

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Demétrius Paiva Arçari

Avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na adipogênese e sinalização da
insulina

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
DEMÉTRIUS PAIVA ARÇARI
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética animal e
evolução.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Ar14a Arçari, Demétrius Paiva, 1978-
Avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na
adipogênese e sinalização da insulina / Demétrius Paiva
Arçari. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marcelo Lima Ribeiro.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Erva-mate. 2. *Ilex paraguariensis*. 3.
Adipogenia. 4. Insulina. 5. Obesidade. I. Ribeiro,
Marcelo Lima. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in adipogenesis and insulin signaling

Palavras-chave em Inglês:

Yerba mate

Ilex paraguariensis

Adipogenesis

Insulin

Obesity

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Lima Ribeiro [Orientador]

Edi Lúcia Sartorato

Dennys Esper Corrêa

Thomas Prates Ong

Marcelo Macedo Rogero

Data da defesa: 15-12-2011

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 15 de Dezembro de 2011.

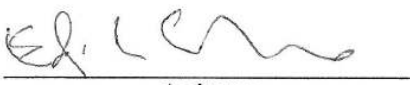
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro (Orientador)



Assinatura

Prof^a. Dr^a. Edi Lúcia Sartorato



Assinatura

Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa



Assinatura

Prof. Dr. Thomas Prates Ong




Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero



Assinatura

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina de Mattos Zeri



Assinatura

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

Assinatura

Prof^a. Dr^a. Juliana Alves Macedo

Assinatura

“A ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da nossa natureza, a curiosidade; fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui de melhorar a própria existência.”

(Ernest Renan)

Aos meus queridos e amados pais
Clemildo Demétrio e Inês, minhas
maiores fontes de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho e de forma especial:

Aos meus pais que sempre me mostraram os verdadeiros valores que o ser humano deve aprender e são símbolos de perseverança e determinação;

Às minhas queridas e estimadas Vó Xica e Tia Lola, que zelam por mim e orientam meus passos;

Ao Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro que além de me orientar, acompanhou minha trajetória acadêmico-científica desde minha iniciação científica até os dias atuais. Obrigado Marcelo por você acreditar no meu potencial e contribuir de forma única para que eu pudesse subir os degraus rumo ao conhecimento;

Ao Prof. Dr. Lúcio Ferraz que me orientou no desenvolvimento das análises de translocação nuclear e sempre se colocou à disposição no que eu necessitasse;

À Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Gambero um dos meus maiores exemplos de admiração profissional e que me orientou em distintas técnicas durante minha carreira acadêmica, se colocando a minha disposição sempre que necessário;

Aos Professores Dr. Thomas Ong, Dr. Marcelo Rogero, Dr. Dennys Cintra, Dr^ª. Edi Lúcia, Dr^ª. Ana Zeri, Dr^ª. Elizabeth Torres e Dr^ª. Juliana Macedo membros da banca examinadora que aceitaram prontamente o meu convite e que sempre foram solícitos as minhas necessidades e prioridades;

À todos os alunos da Família UNIFAG que de alguma forma contribuíram para esse trabalho e em especial à Tanila e Karim que me ajudaram nas dietas empregadas e em diferentes análises realizadas, a Juliana pela ajuda com o PCR em tempo real, a Carol que me auxiliou no *Westernblot* e a Érica, nossa pequena Kinha, que foi essencial para minhas necessidades durante a cultura celular e análises de *Westernblot*. Pessoal, sem vocês eu não conseguiria!

Às secretárias da Pós-graduação, em especial a Srt^a. Maria de Lourdes Fagundes, do Programa de Genética e biologia molecular, por sempre atender prontamente as minhas necessidades.

À todos vocês muito obrigado pelo apoio incondicional!

RESUMO

A obesidade é considerada um problema de saúde pública, principalmente pelo fato desta estar associada com diversas patologias como a resistência à insulina (RI). Atualmente, diversas estratégias são utilizadas visando à redução de peso corporal, dentre estas se destaca o uso de produtos de origem vegetal, incluindo a *Ilex paraguariensis*, cujo nome comum é erva-mate. Muitos trabalhos mostram que os compostos detectados na erva-mate possuem diferentes funções biológicas, tais como: ação antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, anticancerígena, modificação do metabolismo de colesterol, entre outros. Muito embora diversos estudos destaquem as funções biológicas da erva-mate, pouco se sabe sobre sua capacidade de modulação na expressão de genes relacionados à obesidade, e seu efeito na via de sinalização da insulina. Deste modo o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do extrato aquoso de erva-mate tostado no processo de adipogênese e sua ação nos mecanismos de sinalização da insulina. Os dados do presente trabalho mostram que a erva-mate na concentração de 1,0g/kg em animais submetidos à dieta hiperlipídica aumentou a expressão de diferentes genes responsáveis pela ativação da AKT, reduziu a translocação nuclear de NF- κ B e FOXO1, reduziu a expressão *PEPCK* e *G6Pase* ligados ao processo de gliconeogênese no tecido hepático. Os efeitos da erva-mate na sinalização da insulina foram ratificados, por análise proteica de IRS-1, IRS-2 e AKT, redução na resistência à insulina observada pelo teste do K_{ITT} e redução da glicemia basal. O presente trabalho demonstra ainda em cultura celular de 3T3-L1 que a erva-mate e alguns de seus principais compostos bioativos (ácido clorogênico, rutina e quercetina), possuem ação mais expressiva na etapa de diferenciação do adipócito e atuam modulando distintos genes relacionados ao processo de diferenciação do adipócitos. O trabalho ainda sugere que a erva-mate possa atuar *in vitro* e *ex vivo* de maneira mais expressiva na redução da adipogênese através da via WNT, visto pelo aumento da expressão de diferentes genes relacionados com essa via. O resultado final da ativação desta via é a repressão significativa de *PPAR γ ²* e *C/EBP α* , principais fatores de transcrição necessários para que ocorra a etapa final do processo de diferenciação dos adipócitos, contribuindo assim para elucidar a redução do peso corpóreo e da gordura epididimal observada nos animais submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate durante 60 dias, que por sua vez reduz a produção de citocinas, em especial o TNF- α , contribuindo parcialmente para a melhora do quadro de sinalização a insulina observado após intervenção.

Palavras Chave: Erva-mate, *Ilex paraguariensis*, adipogênese, insulina e obesidade.

ABSTRACT

Obesity is a problem of public health, mainly because it is associated with many conditions such especially insulin resistance (IR). Currently, several strategies have been used in order to reduce the total body weight, among these there is a growing evidence supporting the use of products of plant origin, including the *Ilex paraguariensis*, whose common name is *yerba mate*. Various studies have shown that the compounds found in *yerba mate* has several biological functions, such as antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, anticancer, modification of cholesterol metabolism and others. Although several studies highlight the biological functions of *yerba mate*, there are lack of evidence providing their ability to modulate expression of genes related to obesity and its effect on the insulin signaling pathway. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of *yerba mate* in gene expression that regulate adipogenesis and insulin signaling pathway. Our data showed *yerba mate* (1,0 g/kg) in animals subjected to high fat diet, increased different gene expression responsible for the activation of the AKT, reduction of FOXO1 and NF- κ B nuclear translocation, reduction gene expression of PEPCK and G6Pase involved in gluconeogenesis process in liver. The effects of *yerba mate* in insulin signaling was confirmed by IRS-1, IRS-2 and AKT protein analysis, reduction in insulin test tolerance by K_{ITT} and reduction in glucose. Our data also showed in 3T3-L1 cell culture that *yerba mate* and some of its major bioactive compounds (chlorogenic acid, rutin and quercetin), act in an early stage of adipocyte differentiation and modulate different gene expression that regulate adipogenesis. Additionally, *yerba mate* can act *in vitro* and *ex vivo* in WNT pathway, seen by the increased expression of different genes in this pathway resulting in a significant repression of *C/EBP α* and *PPAR γ ²*, the most important transcription factors essential for the occurrence of adipocyte differentiation. This findings collaborate to elucidate the reduction of body weight and epididymal fat observed in animals subjected to high fat diet treated with *yerba mate* for 60 days, which reduces the production of cytokines, particularly TNF- α , contributing partially to the improvement in insulin signaling observed after intervention.

