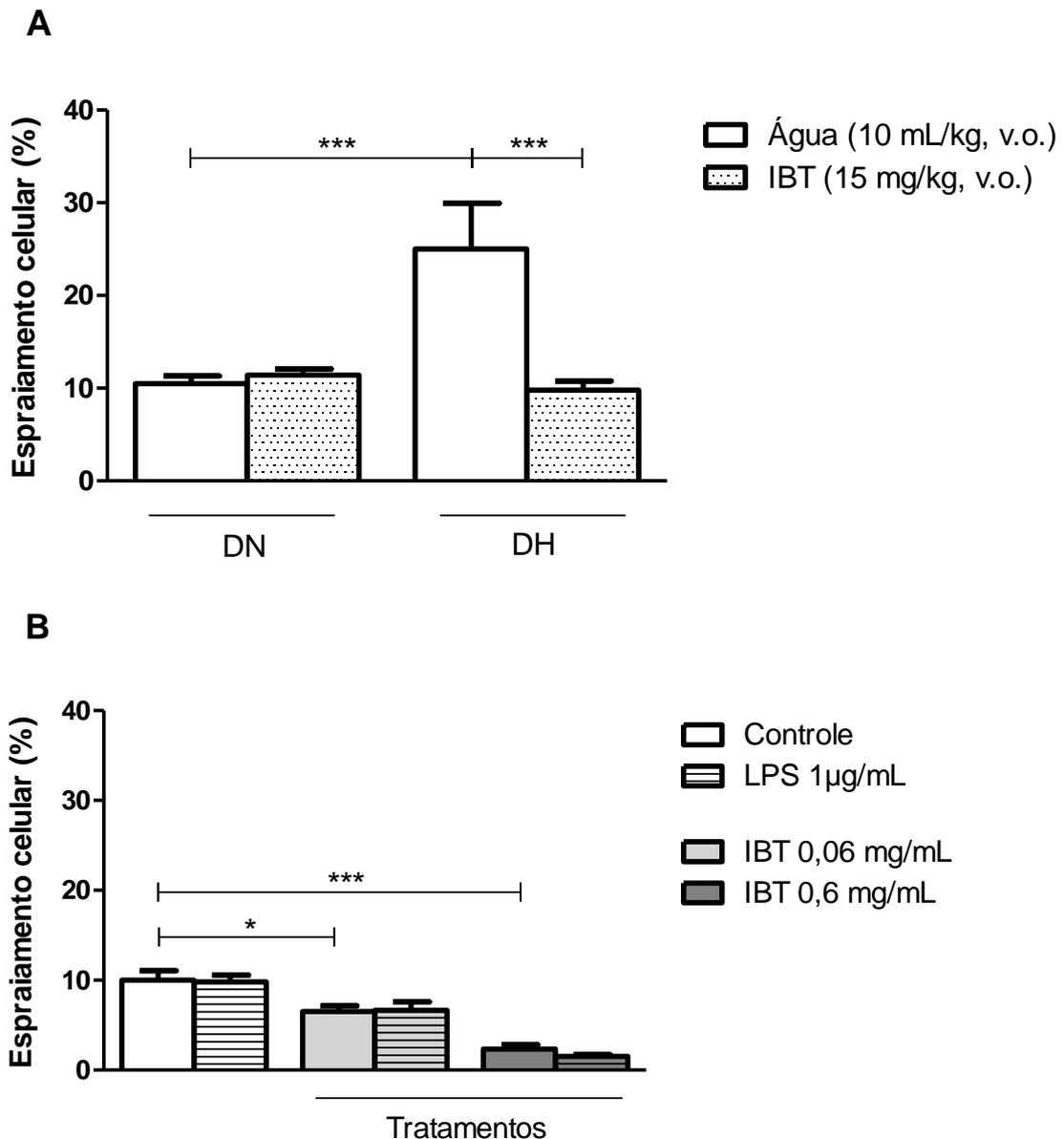


Figura 23: Efeito do tratamento com a IBT sobre o espraimento dos macrófagos peritoneais *ex vivo* (A) e *in vitro* (B). Resultados expressos como média \pm EPM, n=6/grupo para *ex vivo* e n=3/grupo para *in vitro*. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. LPS: Lipopolissacarídeo de *E. coli*. * p <0,05. *** p <0,001. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.8.5 Adesão celular

Os ensaios *ex vivo* demonstraram que, independente da dieta, o tratamento com IBT reduziu a adesão dos macrófagos peritoneais (DN + IBT, $0,28 \pm 0,02$ Abs/ 1×10^5 células e DH + IBT, $0,25 \pm 0,01$ Abs/ 1×10^5 células), quando comparados aos tratados com água (DN + água, $0,42 \pm 0,02$ Abs/ 1×10^5 células e DH + água, $0,43 \pm 0,03$ Abs/ 1×10^5 células). Ainda, a DH não provocou alteração na adesão celular dos

animais que a consumiram, com relação aos alimentados com DN ($p>0,05$), como demonstrado na figura 24A.

Nos ensaios *in vitro* tanto a adição de LPS quanto das diferentes concentrações de IBT não alteraram a adesão celular de nenhum dos grupos (Controle, $0,65 \pm 0,02$ Abs/ 1×10^5 células; LPS, $0,72 \pm 0,01$ Abs/ 1×10^5 células; IBT 0,06 mg/mL, $0,67 \pm 0,02$ Abs/ 1×10^5 células; IBT 0,06 + LPS, $0,68 \pm 0,01$ Abs/ 1×10^5 células; IBT 0,6 mg/mL, $0,66 \pm 0,01$ Abs/ 1×10^5 células; IBT 0,6 + LPS, $0,65 \pm 0,02$ Abs/ 1×10^5 células) ($p>0,05$) (Figura 24B).

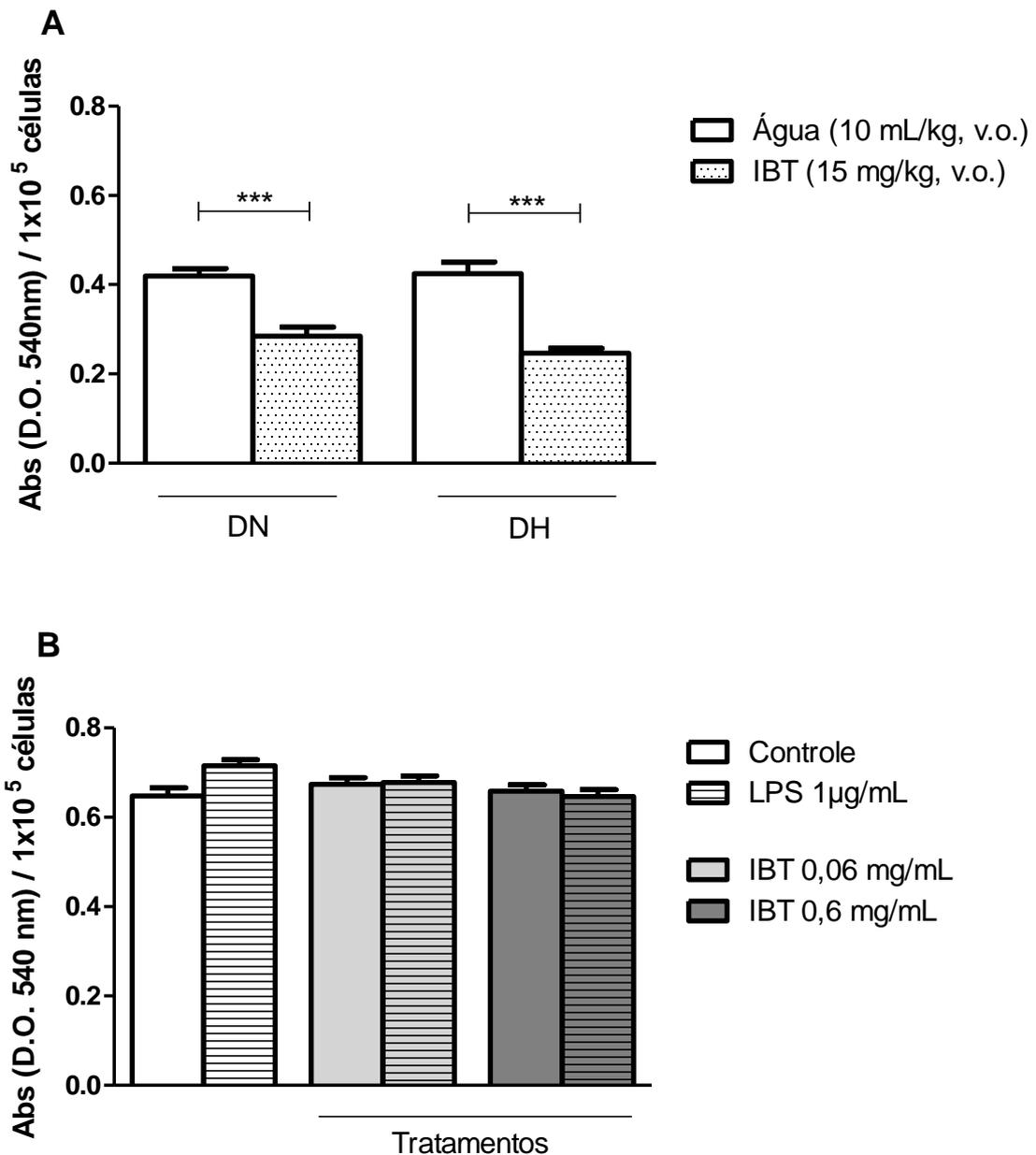


Figura 24: Efeito do tratamento com a IBT sob a adesão celular dos macrófagos peritoneais *ex vivo* (A) e *in vitro* (B). Resultados expressos como média \pm EPM, n=6/grupo para *ex vivo* e n=3/grupo para *in vitro*. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B.trimera*. LPS: Lipopolissacarídeo de *E. coli*. *** $p < 0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

5.8.6 Atividade fagocitária

Assim como no teste de adesão celular *ex vivo*, os macrófagos provenientes de animais alimentados com DH e tratados com IBT apresentaram menor atividade fagocitária ($32,67 \pm 2,33$ %) que os macrófagos de animais alimentados com DH e tratados com água ($55,00 \pm 3,79$ %). Ademais, independente do tratamento, a DH não

provocou alteração na atividade fagocitária dos animais que a consumiram (DH + água, $55,00 \pm 3,79$ % e DH + IBT, $32,67 \pm 2,33$ %), quando comparados aos alimentados com DN (DN + água, $48,00 \pm 2,31$ % e DN + IBT, $37,75 \pm 1,32$ %) ($p > 0,05$), como demonstrado na figura 25A.

Assim como no ensaio *ex vivo*, o tratamento com IBT na concentração de 0,6 mg/mL (equivalente à dose utilizada para o tratamento *in vivo*) reduziu a fagocitose dos macrófagos ($27,75 \pm 4,55$ %), com relação ao grupo controle ($49,00 \pm 2,04$ %) (Figura 25B).

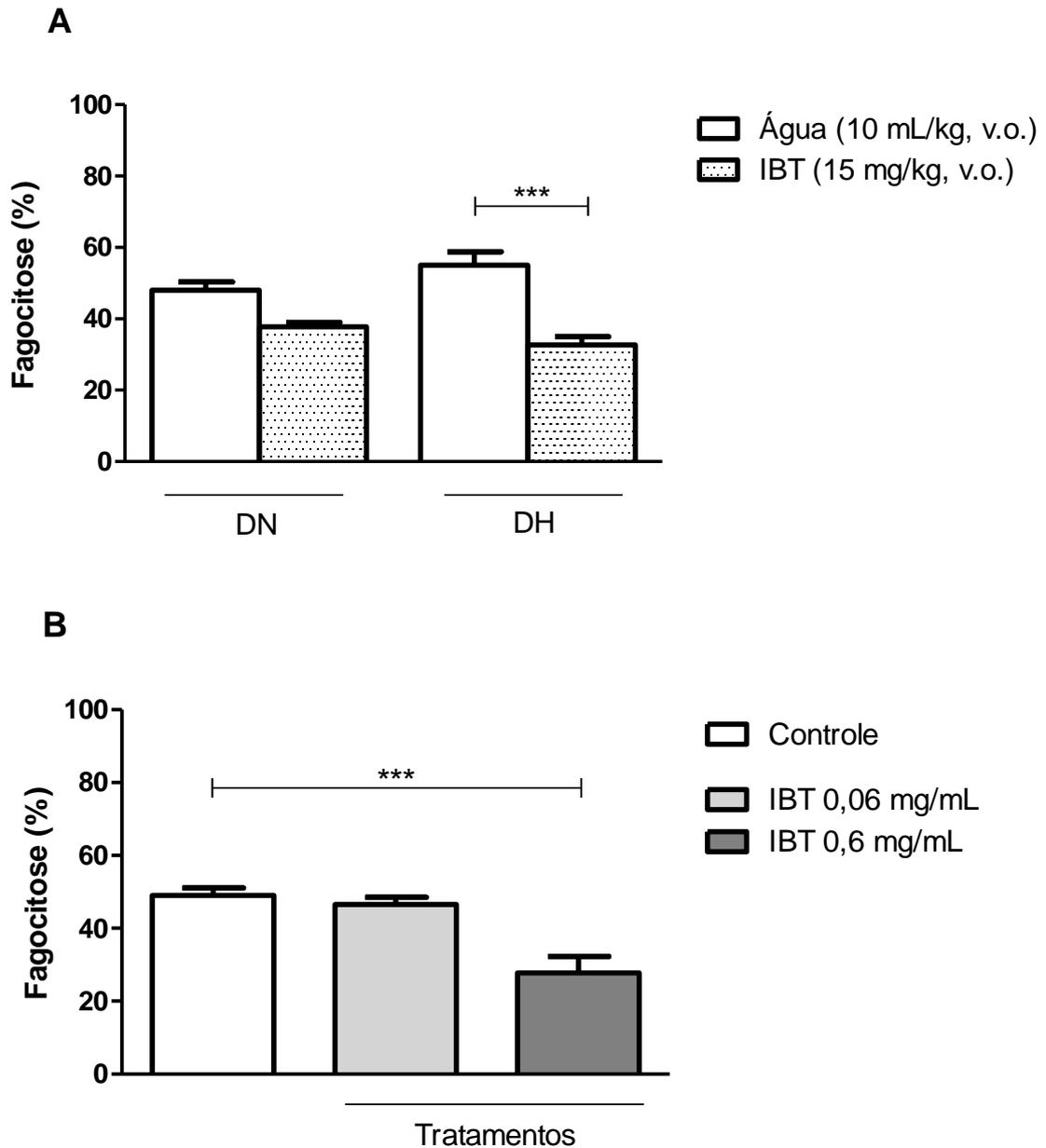


Figura 25: Efeito do tratamento com a IBT sob a atividade fagocitária dos macrófagos peritoneais *ex vivo* (A) e *in vitro* (B). Resultados expressos como média \pm EPM, $n=6$ /grupo para *ex vivo* e $n=3$ /grupo para *in vitro*. DN: dieta normolipídica. DH: dieta hiperlipídica. IBT: infusão de *B. trimera*. LPS: Lipopolissacarídeo de *E. coli*. *** $p < 0,001$. ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

O tratamento diário com a infusão de *Baccharis trimera* (IBT) preveniu a obesidade, a síndrome metabólica, a esteatose hepática e reduziu a atividade das funções dos macrófagos, minimizando a inflamação, induzidas pela dieta hiperlipídica no modelo experimental de obesidade utilizado.

O perfil fitoquímico da amostra de IBT, analisado por CLAE-DAD-EM/EM e no cromatograma de UV de 270-300nm (Figura 7), revelou a presença de derivados do ácido cafeico (picos 1, 2, 3, 8, 9, 10 e 13), derivados de flavonoides (picos 4, 5, 6, 7 e 15) e diterpenoides do tipo clerodano (picos 11 e 12).

O pico **3**, identificado como ácido 5-feruloilquínico (CLIFFORD et al., 2003), já foi relatado para espécie de *B. trimera* em levantamento do perfil químico realizado por De Araujo e col. (2017).

Os picos **4**, **5** e **6** (vicenina 1, isoschaftosídeo e schaftosídeo, respectivamente) apresentaram uma fragmentação característica para flavonoides C-glicosilados (CUYCKENS, F.; MAGDA., 2004; ZHOU et al., 2012). Os picos **4** e **5** exibiram um fragmento indicativo de uma pentose na posição 6, o que não foi observado para o composto **6**. Zhou e col. (2012) determinaram a ordem de retenção e perfil de fragmentação dos flavonoides C-glicosídeos vicenina 1, isoschaftosídeo, schaftosídeo, entre outros. Nossos dados estão em acordo com os observados por esses autores, onde a vicenina 1 tem o menor tempo de retenção e a presença do mesmo fragmento por nós observado, seguido pelo isoschaftosídeo e finalmente o schaftosídeo, que não apresenta a fragmentação relativa a pentose na posição 6. O isoschaftosídeo já foi relato em *Baccharis* (AKAIKE et al., 2003).

Os picos **11** (C₂₀H₂₆O₅) e **12** (C₂₀H₂₈O₅) foram identificados putativamente como diterpenoides do tipo clerodano. A busca na literatura demonstrou a ocorrência desta classe em *Baccharis trimera* (HERZ et al., 1977; TORRES et al., 2000; GARCIA et al., 2014). Apesar desta ocorrência prévia, a falta de estudos de fragmentação não permitiu a determinação estrutural dos compostos.

O pico **13** (putativo hexosil-coumaroil-triterpeno) apresentou um UV compatível com o ácido cafeico e fragmentos relativos a perda de um fenilpropanoide. Os dados de peso molecular, tempo de retenção e fragmentos nos permitem determinar putativamente este composto como um triterpeno ligado a uma hexose e um ácido cafeico.

O composto identificado no pico **15** (dihidroxi-trimetoxiflavona) já foi relatado para a espécie de *B. trimera* (DE ARAUJO et al., 2017) e seus fragmentos estão de acordo com os dados da literatura para esse composto (EL SAYED et al., 2016; DE ARAUJO et al., 2017).

Além desses, foram identificados em nosso trabalho os compostos ácido quínico (pico **1**), ácido cafeoilquínico, também chamado ácido clorogênico (pico **2**), rutina (pico **7**), ácido 3,4-dicafeoilquínico (pico **8**), ácido 3,5- dicafeoilquínico (pico **9**) e ácido 4,5- dicafeoilquínico (pico **10**), por comparação com padrões autênticos.

Esses achados corroboram os dados da literatura para a *B. trimera*, visto que os principais compostos identificados nos extratos de diferentes polaridades incluem: derivados do ácido quínico como, ácido 5-O-cafeoilquínico; ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-dicafeoilquínico e ácido tricafeoilquínico (ABOY et al., 2012), além de diterpenoides do tipo clerodanos, sesquiterpenos, saponinas, taninos, polifenóis e flavonóides (SIMÕES-PIRES et al., 2005b; TORRES et al., 2000). Os flavonóides relatados até agora foram apigenina, 7,4'-di-O-metilapigenina, cirsimaritina, eupatorina, genkwanina, hispidulina, isoquercetina, luteolina, nepetina, quercetina, 3-O-metilquercetina, 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona e rutina (SIMÕES-PIRES et al., 2005b).

Este foi o primeiro estudo, descrito até o momento, que identificou a presença de vicenina 1, isochaftosídeo e schaftosídeo na espécie *B. trimera*.

Em nosso trabalho, oferecemos uma dieta hiperlipídica com 57% de energia na forma de gordura, durante oito semanas. Após esse período, constatamos que a dieta hiperlipídica (DH) foi eficaz no desenvolvimento de obesidade, síndrome metabólica e esteatose hepática intensa, em relação aos animais controle.