Key words: *Yerba mate*, *Ilex paraguariensis*, adipogenesis, insulin and obesity.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Obesidade – Epidemia Mundial	7
2.2. Síndrome Metabólica	8
2.3. Sinalização da Insulina	10
2.4. Síntese de Glicogênio	15
2.5 Resistência à Insulina	17
2.6. Adipocinas	18
2.7. Interleucina -6 (IL-6)	20
2.8. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)	21
2.9. Tecido adiposo	22
2.10. Fator Nuclear kB (NF-kB)	25
2.11. forkhead membros da classe O (FOXO)	27
2.12. Receptor ativado por Proliferador de Peroxissomas (PPAR)	29
2.13. Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBPs)	32
2.14. Proteína ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP)	33
2.15. Adipogênese	35
2.16. Outras vias envolvidas na adipogênese	38
2.17. <i>Wingless type</i> (WNT)	39
2.18. GATA	41
2.19. <i>Kruppel-like zinc fingers</i> (KLFs)	42
2.20. <i>Delta like protein 1</i> (DLK-1)	43
2.21. Balanço energético	43
2.22. <i>Ilex paraguariensis</i> (erva-mate)	44
3. JUSTIFICATIVA	49
4. OBJETIVOS	51
4.1. Objetivo Geral	51
4.2. Objetivos específicos	51
5. MATERIAL E MÉTODOS	53
5.2. EXPERIMENTAÇÃO - MODELO ANIMAL	53
5.3. EXPERIMENTAÇÃO – CULTURA CELULAR	62
6. RESULTADOS	69
6.2. Sinalização da insulina	71
6.3. Adipogênese	76
7. DISCUSSÃO	85
7.1. Sinalização da insulina	85
7.2. Adipogênese	91
8. CONCLUSÃO	103
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
10. ANEXOS	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definições da síndrome metabólica de acordo com as diferentes organizações.	9
Tabela 2 – Dietas utilizadas no trabalho.	55
Tabela 3 – Grupos experimentais	56
Tabela 4 – Sequências consenso utilizadas no EMSA – Sinalização da insulina	59
Tabela 5 – Pannel de genes avaliados pelo Mouse PI3K-AKT Signaling Pathway RT ² Profiler™.	60
Tabela 6 – Primers utilizados para a PCR em tempo real – Sinalização da insulina.	61
Tabela 7 – Compostos com suas respectivas concentrações utilizados na cultura celular.	63
Tabela 8 – Pannel de genes avaliados pelo mouse Adipogenesis RT ² Profiler™ PCR Array.	66
Tabela 9 – Primers utilizados para a PCR em tempo real – Adipogênese.	67
Tabela 10– Parâmetros bioquímicos dos grupos submetidos às diferentes dietas durante os primeiros 60 dias.	70
Tabela 11– Parâmetros bioquímicos dos grupos submetidos às diferentes dietas e intervenções ao final do experimento.	70
Tabela 12– Nível de expressão gênica em tecido hepático após normalização com β -actina em Unidades Arbitrárias (U.A).	74
Tabela 13– Nível de expressão gênica em cultura de células após normalização com β -actina em Unidades Arbitrárias (U.A).	81
Tabela 14– Nível de expressão gênica em tecido adiposo após normalização com β -actina em Unidades Arbitrárias (U.A).	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de sinalização da insulina e captação da glicose.	15
Figura 2: Regulação do metabolismo de glicose no tecido hepático.	17
Figura 3: Mecanismo de ativação e translocação nuclear do NF-kB.	27
Figura 4: Processo de adipogênese, com os principais fatores de transcrição envolvidos.	38
Figura 5: Via de sinalização WNT com translocação nuclear de β -catenina.	41
Figura 6: Compostos Bioativos presentes na erva-mate.	45
Figura 7: cafeoilquínicos - ácido clorogênico (ACG) e seus isômeros	46
Figura 8: Ilustração das etapas realizadas na cultura celular	64
Figura 9: Nível fosforilação de IRS-1 no fígado no fígado dos grupos dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica intervenção com erva-mate (DH-mate).	71
Figura 10: Nível fosforilação de IRS-2 no fígado no fígado dos grupos dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica intervenção com erva-mate (DH-mate).	72
Figura 11: Nível fosforilação de AKT no fígado no fígado dos grupos dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica intervenção com erva-mate (DH-mate).	72
Figura 12: Imagem representativa do EMSA realizado através da incubação de extratos nucleares de fígado dos animais tratados com o oligonucleotídeo da região consenso do NF-kB e FOXO1.	75
Figura 13: Imagem representativa do EMSA realizado através da incubação de extratos nucleares de fígado dos animais tratados com o oligonucleotídeo da região consenso do PPAR γ e C/EBP- α .	76
Figura 14: Gráfico comparativo das diferentes concentrações utilizadas na cultura celular de 3T3-L1, etapa de diferenciação.	78
Figura 15: Gráfico comparativo das diferentes concentrações utilizadas na cultura celular de 3T3-L1, etapa de maturação.	78
Figura 16: Ação da erva-mate nas principais isoformas presentes nas diferentes etapas da via AKT em tecido hepático	90
Figura 17: Ação da erva-mate nas principais isoformas presentes na ativação da via WNT no tecido adiposo por mecanismo dependente de β -catenina.	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG - Ácido clorogênico
AGL - Ácidos graxos livres
ApoC-III - apolipoproteína C-III
C/EBP- α - Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma alfa
C/EBP- β - Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma beta
C/EBP- δ - Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma delta
C/EBPs - Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT
cAMP - AMP cíclico
CDK - Ciclinas dependentes de quinase
CDKI - Inibidoras de CDK
CREB - Proteína de ligação do elemento responsivo a cAMP
DEX - Dexametasona
DLK-1 - *Delta-like protein 1* (Pref-1).
EMSA - *Electrophoretic mobility shift assay*
FBS - Soro bovino fetal
FoxC - *Forkhead* membro da classe C
FoxO - *forkheads* membros da classe O
G6Pase - Glicose 6 fosfatase
GLUT-4 - Transportador de glicose
GSK-3 - Glicogênio sintetase quinase 3
IBMX - Isobutilmetilxantina
IL -Interleucina
IL-6 – Interleucina 6
IRS – Substrato receptor de insulina
kITT - Teste de tolerância à insulina
KLFs - *Kruppel-like zinc finger*
LRP - Receptores de lipoproteínas
MCP-1 - Proteína 1 quimioatrativa de macrófagos
NF-kB - Fator Nuclear kB
PAI-1 - Inibidor 1 de ativador de plasminogênio
PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDK - Quinase dependente de fosfoinosítídeos
PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PGC-1 α - PPAR γ coativador 1alfa
PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase
PI3KCA – PI3K subunidade catalítica (p110) alfa
PI3KCB - PI3K subunidade catalítica (p110) beta
PI3KCD - PI3K subunidade catalítica (p110) delta
PI3KCG - PI3K subunidade catalítica (p110) gamma
PPAR - Receptor ativado por proliferadores peroxissomas
PPAR γ - Receptor ativado por proliferadores peroxissomas isoforma gamma
RCM - Risco Cardiometabólico
RI - Resistência à insulina
RLPG - Receptores ligados a proteína G
RNAm - RNA mensageiro
SFRP - Proteínas *frizzled*
SM – Síndrome Metabólica
SREBP - Proteína ligadora do elemento regulado por esteróis
SREBP-1c - Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TAB - tecido adiposo branco
TAM - Tecido adiposo marrom
TCF/LEF - *T-cell factor/lymphoid-enhancing factor*
TG - Triacilglicerol
TNF- α - Fator de necrose tumoral Alfa
UCP-1 - *Uncoupling protein 1*
WNT - *Wingless type*

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada um crescente problema de saúde pública (Guzik et al., 2006). Trabalhos relatam que indivíduos obesos apresentam taxas mais elevadas de morbidade e mortalidade, assim como uma reduzida qualidade de vida (Kuczmarski et al., 1994; Freitas et al., 1998; Isomaa et al., 2001).

Embora os mecanismos moleculares de desenvolvimento da obesidade não estejam bem estabelecidos, sabe-se que esta condição está associada a uma inflamação crônica de baixo grau na qual o tecido adiposo desempenha um importante papel (Yudkin et al., 1999; Bulló et al., 2003). Estudos recentes mostram que o tecido adiposo não é somente um reservatório de energia, mas também exerce importantes funções no sistema endócrino, metabolismo e na regulação homeostásica (Guzik et al., 2006).

As células do tecido adiposo, denominadas adipócitos, estocam energia na forma de triglicerídeos e podem mobilizar essas reservas para ser utilizada durante períodos de privação energética (Large et al., 2004). Além disso, os adipócitos produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas conhecidas como adipocinas (Furukawa et al., 2004). Alguns estudos mostram que a produção desregulada das adipocinas como o inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1) (Shimomura et al., 1996), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Hotamisligil et al., 1993; Uysal et al., 1997), interleucina – 6 (IL-6) (Fried et al., 1998), angiotensina (Hainault et al., 2002), adiponectina (Berg et al., 2002; Tsao et al., 2002, Matsuzawa et al., 2004) e leptina (Friedman & Halaas, 1998; Unger, 2003) estão envolvidas na patogenicidade do risco cardiometabólico (RCM) (Goldfarb, 2005). Algumas destas adipocinas, além de exercer sua atividade pró-inflamatória também poderiam afetar os mecanismos ligados à sinalização da insulina.

A insulina desencadeia uma série de respostas biológicas que incluem: estimulação da captação da glicose, síntese de glicogênio, ácidos graxos e proteínas, ativação da transcrição de genes específicos, modulação do crescimento e diferenciação celular (Zecchin et al., 2004). A insulina age em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Os efeitos biológicos da insulina iniciam-se após a ativação do seu receptor, o que resulta na fosforilação em tirosina de vários substratos protéicos intracelulares incluindo os substratos receptores de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2) (Kahn et al., 1993; Van Obberghen 1994). Estes substratos quando fosforilados em tirosina ativam a proteína quinase B (PKB/AKT), cuja interação parece ser essencial para a transdução do sinal da insulina (Shepherd et al., 1995), para processos de translocação do transportador de glicose (GLUT-4), captação de glicose estimulada pela insulina, ativação da glicogênio sintetase e para a inibição da lipólise estimulada pela insulina (White, 1998; Czech & Corvera, 1999). Diversos trabalhos mostram que a ativação dos substratos intermediários da via de sinalização do TNF- α , como *c-jun* N-terminal Kinase (JNK), pode interferir na funcionalidade do IRS-1 e IRS-2. Uma vez fosforilados em serina pela JNK, a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina fica comprometido, resultando em defeitos na sinalização da insulina que conseqüentemente leva à resistência à insulina (RI) afetando desta forma o transporte de glicose. Outra via pró-inflamatória que pode levar à fosforilação em serina de substratos do receptor de insulina é a via I κ K/I κ B/NF- κ B, via esta que também pode ser ativada pelo TNF- α (Rotter et al., 2003; Csehi et al., 2005; Zhang et al., 2008).

Estudos mostram que fatores de transcrição incluindo o receptor ativado por proliferadores peroxissomas (PPAR), proteína ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP), proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/ enhancer binding protein –

C/EBPs) e os *forkheads* membros da classe O (FOXO) desempenham papel “chave” na cascata transcricional que ocorre durante o processo de adipogênese e no mecanismo de ação da insulina (Hamm et al., 2001; Eberlé et al., 2004; Manolagas & Almeida, 2007; Sarruf et al., 2008).

Diante do que foi exposto fica claro que vários fatores estão intimamente ligados à obesidade e que esta não é uma condição singular, e sim um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas que, em última análise, refletem no fenótipo obeso (Jebb, 1999). O balanço energético positivo, que ocorre quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, é um fator importante para o desenvolvimento da obesidade, promovendo aumento nos estoques de energia e peso corporal (Pereira et al., 1999a). A tendência secular no aumento da obesidade parece ocorrer paralelamente à redução na prática de atividade física e aumento no sedentarismo (Martinez, 2000). Além disso, uma redução natural no gasto energético é observada com a modernização. Deste modo, o sedentarismo e os hábitos nutricionais parecem representar o principal fator de risco no desenvolvimento da obesidade mundial (Pereira et al., 1999b).

Atualmente, diversas estratégias são utilizadas visando à redução de peso corporal, como o uso de suplementos alimentares naturais contendo extratos de: *Ephedra sinica*, *Paullinia cupana*, *Plantago psyllium*, *Cecropia obtusifolia*, *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* (Andersen & Fogh, 2001; Pittler et al., 2005; Nicasio et al., 2005; Fallon et al., 2008).

Dentre estes produtos de origem vegetal, destaca-se a *Ilex paraguariensis*, cujo nome comum é erva-mate. Esta é amplamente consumida no sul do Brasil sob a forma de chimarrão, na região centro-oeste na forma de tererê e no restante do país como chás ou infusões. Diversos trabalhos mostram que os compostos detectados na erva-mate possuem

uma série de funções biológicas, tais como: ação antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, anticancerígena, modificação do metabolismo de glicose, redução do risco cardiovascular, modificação do metabolismo do colesterol, redução do peso corpóreo e reversão do quadro de resistência à insulina (Gugliucci & Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Campos et al., 1996; Schinella et al., 2000; Filip et al., 2001; Nardini et al., 2002; Bracesco et al., 2003; Chandra & Mejia, 2004; Miranda et al., 2008, Arçari et al., 2009; Arçari et al., 2011). Os principais compostos bioativos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos podemos citar a cafeína, a teobromina e a teofilina (Gugliucci & Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Campos et al., 1996). Dentre a classe de saponinas encontram-se tripenóides como as gliconas, os ácidos ursólico e oleanólico (Schinella et al., 2000). Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico (ACGs) e seus isômeros. Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e a cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Filip et al., 2001; Bracesco et al., 2003; Chandra & Mejia, 2004).

Muito embora diversos estudos destaquem as funções biológicas da erva-mate, pouco se sabe sobre a sua capacidade de modulação dos fatores de transcrição que regulam a expressão de genes ligados à obesidade e seu efeito na via de sinalização da insulina. Em um estudo recente do nosso grupo observamos efeitos benéficos do uso de erva-mate no combate a obesidade induzida por dieta em camundongos (Arçari et al., 2009). Nossos dados indicam que o uso de erva-mate por 60 dias foi capaz de melhorar o quadro de algumas condições associadas à obesidade como dislipidemia, redução de peso, resistência à insulina e ainda modificar a expressão de diversos genes ligados à obesidade como: TNF-

α , IL-6, PAI-1, leptina, angiotensina, adiponectina e PPAR- γ no tecido adiposo (Arçari et al., 2009).

Considerando que a obesidade é um problema emergente de saúde pública e tendo em vista os resultados descritos na literatura bem como os obtidos por nosso grupo (Martins et al., 2008; Miranda et al., 2008; Arçari et al., 2009; Arçari et al., 2011), acredita-se que a ingestão de erva-mate poderia atuar nos fatores de transcrição, modulando a sinalização celular e alterando a expressão de genes e proteínas envolvidos na obesidade assim como influenciar a via de sinalização da insulina no tecido hepático.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Obesidade – Epidemia Mundial

O rápido e recente aumento na prevalência da obesidade nos últimos 30 anos, tem levantado importantes questões sobre sua gênese e etiologia. As mudanças seculares ocorridas na obesidade é uma clara consequência das mudanças do meio ambiente humano (Ulijaszek, 2005).

A obesidade é uma doença crônica complexa, caracterizada por excesso de gordura corporal. É um dos principais problemas de saúde pública no mundo e afeta não apenas nações industrializadas, mas também países em desenvolvimento, tornando-se fator de risco para doenças cardíacas e diabetes (Oblesby et al., 2006). Apesar da atual consciência pública sobre as consequências da obesidade, sua incidência continua a aumentar, e está distribuído em quase todas as etnias e em ambos os sexos, afetando principalmente a população de 25 a 44 anos (Blumenkrantz, 1997). O excesso de peso atinge cerca de 1/3 da população adulta e apresenta uma tendência cada vez mais crescente nas últimas décadas (Oblesby et al., 2006).

O indicador mais utilizado para avaliação do estado nutricional dos indivíduos adultos é o Índice de Massa Corporal (IMC), desenvolvido no século XIX por Quetelet, e calculado pela divisão do peso (em kg) pelo quadrado da altura (em metros). Embora o IMC seja considerado um indicador pouco preciso da gordura corporal, por não levar em conta a composição corpórea (massa gorda e massa livre de gordura), a facilidade do seu cálculo e sua comprovada associação com diferentes causas de mortalidade tem justificado sua utilização como indicador de estado nutricional de adultos em estudos epidemiológicos (Anjos, 1992).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), nos Estados Unidos, 67% da população esta com excesso de peso ($IMC \geq 25\text{kg/m}^2$) e 32,3% dos americanos são considerados obesos ($IMC \geq 30\text{kg/m}^2$). Na Europa, alguns países possuem 25% de obesos (WHO, 2008). No Brasil, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em conjunto com o Ministério da Saúde demonstram que no ano de 2008, 49% da população adulta encontra-se com excesso de peso e 14,7% estava obesa (IBGE, 2010).

O mundo ocidental tem experimentado um crescimento expressivo na prevalência da obesidade, em consequência do desequilíbrio energético decorrente do aumento na ingestão calórica somado à inatividade física e ao declínio concomitante do gasto energético. Algumas alterações coexistem comumente em indivíduos obesos como, por exemplo, hiperglicemia, hiperlipidemia e hipertensão arterial sistêmica (Kaplan, 1989). A adiposidade leva ao desenvolvimento simultâneo dessas alterações funcionais que, coletivamente, compõem a chamada síndrome metabólica (SM) ou risco cardiometabólico (RCM).

2.2. Síndrome Metabólica

Em 1988 foi introduzido o conceito de síndrome X – posteriormente denominada “Síndrome Metabólica (SM)” para descrever um conjunto de anormalidades metabólicas e hemodinâmicas, frequentemente presentes no indivíduo obeso (Reaven, 1994). Diferentes definições para SM foram sugeridas e até o presente momento não existe uma definição universal. A Organização Mundial de Saúde (OMS), o *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATPIII) e o *International Diabetes Federation* (IDF) buscaram desenvolver critérios diagnósticos para SM, sendo estes preconizados para utilização em adultos.

A Tabela 1 apresenta as diferentes definições propostas para se estabelecer a SM, observa-se que, para o critério da OMS, faz-se necessária a resistência à insulina associada a mais dois outros fatores. O NCEP- ATPIII preconiza a presença de três dos componentes, sem priorizar nenhum deles em especial. Já para o IDF, torna-se obrigatória a medida da circunferência abdominal alterada, além de mais dois outros fatores. (Steemburgo et al., 2007).

Tabela 1 - Definições da síndrome metabólica de acordo com as diferentes organizações.

	OMS, 1998	NCEP-AT P III, 2001	IDF, 2006
Diagnóstico de SM confirmado por	Resistência à insulina e presença de mais 2 componentes	3 dos 5 componentes	Circunferência abdominal alterada e mais 2 componentes
Componentes			
Resistencia à insulina	TDG, GJA, DM tipo 2 ou sensibilidade à insulina diminuída	*	*
Composicao corporal	Razao cintura-quadril: Homens > 0,90 cm Mulheres > 0,85 cm e/ou IMC > 30 kg/m ²	Circunferencia abdominal: Homens ≥ 102 cm Mulheres ≥ 88 cm	Circunferencia abdominal: Homens ≥ 94 cm Mulheres ≥ 80 cm
Lipídeos séricos (mg/dL)	Triglicerídeos ≥ 150 e/ou Homens HDL < 35 Mulheres HDL < 39	Triglicerídeos ≥ 150 e/ou Homens HDL < 40 Mulheres HDL < 50	Triglicerídeos ≥ 150 e/ou Homens HDL < 40 Mulheres HDL < 50 ou uso de hipolipemiantes
Pressao Arterial (mmHg)	≥ 140/90	≥ 130/85 ou uso de anti-hipertensivos	≥ 130/85 ou uso de anti-hipertensivos
Glicose serica (mg/dL)	TDG, GJA ou DM tipo 2	> 110 (incluindo DM)	> 100 (incluindo DM)
Outros	Microalbuminuria Excrecao urinaria de albumina ≥ 20 µg/min	*	*

OMS: Organização Mundial da Saúde, NCEP-ATP III : *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III*, IDF: *International Diabetes Federation*, TDG : Tolerância diminuída à glicose, GJA: Glicemia de jejum alterada, DM: Diabetes mellitus.