Embora exista diferença na composição das rações nos trabalhos descritos na literatura, podendo variar de 40% (NAGATA et al., 2008) a 70% de energia na forma de lipídeos (SOHET et al., 2009), ambos os estudos mostraram aumento do peso final e da adiposidade epididimal dos animais alimentados com tais dietas hiperlipídicas.

O desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade, como a hiperglicemia e a intolerância à glicose foram observadas a partir da 6ª semana de indução da obesidade em modelos experimentais alimentados com DH contendo 60% de energia na forma de gordura (SWEAZEA; LEKIC; WALKER, 2010), bem como síndrome metabólica, a partir da 8ª semana, utilizando DH com 40% de energia na forma de gordura (BOCCO et al., 2016). Ainda, Hoffler e col. (2009) demonstraram

que o consumo de DH com cerca de 60% de energia sob a forma de gordura por longo período (30 semanas) gerou aumento do peso corporal, dos níveis séricos de colesterol e insulina, esteatose hepática, lesões renais e diabetes tipo II em camundongos.

Vários modelos para indução de distúrbios relacionados à obesidade utilizaram a modificação genética como ferramenta metodológica (BULTMAN; MICHAUD; WOYCHIK, 1992; NAGGERT et al., 1995). Estudos mostraram que mutações no gene para o receptor de leptina (*db/db*) (TARTAGLIA et al., 1995) e mutações no gene responsável pela produção de leptina (*ob/ob*) (ZHANG et al., 1994) ocasionaram obesidade e diabetes em camundongos. Entretanto, deficiências genéticas relacionadas aos modelos de obesidade em roedores têm baixa prevalência em indivíduos com obesidade por causas genéticas (RANKINEN et al., 2006).

Ademais, como a dieta hiperlipídica pode induzir obesidade e distúrbios metabólicos em roedores semelhantes à síndrome metabólica em humanos, o modelo de obesidade induzida por dieta é preferível em detrimento dos modelos com alterações genéticas, visto que é necessário que o modelo animal apresente, não apenas o fenótipo, mas também patogênese semelhante à doença humana (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007). Outrossim, as dietas ricas em gordura aliadas à inatividade física, utilizadas nesses modelos, coincidem com os principais fatores de risco para a obesidade em humanos (OMS, 2017b).

Em nosso estudo utilizamos camundongos *Swiss* (uma espécie não isogênica) a fim de mimetizar a variabilidade genética de uma população, e embora seja mais frequente a utilização de animais de linhagem isogênica, como o C57/BL6, em estudos de indução da obesidade, diversas pesquisas têm obtido êxito nesse modelo experimental utilizando camundongos *Swiss* (SOUZA et al., 2012; WHITE et al., 2013; SANTOS et al., 2016; PINHEIRO et al., 2017; SINGH et al., 2017).

Durante as oito semanas de indução da obesidade, nossos animais foram tratados diariamente com IBT por via oral, em dose equivalente à recomendada para um indivíduo adulto de 70 kg.

A escolha da *Baccharis trimera* baseou-se no fato dessa planta ser utilizada pela população como emagrecedora (CERCATO et al., 2015), anti-inflamatória e hipoglicemiante (NUNES et al., 2003), ações essas que auxiliam no combate à obesidade e suas comorbidades. Ressalta-se que tanto a dose quanto o modo de preparo (infusão das partes aéreas) estão de acordo com o preconizado pela ANVISA,

na RDC 10/2010, para o consumo de *B. trimera*. Na literatura, até o presente momento, este é o primeiro estudo que avaliou os efeitos da *B. trimera* na obesidade, suas comorbidades e na função celular de macrófagos em modelo experimental sob essas condições após dieta hiperlipídica.

O tratamento diário com IBT reduziu a ingestão alimentar, o ganho de peso, o acúmulo de tecido adiposo e a área dos adipócitos dos animais alimentados com DH, quando comparados aos tratados com água. Ainda, os animais tratados com IBT e alimentados com DN também reduziram a ingestão alimentar, demonstrando efeito sacietogênico da IBT.

Corroborando nossos resultados, Nascimento e col. (2017) demonstraram o efeito antiadipogênico do extrato aquoso da *B. trimera* em dose equivalente a 2600 mg/kg, por reduzir a acumulação lipídica e adipogênese em pré-adipócitos 3T3-L1, atenuando os níveis de fatores transcricionais de adipogênese, como o PPAR- γ . Utilizando concentração equivalente a 260 mg/kg, Souza e col. (2011) não observaram inibição da lipase pancreática, e sim das α e β -glicosidades pela infusão de *B. trimera*. As α -glicosidades são enzimas que catalisam o passo final do processo digestivo de carboidratos e, uma vez inibidas, retardam o processo de absorção da glicose. Assim, além de reduzir a hiperglicemia, o alimento leva mais tempo para concluir a digestão, diminuindo a necessidade de novas refeições (WATANABE et al., 1997) e justificando o efeito sacietogênico evidenciado pelo tratamento com IBT em nosso trabalho.

Embora as doses de *B. trimera* utilizadas nos trabalhos supra citados sejam maiores do que a que utilizamos (15 mg/kg), não é possível compará-las diretamente devido às diferenças metodológicas de extração, pois os solventes utilizados ou o tempo de extração poderiam alterar o rendimento e conseqüentemente a quantidade dos ativos que compõem o extrato final.

Considerando a relação entre os compostos identificados (Tabela 3) e os efeitos observados, destacamos que derivados do ácido cafeico possuem propriedades farmacológicas descritas como, atividade antioxidante (CHUDA et al., 1996), hepatoprotetora (BASNET et al., 1996), antibacteriana (SHOLZ; HEINRICH; HUNKLER, 1994), anti-inflamatória (GENÉ et al., 1996) e antiviral (MATSINGOU; KAPSOKEFALOU; SALIFOGLOU, 2000). Dentre os derivados do ácido cafeico identificados na amostra de IBT estão o ácido clorogênico e seus derivados: ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico (Tabela 3).

Diversos estudos têm demonstrado que o ácido cafeico e seus derivados previnem a obesidade e a síndrome metabólica em modelos experimentais de obesidade (BOCCO et al., 2016), por suprimirem enzimas lipogênicas e a acumulação lipídica hepática (LIAO et al., 2013), bem como por induzirem a oxidação de ácidos graxos pela fosforilação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e posterior redução da atividade de acetil-CoA carboxilase (ACC) (PANG; CHOI; PARK, 2008).

Em 2006, estudo realizado com ácido clorogênico demonstrou a inibição do crescimento da população de pré-adipócitos, apontando para uma atividade antiadipogênica do composto em questão (HSU et al., 2006). Cho e col. (2010) estudaram os efeitos da suplementação de ácido cafeico (0,02%) ou ácido clorogênico (0,02%) em DH oferecida a camundongos, por oito semanas. Ao final do período experimental, tanto os animais tratados com ácido cafeico quanto com ácido clorogênico apresentaram menor ganho de peso, adiposidade, menores níveis séricos de colesterol total, triglicérides, ácidos graxos livres, leptina e insulina. Ambos os tratamentos também reduziram a atividade das enzimas ácido graxo sintase (FAS), HMG-CoA redutase e acil-CoA colesterol transferase (ACAT), inibindo assim a síntese de ácidos graxos e colesterol e estimulando a oxidação de ácidos graxos no fígado. Ainda, foi demonstrado nesse trabalho que o ácido clorogênico manteve a adiponectina sérica em níveis semelhantes à dos animais alimentados com dieta controle, diferentemente do ácido cafeico, ressaltando que o ácido clorogênico suprimiu o ganho de peso e o acúmulo de gordura visceral mais eficientemente que o ácido cafeico.

Em nosso modelo experimental, o tratamento diário com IBT também reduziu a hiperglicemia, o colesterol total, o colesterol LDL e o índice aterogênico, bem como impediu o desenvolvimento de resistência à insulina e de esteatose hepática nos animais alimentados com DH, com relação aos controles, tratados com água.

Em consonância com esses achados, Oliveira e col. (2005) observaram efeito hipoglicemiante da fração aquosa de *B. trimera*, administrada duas vezes ao dia por sete dias, em camundongos fêmeas diabéticas. Em 2012, Souza e col. observaram efeito antiobesogênico e hipocolesterolêmico em ratos tratados com extrato metanólico de *B. trimera* em diferentes concentrações, porém os animais tratados com a dose mais alta (714 mg/kg) apresentaram redução nos níveis séricos de HDL e início de esteatose.

Ao correlacionarmos os efeitos citados aos compostos identificados em nossa amostra de IBT, destacamos a presença de dois diterpenos clerodanos, bem como do ácido clorogênico e dos derivados de flavonoides (Tabela 3).

Os diterpenos constituem a classe de compostos mais abundante em espécies do gênero *Baccharis*. Em nossa amostra de IBT, identificamos putativamente dois diterpenos clerodanos (picos **11** e **12**), porém, devido à falta de estudos de fragmentação, não foi possível determinar a fórmula estrutural desses compostos, apesar de existir citação na literatura de ocorrência dessa classe na espécie *B. trimera* (HERZ et al., 1977; ZDERO et al., 1989; TORRES et al., 2000; GARCIA et al., 2014). Embora sejam raros os trabalhos associando essa classe de compostos aos efeitos biológicos aqui estudados, um diterpeno clerodano, pertencente a outro gênero de plantas (*Polyalthia longifolia*), atenuou o ganho de peso e o acúmulo de gordura epididimal, melhorou a tolerância à glicose, reduziu o colesterol total, inibiu a hipertrofia dos adipócitos e reduziu a esteatose hepática provocada pela DH em camundongos C57/BL6, quando comparados aos animais controle (BEG et al., 2015). Outro estudo recente demonstrou que o Borapetosídeo E, um diterpeno clerodano extraído de *Tinospora crispa*, melhorou significativamente a hiperglicemia, resistência à insulina, esteatose hepática e a hiperlipidemia em camundongos obesos induzidos por DH, e segundo os autores os efeitos foram comparáveis ou melhores aos da droga metformina, um hipoglicemiante comumente utilizado por diabéticos (XU et al., 2017).