(Modificado de Steemburgo et al., 2007)

A SM representa uma situação clínica caracterizada por um agrupamento de fatores de risco para doença cardiovascular (Isomaa et al., 2001), entre eles, a hipertensão arterial, a dislipidemia, a obesidade visceral e as manifestações de disfunção endotelial (Mcneill et al., 2005). Devido a este fato e por diferentes critérios adotados para sua definição, muitos autores nos dias atuais preferem chamar a SM de risco metabólico ou de risco cardiometabólico (RCM) (Goldfarb, 2005).

A prevalência do RCM é estimado entre 20 a 25% da população mundial, com comportamento crescente nas últimas décadas (Dunstan et al., 2002). Esta prevalência é ainda maior entre homens e mulheres mais velhos, chegando a 42% entre indivíduos com idade superior a 60 anos (Isomaa et al., 2001). Indivíduos com RCM apresentam risco 2 a 3 vezes maior de morbidade cardiovascular que indivíduos saudáveis (Isomaa et al., 2001). Considerando que existam cerca de 200 milhões de pacientes diabéticos em todo o mundo e que 80% irão falecer devido a doenças cardiovasculares, as pesquisas médicas estão voltadas na identificação de possíveis marcadores do RCM que possam auxiliar no combate à progressão da atual epidemia (Diabetes atlas, 2003). A anormalidade central associada ao risco cardiometabólico parece ser a resistência dos tecidos periféricos à insulina, a qual pode ser definida como um estado de resposta biológica subnormal aos níveis circulantes de insulina.

2.3. Sinalização da Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta do pâncreas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina age em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da

captação de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose (via diminuição da neoglicogênese e glicogenólise), da lipólise e da proteólise. Além disso, a insulina tem efeitos tardios na expressão de genes e síntese protéica, assim como na proliferação e na diferenciação celulares. Outras funções da insulina incluem o aumento da produção de óxido nítrico no endotélio, a prevenção da apoptose ou morte celular e a promoção da sobrevivência celular (Birnbaum et al., 2001; Cohen, 2006).

A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α (alfa) e duas subunidades β (beta), que atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase, levando à alteração conformacional e à autofosforilação do receptor nas subunidades β em múltiplos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163), o que aumenta ainda mais sua atividade quinase (Saad et al., 1992; Elchebly et al., 1999; Yuan et al., 2001). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Atualmente, dez substratos do receptor de insulina já foram identificados, quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina (IRS) (Folli et al., 1992).

Os substratos receptores IRS-1 e IRS-2 são considerados um dos principais reguladores do metabolismo glicídico (White, 2002). As funções fisiológicas do IRS-1 e IRS-2 foram estabelecidas por meio da produção de camundongos sem os genes que codificam esses substratos (camundongos “knockout” para IRS-1 e IRS-2). Alguns estudos demonstraram que a inativação de IRS-1 e IRS-2 provoca a resistência à insulina (Whitehead et al., 1998; Previs et al., 2000). O camundongo que não expressa IRS-1

apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é necessariamente hiperglicêmico. Foi sugerido que o IRS-2 poderia compensar parcialmente a ausência de IRS-1, o que explicaria o fenótipo de resistência à insulina sem hiperglicemia do camundongo “knockout” para IRS-1. O camundongo que não expressa o IRS-2 foi gerado há alguns anos e apresenta um fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1: hiperglicemia acentuada decorrente de diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e falência da atividade secretória das células β acompanhada de redução significativa da massa de células beta pancreáticas. Em contraste, camundongos “knockout” para IRS-3 e IRS-4 têm crescimento e metabolismo de glicose quase que normais (White, 1997; Birnbaum, 2001; Nandi et al., 2004).

A fosforilação em tirosina das proteínas IRS, em especial IRS-1 e IRS-2 cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), dentre elas destaca-se a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) classificada em 3 classes principais: classe I (subdividida em IA e IB), II e III (Lietzke et al., 2000; Cantrell, 2001). A PI3K classe I consiste de um complexo heterodímero, formado por uma subunidade reguladora que se apresenta de diferentes formas e são coletivamente nomeadas de p85 e por uma subunidade catalítica denominada p110, podendo esta ser: p110- α (PI3KCA), p110- β (PI3KCB), p110- δ (PI3KCD) ou p110- γ (PI3KCG) (Stein & Waterfield, 2000). Estudos da análise de função da subunidade regulatória e catalítica utilizando camundongos mostram que essas enzimas regulam o metabolismo da glicose e lipídico no tecido hepático, sob condições normais de alimentação (Jia et al., 2008; Sopasakis et al., 2010). Um estudo avaliando tecido hepático de camundongos *knockout* para PI3KCA conduzido por SOPASAKIS et al. (2010) demonstrou que esses animais apresentam redução da sensibilidade a insulina, intolerância à glicose, aumento da gliconeogênese e

hiperinsulinemia, além de apresentar uma quase completa perda de atividade da PI3K associada ao IRS-1, assim como uma redução significativa na ativação da AKT.

Um trabalho recente realizado por CHATTOPADHYAY et al. (2011) avaliou a expressão proteica de PI3KCA e PI3KCB através de *westernblot*, em fígado de camundongos *knockout*, demonstrando a influência destes para ativação da AKT quando associado a IRS-1 e IRS-2.

Estudos mostram que PI3K regula os receptores ligados a proteína G (RLPG), estes por sua vez regulam o crescimento, diferenciação e reduzem a apoptose das células β do pâncreas (Farilla et al., 2003; Li et al., 2003). Os RLPG ativam diretamente a PI3K da classe I-B que possui uma única isoforma a p110- γ (PI3KCG). A atividade de PI3KCG tem sido demonstrada em diferentes modelos experimentais e em células insulino responsivas (Bernstein et al., 1998; Trumper et al., 2001). Um estudo conduzido por MACDONALD et al. (2004) em camundongos, demonstrou que a ausência de PI3KCG provoca uma grave modificação na resposta à insulina observado pelo teste de tolerância à insulina (K_{ITT}), com aumento da glicemia e diabetes, que podem ser explicadas pela redução na resposta celular à insulina. O estudo ainda demonstra que apesar da redução de PI3K nas ilhotas pancreáticas, a secreção de insulina nessas células é aumentada ao passo que seu conteúdo de insulina é reduzido, sugerindo desta forma que PI3K classe I-A e Classe I-B possuem vias distintas de ativação nas ilhotas pancreáticas. Esses achados são de grande importância para nosso estudo visto que, a erva-mate apresentou atividade modulatória na isoforma PI3KCA pertencente a classe I-A e também na PI3KCG única isoforma da classe I-B.

A ligação dos sítios fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3K ativa o domínio catalítico associado da subunidade p110 (Miron et al, 2001).

A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol, produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PIP2) e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (Cross et al., 1995). Este último produto liga-se aos domínios PH (“pleckstrin homology”) de diversas moléculas sinalizadoras, alterando sua atividade e localização celular (Cross et al., 1995). A ativação da PI3K resulta em um aumento do PIP3, que leva a translocação da AKT para a membrana e uma modificação conformacional permitindo desta forma que a quinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK) tipo 1 (PDK-1) e a tipo 2 (PDK-2) fosforilem resíduos de serina e treonina, ativando totalmente a AKT, também conhecida como proteína quinase B (PKB) (AKT/PKB) favorecendo assim, a translocação do transportador de glicose (GLUT-4), para a membrana celular no tecido muscular e adiposo (Chan & Tschlis, 2001) (Figura 1). Diferentes estudos realizados em camundongos com deficiência hepática específica para PDK-1 mostram a importância desta para a ativação da AKT, visto que estes animais apresentam maior acúmulo de lipídeos no fígado e hiperinsulinemia (Nandi et al., 2004; Mora et al., 2005; Okamoto et al., 2007).

A AKT ainda possui um domínio PH que interage diretamente com PIP3, promovendo, a translocação do GLUT-4 bem como sua atividade catalítica (Brady et al., 1997). Além de fosforilar a AKT, há evidências de que a PDK-1 seja capaz de, em resposta à insulina, fosforilar isoformas atípicas da PKC envolvidas na síntese proteica e no transporte de vesículas de GLUT4 promovendo desta forma a captação de glicose (Bandyopadhyay et al., 1997; Kitamura et al., 1998). Atualmente são conhecidas três isoformas da AKT em células de mamíferos (AKT-1/PKB α , AKT-2/PKB β , e AKT-3/PKB γ) (Kohn et al., 1996), expressas de maneira distinta ao nível de RNA mensageiro e proteico, sendo a AKT-2 a principal forma expressa em tecidos com resposta à insulina

(Kotani et al., 1998). Além de atuar na sinalização da insulina a via AKT é responsável pela fosforilação de vários substratos citosólicos e nucleares que regulam o metabolismo e o crescimento celular (Altomare et al, 1995). Estudos de bloqueio da expressão para genes *AKT* tem sido realizados para identificar as funções das distintas isoformas da AKT. Recentemente, uma análise utilizando camundongos deficientes para *AKT-1* e *AKT-2*, indicou que os animais *AKT-1* deficientes apresentam uma redução no crescimento e metabolismo normal da glicose, mas os animais *AKT-2* deficientes apresentam resistência à insulina e diabetes tipo 2, no entanto não foi observado diferenças significativas de peso entre os animais (Chen et al., 2001; Cho et al., 2001a; Cho et al., 2001b). Outro estudo conduzido por GAROFALO et al. (2003) demonstra que a ausência de *AKT-2* provoca intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemia e hiperglicemia em camundongos.

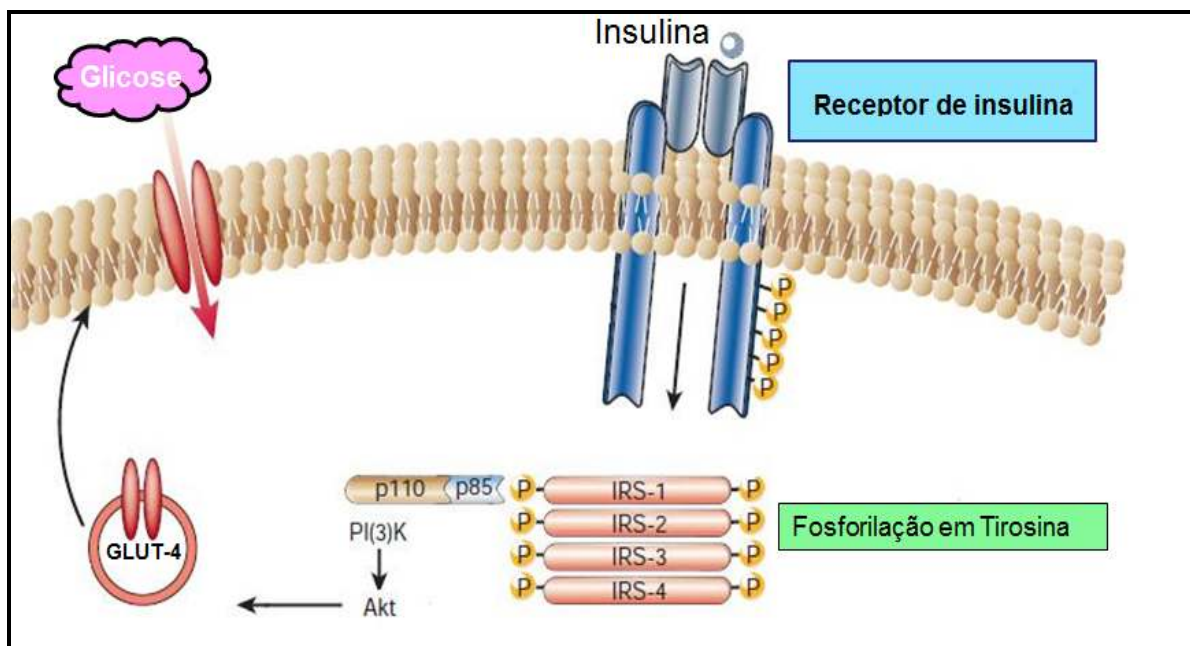


Figura 1: Mecanismo de sinalização da insulina e captação da glicose. (modificado de Kahn, 2001)

2.4. Síntese de Glicogênio

A insulina inibe a produção e liberação de glicose no fígado através do bloqueio da

gliconeogênese e glicogenólise (Figura 2). A insulina estimula o acúmulo de glicogênio através do aumento do transporte de glicose no músculo e síntese de glicogênio em fígado e músculo, este último efeito é obtido via desfosforilação da glicogênio sintetase. Após estímulo pela insulina a AKT fosforila e inativa a enzima glicogênio sintetase quinase 3 (GSK-3), aumentando desta forma a atividade da glicogênio-sintetase (Cross et al., 1995), favorecendo assim a síntese de glicogênio (Figura 2). Na gliconeogênese, a insulina inibe diretamente a transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose 6 fosfatase (G6Pase), principais enzimas controladoras desse processo. A PEPCK é uma enzima que fosforila oxaloacetato para formar fosfoenolpiruvato, enquanto a G6Pase promove a desfosforilação da glicose-6 fosfato, permitindo desta forma a liberação da glicose recém sintetizada para a corrente sanguínea (Postic et al., 2004). O hormônio também aumenta a transcrição de genes de enzimas glicolíticas como a glicoquinase e a piruvato quinase favorecendo desta forma a oxidação da glicose e a síntese de glicogênio (Pilkis et al., 1992; Sutherland et al., 1996). As vias de sinalização que regulam a transcrição desses genes não são totalmente esclarecidas, mas envolvem a AKT e fatores de transcrição da família *forkhead* membros da classe O (FOXO) (Daitoku et al., 2003; Bastie et al., 2005).

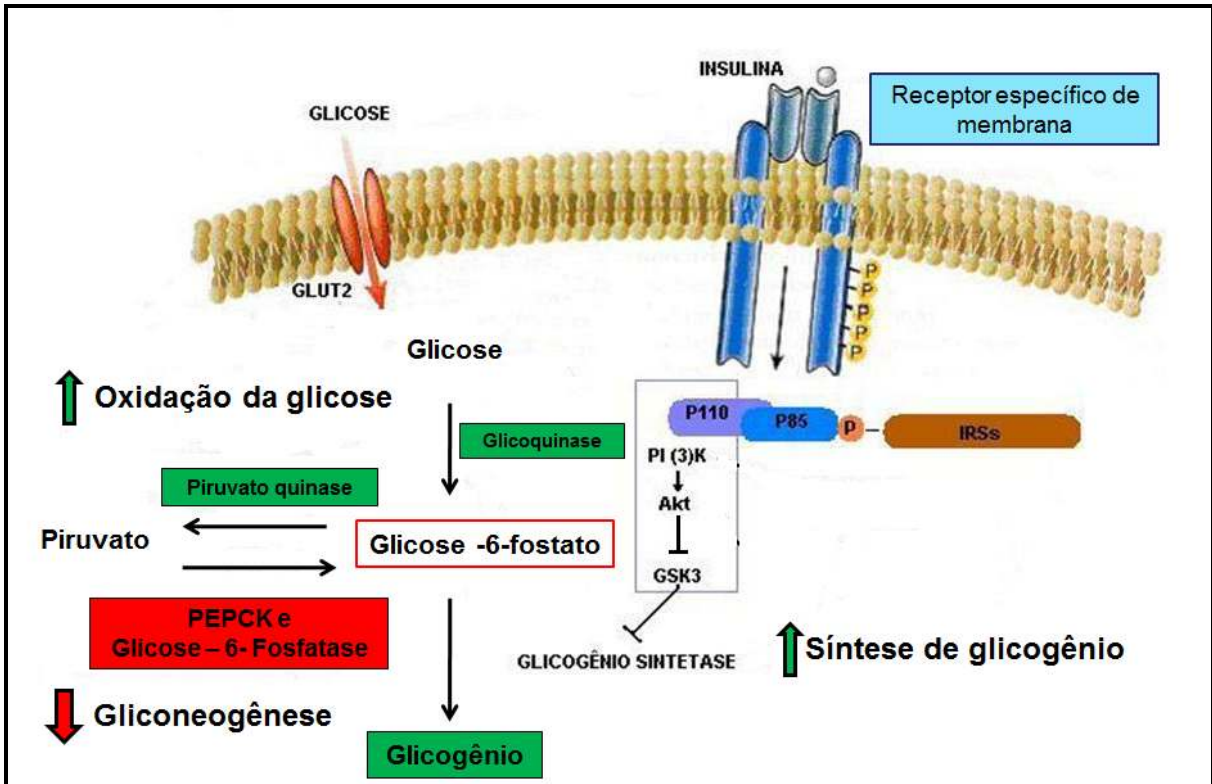


Figura 2: Regulação do metabolismo de glicose no tecido hepático. (modificado de Kahn, 2001)

2.5. Resistência à Insulina

A resistência à insulina é uma condição, genética ou adquirida, na qual concentrações fisiológicas de insulina provocam uma resposta subnormal na captação de glicose pelas células de tecidos periféricos, como tecidos adiposo, muscular e hepático. Em consequência da menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando-se desta forma os níveis circulantes de insulina e, portanto, a situação de resistência à insulina se acompanha em muitos casos de hiperinsulinemia.

O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal pela diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina (Hotamisligil et al.,

1996). Essas fosforilações inibitórias causam “*feedback*” negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina (Carvalho et al., 2003). Estudos recentes indicam que a resistência à insulina induzida pela obesidade pode ser decorrente do aumento na produção de adipocinas como o fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) que inibe a fosforilação da tirosina-quinase do IRS, resultando em defeitos na sinalização da insulina que conseqüentemente leva à resistência à insulina (RI) afetando desta forma o transporte de glicose (Rotter et al., 2003; Csehi et al., 2005; Zhang et al., 2008).

2.6. Adipocinas

Embora os mecanismos moleculares de desenvolvimento da obesidade não estejam bem estabelecidos, sabe-se que esta condição está associada com uma inflamação crônica na qual o tecido adiposo desempenha um importante papel (Yudkin et al., 1999; Bulló et al., 2003). Estudos recentes mostram que o tecido adiposo não é somente um reservatório de energia, mas que exerce importantes funções no sistema endócrino, metabolismo e na regulação homeostásica (Guzik et al., 2006).

As células do tecido adiposo, denominadas adipócitos, produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas conhecidas como adipocinas (Furukawa et al., 2004). A produção de adipocinas pelo tecido adiposo desempenha função-chave nas complicações cardiometabólicas induzidas pela obesidade. Na obesidade, o tecido adiposo está infiltrado por macrófagos ativados, os quais também liberam quantidade excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como o PAI-1, IL-6, MCP-1, angiotensina, adiponectina e TNF- α (Friedman & Halaas, 1998; Hainault et al., 2002; Berg et al., 2002; Tsao et al., 2002; Unger, 2003; Matsuzawa et al., 2004). Esses fatores exercem ações parácrinas, que perpetuam a inflamação local no tecido adiposo, e endócrinas, que induzem à resistência à

insulina e as disfunções cardiovasculares relacionadas ao risco cardiometabólico. Porém os mecanismos que elucidam como o acúmulo de gordura leva à expressão desregulada das adipocinas ainda não estão totalmente esclarecidos.