Com relação ao ácido clorogênico, ainda na década de 90, Nardini e col. (1995) sugeriram que o mesmo diminui o risco de doença cardiovascular por reduzir a oxidação do colesterol LDL e do colesterol total. Pouco depois, Hemmerle e col. (1997) relataram que o ácido clorogênico inibiu a resposta da enzima glicose-6-fosfatase hepática, que atua no passo final da gliconeogênese e da glicogenólise, originando a glicose livre, que é então exportada para a corrente sanguínea. Posteriormente, estudos *in vivo* em modelos animais também demonstraram que o ácido clorogênico é capaz de reduzir a glicemia por essa via (HERLING et al., 1999; BASSOLI et al., 2008).

Por sua vez, os flavonoides estão entre os metabólitos secundários encontrados em maior quantidade na *Baccharis trimera*, sugerindo que esses compostos sejam responsáveis por atividades hepatoprotetora (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987), anti-inflamatória e analgésica (GENÉ et al., 1996), além de efeitos benéficos no tratamento contra obesidade e distúrbios metabólicos (CHUANG;

MCINTOSH, 2011). Ainda, a IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SPOSITTO, 2007) relata que plantas com alto teor de flavonoides podem ser utilizadas na prevenção e tratamento de hiperlipidemia e aterosclerose. Em concordância, meta-análises de estudos de coorte e ensaios clínicos mostraram que o consumo de chocolate, chá e outros alimentos ricos em flavonoides tende a reduzir o risco de doenças cardiovasculares (HOOPER et al., 2012) e diabetes *mellitus* tipo II (YANG et al., 2014).

Dentre os derivados de flavonoides identificados em nossa amostra de IBT estão o isoschaftosídeo, o schaftosídeo e a rutina (picos **5**, **6** e **7**, respectivamente).

Corroborando a ação em questão, Li e col. (2009) demonstraram que as flavonas C-glicosiladas, como o isoschaftosídeo (WOHLMUTH et al., 2010), apresentaram efeito inibitório de α -glicosidases ainda maiores que da acarbose, um medicamento hipoglicemiante utilizado para retardar a digestão e absorção de carboidratos, sugerindo que o isoschaftosídeo possa beneficiar a saúde de indivíduos diagnosticados com diabetes. Dessa forma, o isoschaftosídeo também pode contribuir com o efeito sacietogênico já citado aqui, observado nos animais tratados com IBT.

Ainda, rutina e isoschaftosídeo, presentes no extrato aquoso das folhas de *Dendrobium officinale* apresentaram moderado efeito inibitório da lipase pancreática com valores IC50 em torno de 57 e 64 μ M, respectivamente. Tanto a rutina quanto o isoschaftosídeo formaram a interação π - π (com o anel de benzeno de Phe-216) e uma ligação de hidrogênio com a lipase. Essas interações não-covalentes podem alterar a conformação molecular da enzima, influenciando na atividade catalítica da mesma. Assim, os autores concluíram que rutina e isoschaftosídeo podem atuar como inibidores da lipase pancreática devido à alteração conformacional gerada na proteína após sua ligação (TAO et al., 2015).

Outro estudo, realizado com os extratos aquoso e etanólico de *Viola mandshurica* (ambos contendo schaftosídeo) em camundongos C57/BL6 alimentados com DH por sete semanas, demonstrou que o tratamento foi capaz de prevenir a hiperglicemia, a hipertrigliceridemia, a hipercolesterolemia, a elevação do ganho de peso, da área dos adipócitos e do acúmulo lipídico hepático, além de aumentar o nível sérico de adiponectina e a expressão de RNAm no tecido adiposo epididimal e reduzir a expressão de RNAm de vários genes lipogênicos, como C/EBP α , C/EBP β , SREBP1c, e leptina, enquanto que aumentaram a expressão de mRNA da proteína desacopladora 2 (UCP2) e da AMPK (proteína quinase ativada por AMP). Ademais, o

tratamento com ambos os extratos estimulou a ativação e expressão de AMPK e inibiu a ativação de ACC (acetil-CoA carboxilase) no fígado, com uma diminuição concomitante no acúmulo de gordura no fígado desses animais, quando comparados aos animais não tratados com os extratos, sugerindo que os extratos atuem suprimindo a lipogênese e promovendo a oxidação de ácidos graxos por ativação da AMPK no fígado e no tecido adiposo. Assim, os autores sugerem que o schaftosídeo é parcialmente responsável pelos efeitos antiobesidade observados no modelo experimental de obesidade induzida por DH utilizado (SUNG et al., 2017).

Há na literatura diversos relatos sobre os efeitos benéficos da rutina para a saúde humana, inclusive na prevenção da obesidade. Um estudo realizado por Choi e col. (2006) mostrou que em testes *in vitro*, a rutina suprimiu a diferenciação celular de pré-adipócitos 3T3-L1, de maneira dose-dependente. Na fase de indução da adipogênese, a rutina suprimiu a atividade do glicerol-3-fosfato desidrogenase e a atividade de fatores adipogênicos como o PPAR- γ em células 3T3-L1. Já *in vivo*, a suplementação de rutina durante 4 semanas em camundongos C57BL/6 alimentados com DH resultou em redução do ganho de peso, em comparação com os animais não tratados com rutina e alimentados com DH. Ademais, uma fração etanólica proveniente do extrato bruto das folhas de *Morinda citrifolia*, contendo flavonoides como quercetina e rutina, foi administrada por via oral durante 12 semanas à ratos Sprague-Dawley alimentado com DH. Os resultados mostraram que o tratamento reduziu o ganho de peso, adiposidade visceral, colesterol total, colesterol LDL, triglicérides, insulina e leptina séricos, com relação aos animais não tratados, que receberam a mesma dieta (JAMBOCUS et al., 2016).

Seguindo a mesma linha, Hsu e col. (2009) observaram que ratos *Wistar* obesos apresentaram redução no peso corporal e tecido adiposo, com melhora nos perfis lipídicos séricos, insulina, leptina, triglicérides, colesterol e perfis oxidativos após 8 semanas de intervenção com rutina, confirmando o efeito protetor desse flavonoide na dislipidemia, esteatose hepática e estresse oxidativo. Wang e col. (2017) também demonstraram o efeito antiobesogênico da rutina ao suplementarem a DH dos camundongos, por 28 dias. Ao final do período experimental, observaram menor peso corporal, além de níveis reduzidos de MCP-1 e TNF- α séricos, quando comparados aos animais cuja DH não foi suplementada com rutina.

Após as oito semanas de indução da obesidade e concomitante tratamento, observamos que a DH oferecida a nossos animais provocou intensa infiltração de

macrófagos no tecido adiposo epididimal, com subsequente formação de estruturas tipo coroa ao redor dos adipócitos, quando comparados aos animais controle. Vale destacar que nos animais alimentados com DH e tratados com IBT, esse fenômeno não foi observado.

Corroborando esses achados, Defuria e col. (2009) observaram o aumento da área dos adipócitos, da expressão de marcadores para macrófagos no tecido adiposo e da formação de estruturas tipo coroa por macrófagos, em camundongos C57/BL6 alimentados com DH, em relação aos controles, além do aumento na expressão de TNF- α e MCP-1. Em outro estudo utilizando modelo experimental de obesidade, pesquisadores demonstraram que o aumento na expressão de MCP-1 induziu elevação na infiltração de macrófagos no tecido adiposo, além de aumento de triglicérides no fígado e resistência à insulina. Ainda, os autores constataram que a deleção do gene para MCP-1 reduziu o acúmulo de macrófagos no tecido adiposo, a resistência à insulina e a esteatose hepática associada à obesidade (KANDA et al., 2006).

Com o ganho de peso e conseqüente hipertrofia dos adipócitos, os vasos sanguíneos do tecido adiposo são comprimidos, impedindo o suprimento adequado de oxigênio no tecido e provocando assim uma hipóxia local, levando os adipócitos à morte (WOOD et al., 2009) e induzindo a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, com a formação de estruturas tipo coroa de macrófagos em torno dos adipócitos mortos (HEILBRONN; CAMPBELL, 2008). O acúmulo de macrófagos no tecido adiposo é o principal responsável pelo aumento de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 levando à condição de inflamação subclínica associada ao excesso de gordura corporal (BOULOUMIÉ et al., 2005). Ainda, com o aumento da quantidade e do tamanho do tecido adiposo, ocorre maior liberação de fatores inflamatórios ou quimiotáticos para macrófagos, como leptina, TNF- α , IL-6 e MCP-1 (PEAKE et al., 2006).

Nesse sentido, avaliamos o efeito do tratamento com IBT sobre a função celular de macrófagos oriundos de animais alimentados com DH, bem como do tratamento *in vitro* com IBT, em macrófagos provenientes de animais não tratados e alimentados com dieta padrão (Nuvital®).

Em nosso modelo experimental *ex vivo* (macrófagos oriundos de camundongos alimentados com DN ou DH e tratados com IBT ou água) inferimos que a DH desencadeou inflamação subclínica nos animais tratados com água, evidenciada pela

infiltração de macrófagos no tecido adiposo, com formação de estruturas tipo coroa ao redor dos adipócitos, produção e liberação de NO_2^- (μM), bem como pelo espriamento dos macrófagos peritoneais, quando comparados aos animais alimentados com DN. Entretanto, o tratamento diário com IBT foi eficaz na prevenção da inflamação subclínica em animais alimentados com DH, visto que os macrófagos desses animais mantiveram a produção e liberação de NO_2^- (μM) e de H_2O_2 (μM) e o espriamento semelhantes aos dos animais controle (DN + água), além de reduzir a adesão e a atividade fagocitária dessas células. Ainda, no modelo experimental *in vitro* (macrófagos peritoneais de animais não alimentados com as dietas DN ou DH e sim, com dieta padrão (Nuvital[®]), tratados ou não com IBT e estimulados ou não com LPS) o tratamento com IBT reduziu a produção e liberação, pós estímulo inflamatório, das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio supracitadas, bem como reduziu o espriamento e a atividade fagocitária dos macrófagos peritoneais.