Diversos autores reportaram elevados níveis séricos de adipocinas em animais e humanos com excesso de adiposidade (Zhang et al., 1994; Samad e Loskutoff, 1996; Ahima e Flier, 2000). De modo complementar, a redução da massa de gordura está relacionada a uma redução nos níveis destas adipocinas (Dandona et al., 1998; Ziccardi et al., 2002). Sabe-se que os adipócitos localizados na região intra-abdominal são mais insulino resistentes, produzem maior quantidade de adipocinas, entre elas a IL-6 e PAI-1 e capturam maior proporção de triglicerídeos quando comparados com os adipócitos subcutâneos. (Wohlers et al., 2003) Estas adipocinas tem a capacidade de afetar o metabolismo glicêmico e lipídico predispondo ao desenvolvimento de um processo inflamatório e conseqüentemente ao desenvolvimento de diabetes e da aterosclerose (Xie et al., 2006).

Uma das teorias propostas para elucidar a relação da gordura visceral com a resistência a insulina sugere que o influxo de ácidos graxos liberados pela adiposidade intra-abdominal na circulação portal seria responsável pela maior síntese de triacilgliceróis (TG), aumento da gliconeogênese hepática e conseqüentemente pela hiperinsulinemia compensatória, e posterior RI (Kahn et al., 1993).

Além disso, pacientes com RCM apresentam acúmulo intramuscular de lipídeos, comprometendo a captação de glicose muscular. Em condições inflamatórias, substâncias como TNF- α e IL-6, são secretadas pelo tecido adiposo, em alto nível, principalmente pelos adipócitos intra-abdominais em indivíduos obesos (Xie et al., 2006). Além da ação dessas substâncias secretadas pelo adipócito, sobre a sensibilidade a insulina, também é possível

observar a influência que exerce sobre os vasos, controle do apetite e dos níveis pressóricos aumentando os riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Portanto, o aumento do consumo calórico provoca o armazenamento dos ácidos graxos que ultrapassando seus limites não conseguem penetrar nas células adiposas e acabam desenvolvendo resistência a insulina, resultando em uma grande quantidade de ácidos graxos e níveis elevados de insulina na corrente sanguínea (Han et al., 2003).

2.7. Interleucina -6 (IL-6)

A Interleucina -6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória, secretada principalmente por adipócitos que apresenta efeito pró-trombótico em respostas agudas e na ação metabólica de carboidratos e lipídios. Ela aumenta a lipólise, inibe a lipase lipoproteica e aumenta a liberação de ácidos graxos livres e glicerol, e redução da expressão do IRS-1 e GLUT-4 no tecido muscular e hepático. Níveis séricos de IL-6 estariam associados com a circunferência da cintura onde pessoas com obesidade central, teriam mais chances de desenvolver a SM devido ao maior estoque de gordura (Rotter et al., 2003). Mulheres com IMC > 28 Kg/m² apresentaram níveis de IL-6 quatro vezes maiores do que mulheres com IMC inferior, levando a um risco relativo quatro vezes maiores para hiperinsulinemia (Miron et al., 2001).

Além disso, sua expressão aumentada parece estar relacionada à supressão de leptina e estimulação da produção de proteína-C reativa (Steensberg et al., 2002). Indivíduos com níveis aumentados de proteína-C reativa, também apresentaram valores aumentados de IL-6, o mesmo acontecendo com indivíduos com doença cardíaca. Isso se torna um indicativo de que níveis aumentados de IL-6 poderiam predizer morbidade em

peças saudáveis e mortalidade em pessoas que apresentassem algum evento cardiovascular (Steensberg et al., 2002).

2.8. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

Semelhante a IL-6 o TNF- α , é uma citocina que age diretamente no adipócito, promovendo indução de apoptose, inibição da lipogênese (via inibição da expressão da lipase lipoprotéica (LLP)), do GLUT-4 e da acetil CoA carboxilase, bem como aumento da lipólise (Arner, 1995; Montague et al., 1998). O TNF- α é secretado por adipócitos, macrófagos, células musculares lisas, esqueléticas e endoteliais. O TNF- α induz apoptose de células espumosas, o que determina aumento do conteúdo necrótico e de lipídios extracelulares no núcleo da lesão (Hsueh e Law, 2003; Winkler et al., 2003). O TNF- α também está envolvido no processo inflamatório da aterogênese, participando da migração de monócitos e sua conversão em macrófagos na parede endotelial. Em humanos obesos, há forte correlação inversa entre TNF- α e metabolismo de glicose, devido à supressão pelo TNF- α da sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação do IRS (1 e 2) e a atividade de PI3K, o que resulta em redução de síntese e translocação do GLUT-4 para a membrana e consequente diminuição na captação de glicose pelas células mediada pela ação da insulina, levando a um quadro de hiperinsulinemia e em último estágio a diabetes tipo 2 (Arner, 1995; Araújo et al., 2007). Dessa forma, alguns autores consideram que a expressão de TNF- α no tecido adiposo possa ser o fator causal na patogênese da obesidade ligada a resistência a insulina (Araújo et al., 2007).

2.9. Tecido adiposo

Nos últimos anos, o tecido adiposo deixou de ser considerado apenas um reservatório de energia para ser reconhecido como órgão com múltiplas funções e papel central na gênese da RI (Mattison & Jesen, 2003).

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilgliceróis (TG) em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar TG em períodos em que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico (Ahima & Flier, 2000).

Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). O adipócito branco maduro armazena os TG em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo e uma fina camada de citosol para a periferia da célula. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que hemáceas, fibroblastos e células do sistema imune, e podem alterar acentuadamente seu tamanho (volume e diâmetro) conforme a quantidade de TAG acumulada. A proporção de lipídios no TAB pode ocupar até 85% da massa total do tecido, sendo o restante da massa representado por água e proteínas (Pond, 2001).

O TAM é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto, participa ativamente na regulação da temperatura corporal. Os depósitos de TAM estão praticamente ausentes em humanos adultos, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos. O adipócito marrom pode atingir 60 μm de diâmetro, sendo, geralmente, muito menor que o adipócito branco que tem um tamanho médio de 90–100 μm . É uma célula caracterizada pela presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, citoplasma

relativamente abundante e núcleo esférico e ligeiramente excêntrico. Apresenta um grande número de mitocôndrias que, por não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de ATP, utilizam a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor (Cannon &, Nedergaard, 2004). Esse processo ocorre porque a proteína desacopladora- 1 (UCP-1, termogenina), uma proteína da membrana mitocondrial interna do adipócito marrom, atua como um canal de próton que descarrega a energia gerada pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso das mitocôndrias durante as reações oxidativas do ciclo de Krebs, desviando esses prótons do complexo F_1F_0 (ATP sintase) e impedindo a síntese de ATP, permitindo que se dissipe em calor a energia estocada na mitocôndria (Cannon &, Nedergaard, 2004). A alta concentração de citocromo oxidase dessas mitocôndrias contribui para a coloração mais escurecida das células e do tecido (Curi et al., 2002).

Além dos adipócitos, o tecido adiposo contém uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) (Penicaud et al., 2000).

O TAB, ao contrário do TAM, apresenta funções mais abrangentes. Por constituir depósitos localizados em diversas regiões do organismo envolvendo, ou mesmo se infiltrando em, órgãos e estruturas internas, o TAB oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, permite um adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares, sem comprometer a integridade e funcionalidade dos mesmos. Além disso, pela distribuição mais abrangente, incluindo derme e tecido subcutâneo, e por ser um excelente isolante térmico, tem papel importante na manutenção da temperatura corporal (Curi et al., 2002).

A elevação da massa adiposa ocorrida na obesidade é determinada pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia). Modificações no tamanho (diâmetro e volume) de adipócitos maduros ocorrem em resposta à ativação de suas ações metabólicas típicas, que são a lipogênese e a lipólise. Entende-se sobre atividade lipogênica todos os processos metabólicos que resultam em biossíntese, incorporação e armazenamento de TG na gotícula de gordura intracitoplasmática, ao passo que atividade lipolítica se refere às ações que resultam na hidrólise do TG armazenado e na liberação de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol. O desenvolvimento da obesidade resulta não só da hipertrofia, mas da hiperplasia das células de gordura. O aumento do tamanho dos adipócitos não é um processo ilimitado. Eventualmente, seu crescimento atinge um grau máximo, além do qual a sua capacidade de armazenamento de gordura se exaure, e novas células são lentamente recrutadas e emergidas desse tecido. Adipócitos muito grandes, além do esgotamento da capacidade de estocagem de gordura, tornam-se mais lipolíticos. Isso pode desencadear aumento na concentração de ácidos graxos livres no plasma e danificar a função de órgãos não adiposos, num processo identificado lipotoxicidade (Defronzo, 2004).

Por muito tempo, acreditou-se que adultos apresentariam número fixo de adipócitos e que mudanças na massa adiposa eram principalmente secundárias a alterações no volume de gordura da célula. Estudos recentes demonstram que adipócitos adultos exibem renovação notavelmente intensa e constante (Spalding et al., 2008), sabe-se ainda que o potencial de gerar novas células persiste durante toda a vida do indivíduo. A hiperplasia do tecido adiposo depende da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, processo esse denominado adipogênese, que é um processo altamente controlado e inclui a atuação de diferentes genes. Desta forma fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o

PPAR γ e C/EBPs desempenham um papel-chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese. (Barish et al., 2006).

2.10. Fator Nuclear kB (NF-kB)

Descoberto em 1986, o NF-kB é um fator nuclear (NF) que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, possui a capacidade de ligar-se a uma sequência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve k das moléculas de anticorpo das células B (kB). O NF-kB é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 (também chamada RelA) e p50. (Baeuerle & Baltimore, 1996) O fator de transcrição NF-kB é conservado na evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados. Essa superioridade deve-se aos variados estímulos que o ativam, bem como aos inúmeros genes e fenômenos que o NF-kB regula, implicados em vários processos celulares, tais como desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular (Siebenlist, 1997). Entre tais genes podemos citar os envolvidos na produção de enzimas, como as óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 induzíveis, a enzima de defesa antioxidante superóxido dismutase, complexos de histocompatibilidade de classe I e II, moléculas de superfície celular, como a molécula 1 de adesão de célula vascular, molécula 1 de adesão de célula intracelular e ainda a produção de citocinas como IL e o TNF- α (O'Neill & Kaltschmidt, 1997).

Quando não estimulado, o fator NF-kB encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória o I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF-kB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I κ B são necessárias para que ocorra a translocação do NF-kB (Figura 3). O I κ B, assim como as subunidades que compõe o NF-kB, pertence à

família de proteínas Rel. Estudos de biologia molecular clonaram genes que codificam oito proteínas da família NF- κ B e sete da família I κ B até o momento. Os subtipos mais estudados de proteínas inibitórias são o I κ B α e o I κ B β , sendo o papel do I κ B α melhor caracterizado. Outras proteínas inibitórias dessa família incluem o I κ B ϵ , I κ B γ e o Bcl-3. A regulação da ativação do I κ B α e do I κ B β é diferente, o que aumenta a complexidade da ativação desse fator nuclear. Vários estímulos tais como TNF- α e IL-6 elevam a fosforilação do I κ B, que é fundamental para sua degradação (Liebermann and Baltimore, 1990). A proteína I κ B fosforilada recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, sendo em seguida degradada pelo complexo proteossoma 26S, isso resulta na liberação do NF- κ B (Figura 3) (O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo, com consequente ligação desse nos genes que apresentam a sequência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, levando a um aumento na expressão do gene alvo. A fosforilação do I κ B ocorre pela ação de proteínas quinase específicas, como o complexo I κ B quinase (IKK), que contém duas subunidades com propriedades de quinase a IKK α e IKK β .²⁶ O complexo IKK é capaz de discernir entre o I κ B complexado e o I κ B livre, explicando o fato do I κ B poder acumular-se nas células onde o IKK permanece ativado, no entanto esse mecanismo ainda não é totalmente elucidado (Siebenlist, 1997; Csehi et al., 2005)

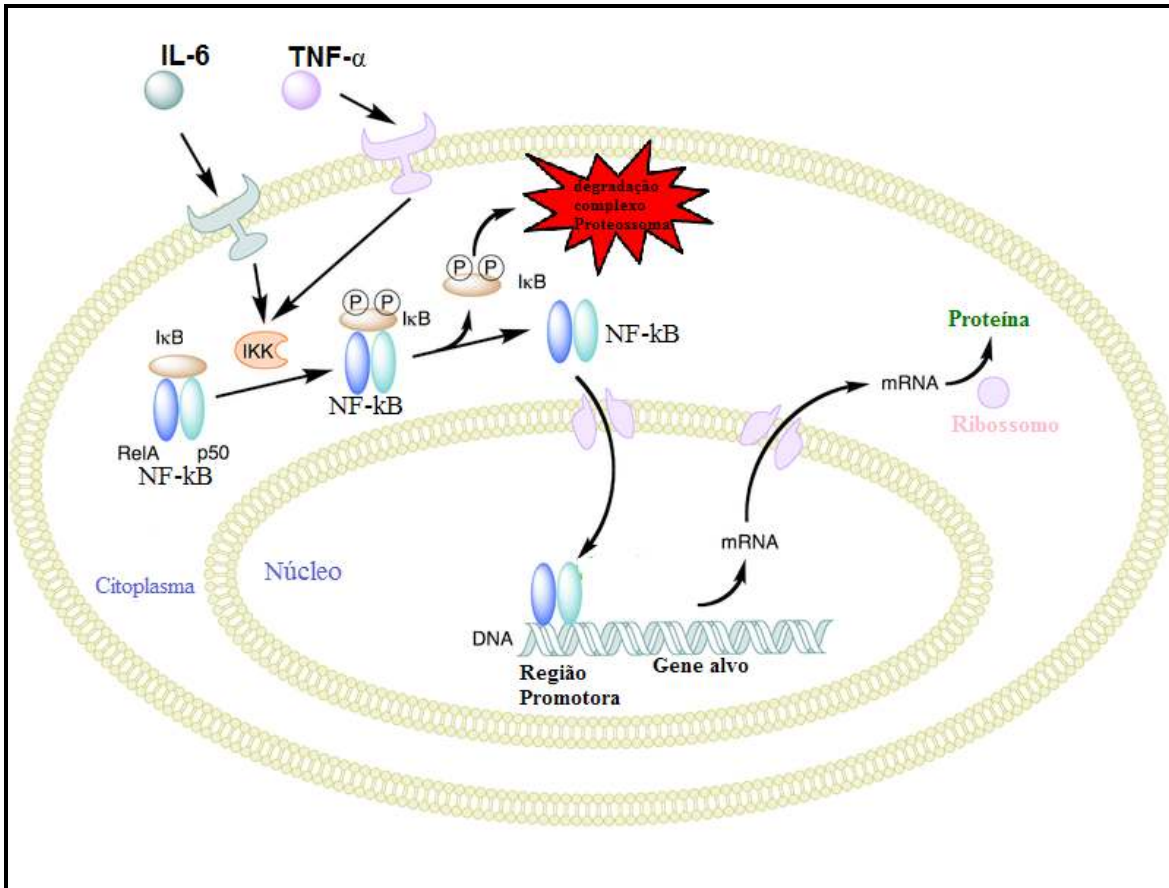


Figura 3: Mecanismo de ativação e translocação nuclear do NF-κB . (modificado de Glimore, 2006)

2.11. Membros da família *Forkhead* (FOX)

A família dos fatores de transcrição *Forkhead* (FOX) compreendem 17 subfamílias e ao menos 41 genes em humanos já foram identificados, além de estarem relacionadas com diversas repostas metabólicas (Puigserver et al., 2003; Samuel et al., 2006; Matsumoto et al., 2007). As proteínas *Forkhead* membros da classe O (FOXO), que contém 110 aminoácidos, são compostas por três alfa-hélices arranjadas em forma eclíptica em torno de uma hélice central, rodeada de alças; esta estrutura é referida como “hélice alada” ou “cabeça em forquilha”. Por esse motivo, as proteínas desta família são tidas como fatores de transcrição “pioneiros”, pois facilitam a ligação de outros fatores transcripcionais (Matsumoto et al., 2007). FOXO1 é a principal isoforma expressa em tecidos como fígado,

adiposo e muscular (Nakae et al., 2001) e está intimamente ligada com a resposta à insulina dos tecidos, devido sua associação com a enzima PI3K e com a fosforilação da via AKT (Accili & Arden, 2004). Em ausência de insulina, a FOXO1 encontra-se no núcleo celular onde participa da transcrição de genes como a G6Pase e PEPCK, que regulam a gliconeogênese. Já na presença de insulina e em resposta da ligação desta ao seu receptor, a proteína AKT quinase, fosforila a FOXO1 e inativa sua atividade transcricional, deixando-a retida no citoplasma (Nakae et al., 2001).

Um estudo conduzido ZHANG et al. (2006), demonstrou que a expressão crônica de FOXO1 no fígado, leva a um aumento da expressão de genes envolvidos na gliconeogênese, resultando em uma elevação do nível de glicose e insulina plasmática. Outro estudo demonstrou que a redução de FOXO1 tanto em fígado como em tecido adiposo branco melhora a tolerância a glicose e a ação periférica da insulina em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Samuel et al., 2006). Recentemente outro estudo mostrou que a inativação gênica específica de FOXO1 no fígado, produz redução dos níveis de glicose, devido a uma redução expressiva na produção de glicose endógena (Matsumoto et al., 2007).

Adicionalmente, este fator de transcrição regula a expressão de apolipoproteínas específicas como a apolipoproteína C-III (ApoC-III), a qual quando secretada pelo fígado, possui habilidade de alterar a atividade da lipase lipoprotéica e o metabolismo lipídico nos tecidos periféricos incluindo o músculo esquelético e o adiposo (Altomonte et al., 2004; Matsumoto et al., 2007).

A FOXO1 também induz a expressão de proteínas que estão envolvidas no controle do ciclo celular, como as proteínas inibidoras de ciclina dependente de quinase (CDKI), tais como p130, p27 e p21, e reduz a expressão de ciclinas da fase G1 (D1 e D2) e da fase G2

(Burgering & Kops, 2002; Furukawa-Hibi et al., 2005), desta forma alguns estudos demonstram que FOXO1 está diretamente relacionado com inibição o processo de adipogênese. (Accili and Taylor, 1991; Miki et al., 2001; Tsen g et al., 2004). Outra proteína desta família de fatores de transcrição que se destaca é a *Forkhead* membro da classe C(FOXC) em especial FOXC2, estritamente expressa no tecido adiposo branco e marrom e está ligada ao processo de adipogênese. Estudos revelam que FOXC2 reduz a acumulação do tecido adiposo branco e expande o tecido adiposo marrom. Além disso, estudos com cultura celular revelam que FOXC2 é capaz de reduzir o processo de adipogênese por inibir a indução de genes alvos do PPAR γ (Gronning et al., 2002; Davis et al., 2004).