Já foi descrito nesse trabalho que dietas hiperlipídicas induzem alterações na composição da microbiota intestinal que favorecem a transferência de LPS endógeno do lúmen para a corrente sanguínea, originando uma endotoxemia metabólica (CANI et al., 2007). As evidências sugerem que o LPS está direta e indiretamente envolvido nas alterações histológicas e biológicas que ocorrem no tecido adiposo durante a obesidade, como na indução da morte dos adipócitos, na formação de estruturas tipo coroa e na transição de macrófagos com o fenótipo M2 para o fenótipo M1, como revisado por Hersoug, Moller e Loft (2018).

A ligação do LPS ao TLR-4 desencadeia uma cascata inflamatória ativada pela via de sinalização do NF- κ B, promovendo a transcrição de diversos genes e enzimas pró-inflamatórios, como a iNOS (GUHA; MACKMAN, 2001). Park, Chung e Kim (2007) demonstraram que a iNOS, envolvida na produção de espécies reativas de nitrogênio, como o NO, estão aumentadas em indivíduos obesos, o que também poderia explicar o estresse oxidativo aumentado na obesidade. Além do estímulo via LPS, as citocinas pró-inflamatórias de macrófagos M1 suprarregulam genes como da iNOS (CHARLES et al., 2000), assim os macrófagos M1 produzem NO em altas concentrações (MANTOVANI et al., 2004), além de espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio, contribuindo com a manutenção da resposta inflamatória (GHOSN et al., 2010).

Ratificando a ação em questão, diversos trabalhos já demonstraram o efeito antioxidante da *Baccharis trimera*. Em 2009, Rodrigues e col. observaram esse efeito

in vitro ao utilizarem o extrato aquoso de *B. trimera*. Pouco depois, Oliveira e col. (2012) comprovaram esse efeito *in vitro* e ainda demonstraram que diversos extratos de *B. trimera*, incluindo o aquoso, reduziram significativamente os níveis de NO presentes no exsudato peritoneal de ratas, após injeção intraperitoneal de carragenina. O extrato hidroalcolico de *B. trimera* também apresentou atividade antioxidante dose-dependente *in vitro*, além ter reduzido os níveis de ERO em ensaio *in vivo* utilizando nematódeos como modelo experimental. Nesse trabalho os autores sugeriram que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos presentes na *B. trimera* neutralizam diretamente a produção de ERO (PAIVA et al., 2015). Nascimento e col. (2017) descreveram uma atividade antioxidante, também dose-dependente, para duas preparações diferentes de extrato aquoso de *B. trimera* em ensaios de quelação de cobre e íons férricos e de eliminação de radicais superóxido e hidroxila. Semelhantemente, Rabelo e col. (2018) observaram efeito antioxidante dose-dependente em diferentes doses de extrato hidroetanólico de *B. trimera*, com redução nos níveis de ERO e NO em células de carcinoma de hepatócitos.

Outras espécies do gênero *Baccharis* apresentam atividade antioxidante descrita na literatura, como a *B. própolis*, cujo extrato etanólico demonstrou tal atividade *in vitro* evidenciada pela eliminação direta de ERO, bem como pela estimulação da expressão de genes antioxidantes (ZHANG et al., 2016). Nuño e col. (2012) observaram o efeito antioxidante *in vitro* de tinturas de *B. incarum*, sugerindo que o ácido clorogênico e seus derivados identificados na amostra sejam parcialmente responsáveis pelo efeito observado. Além desses, relacionados ao gênero *Baccharis*, há relatos na literatura que apontam o efeito antioxidante do ácido clorogênico e seus derivados identificados em diversos gêneros de plantas (WANGKHEIRAKPAM et al., 2018; MORI et al., 2018; KATADA et al., 2018).

Macrófagos ativado (M1) produzem ERO e citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-6), além de aumentar sua capacidade de adesão, espreadimento e fagocitose (AKIRA; MISAWA; SAITOH, 2013; BOU GHOSN et al, 2010).

Não há registros na literatura que relacionem o espreadimento, a adesão e a atividade fagocitária de macrófagos com plantas do gênero *Baccharis*. Entretanto, um estudo realizado com outro gênero de planta (*Achyrocline alata*), pertencente à mesma família da *Baccharis* (Asteraceae) e apresentando compostos semelhantes aos encontrados em nossa amostra, como o ácido clorogênico e seus derivados (ácidos 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico), demonstrou que o tratamento *in*

vitro com extrato da planta não alterou o espriamento dos macrófagos, corroborando nossos achados *ex vivo* (TOFFOLI-KADRI et al., 2014). Ainda, esses autores observaram o mesmo perfil de resposta quanto à liberação de NO_2^- e de H_2O_2 encontrados em nossos ensaios *in vitro*, reforçando a hipótese da participação do ácido clorogênico e de seus derivados sobre os efeitos observados neste trabalho.

Gao, Ma e Liu (2013) estudaram os efeitos da rutina (um dos flavonoides identificados em nossa amostra de IBT) sobre a inflamação em cultura de macrófagos RAW 264.7 e sobre a obesidade e inflamação subclínica em modelo experimental de obesidade em camundongos C57/BL6 alimentados com DH e tratados duas vezes por semana com esse flavonoide (via i.p.), durante oito semanas. Os autores observaram que o tratamento *in vitro* com rutina não afetou a viabilidade dos macrófagos, mas suprimiu a produção de $\text{TNF-}\alpha$. A análise dos níveis de RNAm dos genes envolvidos na inflamação e estresse oxidativo de macrófagos revelou que a exposição à rutina reprimiu a elevação da expressão de $\text{TNF-}\alpha$, bem como da transcrição dos genes $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 . Ainda, a produção de ERO intracelulares nos macrófagos estimulados com rutina foi aproximadamente 70% menor que a do controle. Outrossim, o trabalho demonstrou que o tratamento *in vivo* com esse flavonoide preveniu o ganho de peso, o aumento da área dos adipócitos e a formação de estruturas tipo coroa por macrófagos ao redor dos adipócitos, a esteatose hepática e a resistência à insulina, bem como reduziu os níveis de RNAm de MCP-1 e $\text{TNF-}\alpha$ no tecido adiposo, quando comparado aos animais alimentados com DH e não tratados, corroborando a maioria dos resultados obtidos em nosso trabalho.

Assim, embora não tenhamos dosado as citocinas inflamatórias, podemos sugerir que o efeito preventivo do tratamento com IBT sobre a obesidade, resistência à insulina, esteatose hepática e inflamação subclínica em nosso modelo experimental se deva à provável inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo, com conseqüente inibição da diferenciação celular de M2 para M1 (devido à redução das funções dos macrófagos), além da inibição da diferenciação de adipócitos e do estresse oxidativo. Dessa forma, sugerimos que a dosagem dessas citocinas e a análise via Western Blotting da expressão de proteínas envolvidas, como a COX-2, poderão elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos observados. Ademais, inferimos que os efeitos aqui apresentados se devem à presença dos compostos fenólicos na amostra de IBT, como o ácido clorogênico e seus derivados e de flavonoides, como a rutina.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que a ingestão diária de IBT pode ajudar a combater a obesidade e suas alterações metabólicas, pois é capaz de prevenir ganho de peso, adiposidade, resistência à insulina, esteatose hepática e inflamação subclínica, validando o uso popular do chá da planta.

Ainda, este trabalho é o primeiro a utilizar não somente o modo de preparo (infusão das partes aéreas), mas também a dose recomendada pelo órgão regulador para o uso popular de carqueja.

REFERÊNCIAS

- ABOY, A. L. et al. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1219, p. 147-53, 2012.
- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016. 4 ed. São Paulo, 2016.
- AKAIKE, S. et al. A New *ent*-Clerodane Diterpene from the Aerial Parts of *Baccharis gaudichaudiana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 51, p. 197-9, 2003.
- AKIRA, S.; MISAWA, T.; SAITOH, T. Macrophages control innate inflammation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 15, n. 3, p. 10-8, 2013.
- ANHÊ, F. F. et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, v. 64, n. 6, p. 872-83, 2015.
- AOUADI, M. et al. Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n.20, p. 8278-83, 2013.
- AVANCINI, C. A. M.; WIET, J. M.; MUNSTOCK, E. Atividade bacteriostática do decocto de *Baccharis trimera* (Less) D. C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. *Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 52, p. 230-4, 2000.
- BADKE, M.R. et al. Plantas medicinais: O saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Escola Anna Nery*; v. 15, n. 1, p. 132-139, 2011.
- BAHIA. L. R. et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public Health system: cross-sectional study. *BMC Public Health*, v. 12, p. 440, 2012.
- BAHIA. L.R.; ARAÚJO. D.V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Revista Hupe*, v 13, n.1, p. 13-17, 2014.
- BALISTRERI, C. R. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflammation*. 802078, 2010.
- BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais aromáticas e corantes naturais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 7, n. 8, p. 22-34, 1997.
- BASNET, P. et al. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.19, 1996.

BASSOLI, B. K. et al. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry & Function*, n. 26, p. 320–8, 2008.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativados dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, p. 53-5, 2009.

BAUD, V.; KARIN, M. Opinion: is NF-kappa B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n.1, p. 33-40. 2009.

BELTOWSKI, J. Apelin and visfatin: unique beneficial adipokines upregulated in obesity? *Medical Science Monitor*, v. 12, n.6, p. 112-9, 2006.

BEG, M. et al. A clerodane diterpene inhibit adipogenesis by cell cycle arrest and ameliorate obesity in C57BL/6 mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 399, p. 373-385, 2015.

BERG, A. H.; SCHERER, R. E. Adipose tissue inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, v. 96, p. 939-49, 2005.

BETONI, J. E. C. et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on staphylococcus aureus diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n.4, p. 387-90, 2006.

BIENER, A.; CAWLEY, J.; MEYERHOEFER, C. The high and rising costs of obesity to the US health care system. *Journal of General Internal Medicine*, v. 32, p. S6-S8, 2017.

BIONDO, T. M. A. et al. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, p. 368-73, 2011.

BISWAS, S.K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. v. 11, n. 10, p. 889-96, 2010.

BOCCO, B. M. et al. Combined treatment with caffeic and ferulic acid from *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae) protects against metabolic syndrome in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, n. 3, p. 1-7, 2016.

BORELLA, J. C. et al. Influência da adubação mineral (NPK) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonoides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* Less (Asteraceae) – Carqueja. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 4, p. 99-102, 2001.

BORELLA, J. C. et al. Viabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less) DC (carqueja) e isolamento de flavona. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 557-61, 2006.

BOU GOSH, E. E. et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n.6, p. 2568-73, 2010.

BOULOUMIÉ, A. et al. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 8, n. 4, p 347–54, 2005.

BOURLIER, V.; BOULOUMIE, A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes & Metabolism*, v. 35, n. 4, p. 251-60, 2009.

BOURLIER, V. et al. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*. v. 117, p. 806-15, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. VIGITEL. Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, p. 162, 2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, p. 156, 2012.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 9 de março de 2010.

BRAY, G. A.; et al. Overweight and obesity the pathogenesis of cardiometabolic risk. *Clinical Cornerstone*, v. 9, n. 4, p. 30-40, 2009.

BUETTNER, R., SCHOLMERICH, J. BOLLHEIMER, L. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity*. v. 15 p. 798–808, 2007.

BULLÓ, M. et al. Systemic Inflammation, Adipose Tissue Tumor Necrosis Factor, and Leptin Expression. *Obesity*, v. 11, n. 4, 2003.

BULLÓ, M. et al. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutrition*. v. 10, n. 10, p. 1164-72, 2007.

BULTMAN, S. J., MICHAUD, E. J., WOYCHIK, R. P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* v. 71 p.1195-204, 1992.

CAESAR, R. et al. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metabolism*, v. 22, n. 4, p. 658-68, 2015.

CANCELLO, R.; CLEMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 113, n. 10, p. 1141-7, 2006.

CANI, P. D. et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, v. 50, p. 2374-2383, 2007.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. *Vascular Pharmacology*, v. 57, n. 2–4, p. 91-7, 2012.

CARREIRA, R. C. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria de Meio Ambiente de São Paulo-SP, 2007.

CERCATO, L. M. et al. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 176, n. 286-296, 2015.

CHARLES, P. J. et al. Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo controlled trials. *Arthritis Rheumatology*, v. 43, p. 2382-90, 2000.

CHICOUREL, E. L. et al. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostos medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 6, n. 4, 2006.

CHO, A.S. et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 937-43, 2010.

CHOI, I. et al. Anti-adipogenic activity of rutin in 3T3-L1 cells and mice fed with high-fat diet. *Biofactors*, v.26, n.4, p.273-81, 2006.

CHUDA, Y. et al.. Structural identification of two antioxidant quinic acid derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 44, p. 2037–9, 1996.

CHUANG, C. C.; MCINTOSH, M. K. Potential Mechanisms by Which Polyphenol-Rich Grapes Prevent Obesity- Mediated Inflammation and Metabolic Diseases. *The Annual Review of Nutrition*, v. 31, p. 155-76, 2011.

CHUNG, S. et al. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology*, v. 147, n.11, p. 5340-51, 2006.

CHUNG, W. K. An overview of monogenic and syndromic obesities in humans. *Pediatric Blood & Cancer*, v 58, p. 122-8, 2012.

CINTI, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *The Journal of Lipid Research*, v. 46n. 11, p. 2347-55, 2005.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MS in identification of chlorogenic acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51, n.10, p. 2900-11, 2003.

COELHO, M. et al. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of Medical Science*, v. 9, n.2, p. 191-200, 2013.

CONDE, B. E. et al. Estudo crítico sobre utilização de fitoterápicos por praticantes de exercício físico em academias de musculação. *Perspectivas*. online: *biologia & saúde*, Campos dos Goytacazes, v. 16, n. 5, p. P33-47, 2015.

CORREA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, v. 2, 1931.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, v. 1-6, 1984.

COSTA ROSA, L. F. B. P.; SAFI, D. A.; CURI, R. Effect of thioglycollate and BCG stimuli on glucose and glutamine metabolism in rat macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 56, 1994.

COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, v. 500, p. 585–8, 2013.

COUSIN, B. et al. Occurrence of Brown adipocytes in rat White adipose tissue: molecular and morphological characterization. *Journal of Cell Science*, v. 103, p. 931-42, 1992.

CRUZ-MACHADO, S. S. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF-KB. *Revista da Biologia*, v. 4, 2010.

CUNHA, C. A. et al. Green tea extract supplementation induces the lipolytic pathway, attenuates obesity, and reduces low-grade inflammation in mice fed a high-fat diet. *Mediators of Inflammation*, ID. 635470, 2013.

CUYCKENS, F.; MAGDA, C. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass spectrometry*, v. 39, n.1, p. 1-15, 2004.

DE ARAUJO, G. R. et al. Baccharis trimera inhibits reactive oxygen species production through PKC and down-regulation p47 phox phosphorylation of NADPH oxidase in SK Hep-1 cells. *Experimental Biology and Medicine*, v. 242, n.3, p.333-43, 2017.

DEFURIA, J. et al. Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *The Journal of Nutrition*, v.139, p.1510–16, 2009.

DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Interaction Between Obesity and the Gut Microbiota: relevance in nutrition. *Annual Review of Nutrition*, Louvain, v. 31, p. 15-31, 2011.

DESPRÉS, J. P. et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 28, n.6, p. 1039-49, 2008.

DIAS, L. F. T. et al. Atividade antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n.1B, p. 309-14, 2009.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M.R. Plants popularly uses for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 60-71, 2007.

DING, C. et al. Signalling in adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, v. 108, p. 1915-92, 2012.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology*, v. 141, n. 7, p. 2407-12, 1988.

EL SAYED, A. M. et al. In vivo diabetic wound healing effect and HPLC–DAD–ESI–MS/MS profiling of the methanol extracts of eight Aloe species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 26, n. 3, p. 352-62, 2016.

ERBEN, U. et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 7, n.8, p. 4557-76, 2014.

EVERARD, A. et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 22, p. 9066-71, 2013.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 115: p. 911-9, 2005;

FEIJÓ, A. M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, n. 1, p. 50-6, 2012.

FEUERER, M. et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine*, v. 15, n.8, p. 930-9, 2009.

FRANCO, I. J. Ervas e plantas: a medicina dos simples. Imprimax: Chapecó 1995.

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, v. 22, n. 3, p. 139-147, 2014.

FRIEDMAN, J. M. A war on obesity, not the obese. *Science*, v. 299, p. 856-8, 2003.

FUGISAKA, S. et al. Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*, v. 58, n. 11, p. 2574-82, 2009.

GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. Rutin Suppresses Palmitic Acids-Triggered Inflammation in Macrophages and Blocks High Fat Diet-Induced Obesity and Fatty Liver in Mice. *Pharmaceutical Research*, 2013.

GARCIA, F. A. O. et al. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. On the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *Phytomedicine*, v. 21, p. 1021-5, 2014.

GENÉ, R. M.; MARIN, E.; ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Medica*, v. 58, p. 565-6, 1992.

GENÉ, R. M. et al. Anti-Inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents. *Planta Medica*, v. 62, p. 232-5, 1996.

GHOSHAL, S. et al. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *The Journal of Lipid Research*, v. 50, p. 90-97, 2009.

GHOSH, E. E. B. et al. Two physically, functionally and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 6, n. 107, p. 2568-73, 2010.

GIRARD, J.; LAFONTAN, M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes & Metabolism*, v. 34, n.5, p. 439-45, 2008.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, 17034, 2017.

GOTOH, K. et al. A novel anti-inflammatory role for splen-derived interleukin-10 in obesity-induced inflammation in white adipose tissue and liver. *Diabetes*, v 61, n.8, p. 1994-2003, 2012.

GRANCE, S. R. M. et al. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, p. 28-33, 2008.

GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS infusion of gene expression in human monocytes. *Cellular Signaling*, v. 13, p. 85-94, 2001.

GURNANI, M.; BIRKEN, C.; HAMILTON, J. Childhood obesity. *Pediatric Clinics of North America*, v. 62, n. 4, p. 821-40, 2015.

GWINN, M. R.; VALLYATHAN, V. Respiratory Burst: Role in Signal Transduction in Alveolar Macrophages, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, v. 9, n.1, p. 27-39, 2006.

HAGAR, J. A. et al. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*, v. 341, p. 1250-3. 2013.

HARFORD, K. A. et al. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *The Proceedings of the Nutrition Society*, v. 70, n.4, p. 408-17, 2011.

HARRIS, H. W. et al. Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing, death. *Journal of Clinical Investigation*, v. 91, p. 1028-1034, 1993.

HEILBRONN, L. K; CAMPBELL, L. V. Adipose Tissue Macrophages, Low Grade Inflammation and Insulin Resistance in Human Obesity. *Current Pharmaceutical Design*, v. 14, n. 12, p. 1225-30, 2008.

HEMMERLE, H. et al. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-translocase. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, n. 137-45, 1997.

HERLING, A. W. et al. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. *European Journal of Pharmacology* v. 386, n.1, p. 75-82, 1999.

HERMSDORFF, H. H. et al. Effect of diet on the low-grade and chronic inflammation associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinología y Nutrición* r, v. 55, n.9, p. 409-19, 2008.

HERSOUG, L. G.; MOLLER, P.; LOFT, S. Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity. *Nutrition Research Reviews*, p.11, 2018.

HERZ, W. et al. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 42, p. 3913- 7, 1977.

HILL, J.O.; WYATT, H.R.; PETERS J.C.; Energy balance and obesity. *Circulation*, v. 126, p. 126-32, 2012.

HINNEY, A.; HEBEBRAND, J. Polygenic obesity. In: Freemark M, editor. *Pediatric obesity: etiology, pathogenesis, and treatment*. New York, NY: Springer New York, p. 65-73, 2010.

HOFFLER, U. et al. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine*, v. 36, n. 2, p. 311-25, 2009.

HONG, E. G. et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*, v. 58, n.11, p. 2525-35, 2009.

HOOPER, L. et al. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 95, p. 740-51, 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. B. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, v. 259(5091), p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α -and obesity-induced insulin resistance. *Science*. v. 271, n. 5249, p. 665-8, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. *International Journal of Obesity*, v. 27, p. S53-5, 2003.

HSU, C. L. et al. Phenolic Compounds Rutin and *o*-Coumaric Acid Ameliorate Obesity Induced by High-Fat Diet in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 2, p.425-31, 2009.

HYVÖNEN, M. T.; SPALDING, K. L. Maintenance of white adipose tissue in man. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.56, p. 123-132, 2014.

ITOH, M. et al. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *International Journal of Inflammation*, 720926, 2011.

JACKSON, M. B.; OSEI, S. Y.; AHIMA, R. S. The endocrine role of adipose tissue: focus on adiponectin and resistin. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, v. 12, p. 163, 2005.

JAKOBSDOTTIR, G. et al. High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and Cholesterol in Rats, while Dietary Fibre Counteracts These Effects. *PloS One*, v. 8, n.11, e80476. 2013.

JAMBOCUS, N. G. S et al. An Investigation into the Antiobesity Effects of *Morinda citrifolia* L. Leaf Extract in High Fat Diet Induced Obese Rats Using a 1H NMR Metabolomics Approach. *Journal of Diabetes Research*. ID 2391592, 2016.

JANUÁRIO, A. H. et al. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemic-Biological Interactions*, v. 150, p. 243-51, 2004.

JÜKER, M. et al. Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. *Blood*, v. 77, n. 11, p. 2413-8, 1991.

JUNG, C. H.; KIM, M. S. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Archives of Pharmacal Research*, v. 36, p. 201-7, 2013.

KADOUH, H. C.;ACOSTA, A. M. D. Current paradigms in the etiology of obeity. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, v. 19, p. 2-11, 2017.

KAMINSKI, D. A.; RANDAL, T. D. Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunology*, v. 31, n.10, p. 384-90, 2010.

KAYAGAKI N. et al. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, v. 341, p. 1246-9, 2013.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n.6, p. 1494-505, 2006.

KATADA, S. et al. Effects of Chlorogenic Acid-Enriched and Hydroxyhydroquinone-Reduced Coffee on Postprandial Fat Oxidation and Antioxidative Capacity in Healthy Men: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *Nutrients*, v. 10, n.4, 2018.

KENNEDY, A. et al. Fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *The Journal of Nutrition*, v. 139, n.1, p. 1-4, 2009.

KONG, L. C. et al. Dietary Patterns Differently Associate with Inflammation and Gut Microbiota in Overweight and Obese Subjects. *PloS One*, v. 9, n. 10, 2014.

KOTANI, K. et al. Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, v. 18, p. 202-7, 1994.

LAUGERETTE, F. C. et al. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Stoneham, v. 22, p. 53-59, 2011.

LEAL, V. O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. *Clinica Chimica Acta*, v. 419, p. 87-94, 2013.

LEE, J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes. *Archives of Pharmacal Research*, v. 36, n.2, p. 208-22, 2013.

LEE. J. et al. Trends in socioeconomic costs of morbid besity among Korean adults, 2009-2013: Data from national health insurance service. *Obesity Research & Clinical Practice*. In Press, 2017.

LEE, M. J.; et al. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 13, n.4, p. 371-6, 2010.

LEE, M. T; WARREN, M. K. CSF-1 induced resistance to viral infection in murine macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 138, n. 9, p. 3019-22, 1987.

LENQUISTE, S. A.; et al. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows in vitro and in vivo antioxidant properties in obesity model. *Food Research International*, v. 77, n. 2, p. 162–170, 2015.

LI, H. et al. Screening and Structural Characterization of α -Glucosidase Inhibitors from Hawthorn Leaf Flavonoids Extract by Ultrafiltration LC-DAD-MSⁿ and SORI-CID FTICR

MS. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, v. 20, n. 8, p. 1496-1503, 2009.

LIAO, C. C. et al. Prevention of Diet-Induced Hyperlipidemia and Obesity by Caffeic Acid in C57BL/6 Mice Through Regulation of Hepatic Lipogenesis Gene Expression, p. 1-24, 2013.

LÍVERO, F. A. R. et al. Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2016.

LOLMEDE, K. et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. International journal of obesity and related metabolic disorders. v. 27, p. 1187, 2003.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª edição, Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2000.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. The Journal of Clinical Investigation. v. 117(1), p. 175-84, 2007.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends in Immunology. v. 25, p. 677-86, 2004.

MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: the macrophage connection. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. Medicina, v.67, p. 32-4, 2007.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. The Journal of Pathology, v. 229, n.2, p. 176-85, 2013.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annual Review of Immunology, v. 27, p. 451–83, 2009.

MATSINGOU, T. C.; KAPSOKEFALOU, M.; SALIFOGLU, A. In vitro anti-oxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. Journal of Food Science, v. 65, p. 1060-65, 2000.

MATSUZAWA, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. FEBS Lett. v. 580, p. 2917-2921, 2006.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 314, n.1, p. 1-16, 2010.

MCCARTNEY, C. R.; MARSHALL, J. C. Polycystic ovary syndrome. The New England Journal of Medicine, v. 375, p. 54–64, 2016.

McKINSEY GLOBAL INSTITUTE. Overcoming Obesity: An Initial Economic Analysis 2014. Disponível em: <<http://www.mckinsey.com/mgi.overview>>. Acesso em 15 fev. 2018.

MILLS, C. D. et al. M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology*, v. 164, p. 6166-70, 2000.

MILLS, C. D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Critical Reviews in Immunology*, v. 32, n. 6, p. 463-88, 2012.

MISIURA, K. V.; KRAVCHUN, P. P. Vaspin is a compensatory molecule in the pathogenesis of metabolic obesity-induced disorders. *International Journal of Endocrinology*, v. 13, n. 4, 2017.

MOPURI, R; ISLAM, S. Antidiabetic and anti-obesity activity of *Ficus carica*: *In vitro* experimental studies. *Diabetes and Metabolism*, v. 42, n. 4, 2017.

MORAIS, C. M. Avaliação das alterações inflamatórias e funcionais do pulmão no curso da pancreatite aguda experimental induzida por ceruleína. 71 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MORI, S. et al. Biocommunication between Plants and Pollinating Insects through Fluorescens of Pollen and Anthers. *Journal of Chemical Ecology*. PMID: 29717395, 2018.

MORRIS, S. M. J. Arginine metabolism: boundaries of our Knowledge. *J Nutr*, v. 137, p. 1602S-9S, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring The full spectrum of macrophage activation. *Reviews*, v. 8, p. 958-69, 2008.

NADEEM. S. Synergistic effect of Commiphora mukul (gum resin) and Lagenaria siceraria (fruit) extracts in high fat diet induced obese rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, p. S883-6, 2012.

NAGATA et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*, v. 58, n. 8, p. 1071-77, 2008.

NAGGERT, J. K. et al. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genetics*. v. 10 p. 135-42, 1995.

NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 19, p. 542–52, 1995.

NASCIMENTO, D. S. M. et al. *Baccharis trimera* (Less). DC exhibits an anti-adipogenic effect by inhibiting the expression. Of proteins involved in adipocyte differentiation. *Molecules*, v. 22, n.297, 2017.

NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology*, v. 3, n. 1, p.65-70, 1991.

NOGUEIRA, N. P. A. et al. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 138, p. 512-22, 2011.

NUNES, G. P. et al. Medicinal plants from herb sellers operating in downtown CampoGrande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, p. 83–92, 2003.

NUÑO, G. et al. Antioxidant/Antibacterial Activities of a Topical Phytopharmaceutical Formulation Containing a Standardized Extract of *Baccharis incarum*, an Extremophile Plant Species from Argentine Puna. *Phytotherapy Research*, v. 26, n. 11, 2012.

ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Alternative Macrophage Activation and Metabolism. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 6, p. 275-97, 2011.

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

OLIVEIRA, A. C. P. et al. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 102, p. 465-9, 2005.

OLIVEIRA, C. B. et al. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. *Molecules*, v. 17, p. 1113-23, 2012.

OLIVEIRA, J. E. P.; VENCIO, S. (org.). *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)* - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAUDE. Noncommunicable diseases. Udated June, 2017a. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en>>. Acesso em: 28 maio 2018.

_____. Obesity and overweight. Fact sheet. Updated October, 2017b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 25 maio. 2018.

O'ROURKE, R. W. et al. Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia*, v. 54, n. 6, p. 1480-90, 2011.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n.2, p. 85-97, 2011.

PÁDUA, B. C. et al. Protective effect of *Baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. *Mediators of Inflammation*, p. 1-14, 2014.

PAIVA, F. A. et al. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stress and β -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, ID 740162, 15 pages, 2015.

PANG, J.; CHOI, Y. PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 476, p. 178-85, 2008.

PARK, J., CHUNG, J., KIM, J. B. New evaluations of redox regulating system in adipose tissue of obesity. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 77, p. 11–6, 2007.

PAROUL, N. et al. Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* pers e *baccharis dracunculifolia* dc (asteraceae). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integradas do Alto Uruguai e das Missões, 2016.

PAUL, E. L. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vivo. *Inflammation*, v. 32, 2009.

PEAKE P. W. et al. Human adiponectin binds to bacterial lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 341, p. 108-15, 2006.

PEREIRA, S. S. et al. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice fed high fat diet. *Animal Science Journal*, v. 83, n. 7, p. 549–555, jul. 2012.

PETROVIC, N. et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveal a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 7153-64, 2010.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*, v. 38, n. 1–2, p. 161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods*, v. 46, n. 2, p. 211-26, 1981.

PINHEIRO, T. A. et al. Obesity and malnutrition similarly alters the renin-angiotensin system and inflammation in mice and human adipose. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2017.

PRODHOMME, H. et al. Imaging and identification of brown adipose tissue on CT scan. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. Doi: 10.1111/cpf.12373, 2016.

PUJANEK, M. et al. Pathomechanisms of the development of obesity in some endocrinopathies - an overview. *Endokrynologia Polska*, v. 64, n.2, p. 150-5, 2013.

PUSSINEN, P. J. et al. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care*, Alexandria, v. 34, n. 2, p. 392-7, 2011.

RABELO, A. C. S. et al. *Baccharis trimera* protects against ethanol induced hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 215, p. 1-13, 2018.

RABINOVITCH, M.; DESTEFANO, M. J. Macrophage spreading in vitro: I. Inducers of spreading. *Experimental Cell Research*, v. 77, n. 1-2, p. 323-34, 1973.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, v. 71, p. 635-700, 2002.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, n.11, p. 1439-52, 2006.

RAMALHO, R.; GUIMARÃES, C. Papel do tecido adiposo e dos macrófagos no estado de inflamação crônica associada à obesidade. *Acta Médica Portuguesa*, v. 21, p. 489-96, 2008.

RANKINEN, T. et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity*, v.14 p. 529-644, 2006.

RAO, K. R.; LAL, N.; GIRIDHARAN, N. V. Genetic & epigenetic approach to human obesity. *Indian Journal of Medical Research*, v. 140, p. 589-603, 2014.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing. *The Journal of Nutrition*, v. 1, p. 1939-51. 1993.

RIBEIRO, S.M.L.T. Avaliação de biomarcadores inflamatórios em mulheres adultas e idosas com sobrepeso/obesidade. 2015. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

RODRIGUES, C. R. F. et al. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, p. 97-101, 2009.

SACKS, H.; SYMONDS, M. E. Anatomical locations of human brown adipose tissue functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 62, p. 1783-90, 2013.

SALIM, S.Y.; SODERHOLM, J.D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 17, p. 362-81, 2011.

SANTHANAM, P. et al. Adiposity-related cancer and functional imaging of brown adipose tissue. *Endocrine. Practice*. v. 21, p. 1282-1290, 2015.

SANTOS, E. W. et al. High-fat diet or low-protein diet changes peritoneal macrophages function in mice. *Nutrire*, v. 41, n. 6, 2016.

SANTOS, S. H. S. et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*, v. 57, n. 2, p.340-7, 2008.

SASSO, S. Efeitos do extrato aquoso da folha da graviola (*Annona muricata Linn*) em modelo experimental de obesidade. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, p. 116, 2017.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, v. 118, p. 2992-3002, 2008.

SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M. P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 32, n.6, p. 638-44, 2008.

SHI, J. et al. Direct health care costs associated with obesity in Chinese population in 2011. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 31, p. 523-8, 2017.

SHOLZ, E.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. *Planta Medica*, v. 60, p. 360-4, 1994.

SILVA, A. R. H. et al. Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 74, p. 170-7, 2016.

SILVA, F. G. et al. Flavoid content in native and cultivated populations of “carqueja” (*Baccharis trimera* (Less) DC.) harvested at dry and humid season. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, p. 19-25, 2006.

SILVA, F. G. et al. Seasonal Variability in the Essential Oils of Wild and Cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 5, 990-7, 2007.

SIMÃO, A. A. Composição química, eficácia e toxicidade de plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade. Tese (Doutorado em agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, p. 182, 2013.

SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D.; CHAGAS, P. M. B. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 6, n. 47, p. 5626-830, 2012.

SIMÕES-PIRES, C. A. et al. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* Belongig to sect. *Culopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst.* v. 253, p. 23-32, 2005a.

SIMÕES-PIRES, C. A. et al. Isolation and On-line Identification of Antioxidant Compounds from Three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS/MS with Post-column Derivatisation. *Phytochemical Analyses.* v. 16, p. 307-14, 2005b.

SINGH, D. P. et al. Isomalto-oligosaccharides, a prebiotic, functionally augment green tea effects against high fat diet-induced metabolic alterations via preventing gut dysbacteriosis in mice. *Pharmacological Research,* v. 123, p. 103-13, 2017.

SOHET, F. M. et al. Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. *British Journal of Nutrition,* p. 462-9, 2009.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antiepatotoxic properties. *Planta Médica,* v 53, p. 37-9, 1987.

SOUZA, M. P. et al. *Constituintes Químicos Ativos de Plantas Medicinais Brasileiras.* Fortaleza, Edição UFC, 1991.

SOUZA, S. P. et al. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera*: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. *Revista Brasileira de Farmacognosia,* v. 21, n. 3, 450-55, 2011.

SOUZA, S. P. et al. Estudo da atividade antiobesidade do extrato metanoico de *Baccharis trimera* (Less) DC. *Revista brasileira de farmácia,* v 93(1), p. 27-32, 2012.

SPALDING, K. L. et al. Dynamics of fat turnover in humans. *Nature,* v. 453, n. 7196, p. 783-787, maio 2008.

SPOSITTO, A.C. (org.). *IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose.* Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 88, São Paulo, 2007.

STABELINI NETO, A. et al. Síndrome metabólica em adoescentes de diferentes estados nutricionais. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo,* v. 56, p. 104-9, 2012.

SUNG, Y. T. et al. Anti-obesity activity, acute toxicity, and chemical constituents of aqueous and ethanol *Viola mandshurica* extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine,* p. 17-297, 2017

SWEAZEA, K. L.; LEKIC, M.; WALKER, B. R. Comparison of mechanisms involved in impaired vascular reativity between high sucrose and high fat diets in rats. *Nutrition and Metabolism,* v.7, n. 48, 2010.

TAHERI, S. et al. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Medicine,* v. 1, p. 210-17, 2004.

TAN, J. H. Y. et al. Design and Receptor Interactions of Obligate Dimeric Mutant of Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, p. 14692-702, 2012.

TAO, Y. et al. Ultrafiltration coupled with high-performance liquid chromatography and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for screening lipase binders from different extracts of *Dendrobium officinale*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, p. 6081-93, 2015.

TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, v. 83, p. 1263-71, 1995.

TEIXEIRA, H. M. et al. Avaliação morfométrica da mucosa do intestino grosso após derivação jejunoileal em ratos. *ABCD – Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, v. 9, n. 4, p. 140-145, 2006.

TOFFOLI-KADRI, M. C. et al. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory properties of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 153, n. 2, p. 461-8, 2014.

TORRES, L. M. B. et al. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, v. 55, p. 617-9, 2000.

TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 117, 2008.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society Transactions*, v. 33, n.5, p. 1078- 81, 2005.

VALE, M. I. C. A.; LISBOA, P. C. Papel do tecido adiposo no controle do armazenamento de energia e na composição corporal. In: SAWAYA, A. AL.; LEANDRO, C.G.; WAITZBERG, D. L. *Fisiologia da Nutrição na saúde e na doença: da biologia molecular ao tratamento*. São Paul: Editora Atheneu, cap. 10, p. 199-211, 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: Cura segura? *Revista Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-28, 2005.

VENEMA, K. Role of gut microbiota in the control of energy and carbohydrate metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 13, n. 4, p. 432-8, 2010.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIEIRA-ALMEIDA, E. C.; PIGOSO, A. A.; ALMEIDA, A. F. *Camellia sinensis* extract inhibits in vitro pancreatic lipase and has preventive effect on obesity in female rat fed

a high-fat diet. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, c. 9, n. 37, p. 919-28, 2015.

WANG, Y. C. et al. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and UK. *Lancet*, v. 378, p. 815-25, 2011.

WANG, Z. et al. Anti-Obesity effect of the above-ground part of *valeriana dageletiana* Nakai ex F. Maek Extract in high-fat die-induced obese C57BL/6N mice. *Nutries*, v. 9, n. 689, p. 1-15, 2017.

WANGKHEIRAKPAM, S. D. et al. Hepatoprotective effect of *Auricularia delicata* (Agaricomycetes) from India in Rats: Biochemical and Histopathological Studies and Antimicrobial Activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 20, n. 3, p. 213-25, 2018.

WATANABE, J. et al. Isolation and identification of α -glycosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 61, n. 1, p. 177-8, 1997.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 112, n.12, p. 1796-808, 2003.

WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *Journal of Clinical Investigation*, v. 116, p. 115-24, 2006.

WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 57, n. 5, p. 339-45, 2013.

WOHLMUTH, H. et al. Pharmacognosy and Chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata* L.). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, n. 6, 1015-18, 2010.

WOLOWCZUK, I. et al. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clinical and Developmental Immunology*, 639803, 2008.

WOOD, I. S.; et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 68, p. 370-7, 2009.

WU, J. et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, v. 150, p. 366-76, 2012.

XU, Y. et al. Borapetoside E, a Clerodane Diterpenoid Extracted from *Tinospora crispa*, Improves Hyperglycemia and Hyperlipidemia in High-Fat-Diet-Induced Type 2 Diabetes Mice. *Journal Natural Products*, 2017.

YANG, W. S. Tea consumption and risk of type 2 diabetes: a dose-response meta-analysis of cohort studies. *British Journal of Nutrition*, v. 111, p.1329-39, 2014.

YE, J.; McGUINNESS, O. P. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 304, n.5, p. E466-77, 2013.

YUDIKIN, J.S. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, v. 27, p. S25-S28, 2003

ZDERO, C. et al. *Ent*-clerodanes and other constituents from bolivian *Baccharis* species. *Phytochemistry* 28. p. 531, 1989.

ZHANG, J. et al. Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis* propolis and *Eucalyptus* propolis in RAW64.7 cells. *Journal Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 10, 2016.

ZHANG, Q. I. et al. M2 macrophages infusion ameliorates obesity and insulin resistance by remodeling inflammatory/macrophages homeostasis in obese mice, v 443, p. 63-71, 2017.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.

ZHOU, C. et al. Quality Evaluation of *Desmodium styracifolium* Using High-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection and Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, v.23, n.3, p.240-7, 2012.