2.12. Receptor ativado por Proliferador de Peroxissomas (PPAR)

Os receptores ativados por PPARs pertencem a um subgrupo da superfamília de receptores nucleares, do qual três diferentes tipos foram descritos até o momento: PPAR α , PPAR β e PPAR γ . Embora compartilhem propriedades estruturais comuns, apresentam funções e distribuição diferentes entre os tecidos. O acoplamento de um ligante ao domínio específico do receptor promove a sua dimerização com o receptor do ácido cis-retinoico X (RXR) e sua ligação a sequências específicas do DNA localizadas na região promotora de genes-alvos conhecidas como elementos responsivos ao PPAR (PPREs). Os vários PPARs respondem aos diferentes ligantes com diferentes afinidades pelos PPREs e também interagem com os mais diversos cofatores, incluindo coativadores e correpressores. Os coativadores podem intensificar a transcrição pelo remodelamento da estrutura da cromatina, modificação das caudas das histonas, ou por mudanças na localização do nucleossomo (Hebbar & Archer, 2003). Dentre os coativadores destaca-se o PPAR γ

coativador 1α (PGC- 1α) que pode ser regulado indiretamente pela insulina. Estudos mostram que PGC- 1α , possui a expressão aumentada em órgãos como o cérebro e rim, porém sua expressão é baixa no tecido adiposo branco e no tecido hepático. (Puigserver et al., 1999)

O PPAR α foi o primeiro a ser clonado. Foi descrito em 1990 como um receptor nuclear que se liga a muitos compostos naturais e sintéticos e que induz a proliferação de peroxissomas em roedores (Lacquemant et al., 2000). É expresso principalmente no fígado, músculo esquelético, coração, rim e em baixos níveis no tecido adiposo. Admite-se que essa distribuição tecidual tenha importância na β -oxidação de ácidos graxos (Lacquemant et al., 2000). Tem sido mostrado que a ativação do PPAR α por agonistas específicos pode ser promissora para o tratamento da aterosclerose (Vohl et al., 2000).

O PPAR β também é expresso em muitos tecidos (Flavell et al., 2000), estudos utilizando camundongos *knockout* revelam que esse fator transcricional está envolvido em várias atividades metabólicas, incluindo aumento da termogênese, transporte e oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, coração e tecido adiposo e diminuição da captação de glicose no fígado (Evans et al., 2001).

O PPAR γ foi primeiramente identificado em *Xenopus* e depois em camundongo. Graves e cols. (2000) isolaram o PPAR γ por identificação e clonagem do fator (então denominado ARF6) que controlava a função de um promotor lipo-específico do gene aP2. Com o reconhecimento de que o sítio de ligação no DNA para esse fator era um elemento responsivo a hormônio, eles, então, usaram PCR (reação em cadeia da polimerase) para clonar o fator de ligação, que foi reconhecido como sendo o PPAR γ .

Os genes de PPAR γ , tanto humanos como de camundongos, se estendem por mais de 100 kb de DNA genômico e originam vários mRNAs, PPAR γ 1, PPAR γ 2 e PPAR γ 3, que diferem na porção 5' como consequência do uso diferencial de promotores e de *splicing*. Ao contrário do PPAR γ 1, o qual é amplamente expresso nos diferentes tecidos, a expressão do PPAR γ 2 é restrita ao tecido adiposo (Zhou et al., 2002).

O PPAR γ regula muitos processos biológicos, incluindo o metabolismo lipídico, a homeostase da glicose, inflamação e aterogênese e a adipogênese. Estudos mostram que o PPAR γ participa ativamente no controle do processo inflamatório por reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias com o TNF- α via NF-kB (Chen et al., 2006).

A identificação e a caracterização do PPAR γ foram fundamentais para o entendimento da fisiologia do tecido adiposo. O PPAR γ é reconhecido como o principal fator de transcrição na regulação de genes envolvidos na diferenciação de adipócitos, sendo que tal regulação envolve uma complexa cascata de sinalização coordenada com outras famílias de fatores de transcrição que inclui membros da família do C/EBPs (Spiegelman & Flier, 1996). Com base em estudos em cultura de células, um modelo no qual o tratamento hormonal de pré-adipócitos induz C/EBP, foi desenvolvido. Neste modelo proteínas ligam-se diretamente ao PPAR γ , ativando-o. PPAR γ , sob ação do ligante, induz muitos genes alvos envolvidos na lipogênese e adipogênese e que ativa a expressão do C/EBP α . Este se liga ao sítio do C/EBP no promotor do PPAR γ . Desta forma conclui-se que o PPAR γ é suficiente e necessário para a diferenciação da célula adiposa. A sua expressão em células que não expressam C/EBP- α promove diferenciação normal do adipócito. Por outro lado, C/EBP- α não possui a habilidade de promover a adipogênese na ausência do PPAR γ (Schoonjans et al., 1996).

2.13. Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBPs)

A família dos fatores de transcrição C/EBP também desempenham um importante papel na diferenciação do adipócito. Os C/EBPs são membros da família b-zip (domínio básico de ligação do DNA), que contém um domínio *zipper* de leucina necessário para a dimerização. As isoformas do C/EBP (α , β e δ) são altamente expressas no adipócito e são induzidas durante a adipogênese. O C/EBP- α tem um papel importante na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos e atua na conversão de fibroblastos em adipócitos. Além disso, estudos mostram que C/EBP- α atua no processo de gliconeogênese e o no acúmulo de glicogênio no tecido hepático, estes achados indicam ainda que C/EBP- α atua sinergicamente com FOXO1 e reduz diretamente a expressão de genes como PEPCK e G6Pase (Nerlov, 2007). Existem duas diferentes isoformas de C/EBP- α denominadas p30 e p42, respectivamente, sendo esta última um transativador mais potente (Gomis et al., 2006). O C/EBP- β possui três diferentes isoformas (*liver-enriched activating protein* (LAP), LAP*, e *liver-enriched inhibiting protein* (LIP)) e também induz adipogênese, possivelmente por estimular a expressão do PPAR γ , cujo gene contém sítios C/EBP na sua região promotora. Foi demonstrado que o PPAR γ é um potente estimulante da cascata de diferenciação celular do adipócito e atua sinergisticamente com C/EBP- α para promovê-la ou para induzir a diferenciação de fibroblastos em adipócitos (Ross et al., 1999). Além desses fatores de transcrição que constituem o centro de transcrição controlador da adipogênese, outros fatores de transcrição como o a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) tem mostrado importância na diferenciação do adipócito (Nerlov, 2007).

2.14. Proteína ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP)

As SREBPs ativam transcricionalmente uma cascata de enzimas necessárias para processos relacionados ao aumento de genes lipogênicos, síntese de ácidos graxos, acúmulo de triacilgliceróis e síntese de fosfolídeos. Uma vez translocada para o núcleo as SREBPs promovem a expressão de diversos genes ligados a colesterogênese e lipogênese, sendo considerado por alguns autores como o maior regulador nesses processos (Amemiya-Kudo et al., 2002).

A proteína SREBP foi clonada originalmente do tecido adiposo de rato, é do tipo hélice-alça-hélice básico (bHLH), contém uma região que forma um *zipper* de leucina com importante papel na adipogênese, na sensibilidade insulínica e na homeostase dos ácidos graxos (Osborne, 2000). A família do SREBP é composta de dois membros: o SREBP-1 e o SREBP-2. Contudo, existem duas isoformas do SREBP-1 (SREBP-1a e SREBP-1c), derivadas do *splicing* alternativo do primeiro éxon dentro do mesmo transcrito primário. As SREBPs -1a e -1c são controlados independentemente por regiões regulatórias que parecem responder diferentemente a fatores orgânicos e metabólicos específicos. O SREBP-1c é predominantemente expresso em fígado, tecido adiposo, músculo esquelético e glândula adrenal, enquanto o SREBP-1a é expresso no baço e intestino. Os Fatores de transcrição SREBP desempenham um papel fundamental na homeostase energética através da regulação da lipogênese e colesterogenesis (Amemiya-Kudo et al., 2002).

As SREBPs foram associadas a doenças metabólicas como obesidade, diabetes tipo 2, dislipidemias e RCM. As SREBPs ativam diretamente a expressão de aproximadamente 30 genes que se dedicam à síntese e captação de colesterol, ácido graxo, triglicérides e fosfolípidos, assim como a de NADPH um cofator requerido para a síntese dessas moléculas (Tontonoz & Mangelsdorf, 2003). O principal papel do SREBP-2 é controlar a

biossíntese de colesterol. A SREBP-1c aumenta preferencialmente a transcrição de genes envolvidos na síntese de ácido graxo, entre eles a acetil CoA carboxilase (ACC), que converte a acetil CoA em malonil CoA e a ácido graxo sintetase (FAS), que converte a malonil CoA em palmitato. (Chen et al., 2004). O principal sinal metabólico que estimula e regula a SREBP-1c é a insulina, enquanto o glucagon a reprime (Edwards et al., 2000). A insulina, cuja liberação é estimulada por altos níveis de glicose no sangue, induz a produção de ácidos graxos no fígado e no tecido adiposo. A maioria dos efeitos lipogênicos da insulina são dependentes da expressão de SREBP-1c e a subsequente estimulação da via de síntese dos ácidos graxos (Desvergne et al., 2006). A expressão de SREBP-1c também é estimulada pelo LXR (receptor X do fígado), através de dois sítios de ligação presentes no promotor da síntese de SREBP-1c. O papel primário do LXR é controlar e proteger as células contra sobrecargas de colesterol. Assim, a razão pela qual o LXR atua paralelamente ao aumento da síntese de ácidos graxos através da regulação transcricional de SREBP-1c ainda não está clara (Desvergne et al., 2006). Uma hipótese é a de que o transporte sanguíneo e armazenamento celular do excesso de colesterol requeiram a formação de éster colesterolil. Isso aumentaria a demanda para a produção de oleato, que é realmente estimulado através da superestimulação da expressão da SREBP-1c (Repa et al., 2000). *In vivo*, a quantidade total de SREBP-1c em fígado é reduzida pelo jejum, que suprime a secreção de insulina, e aumenta com a alimentação (Schultz et al., 2000).

Muitos indivíduos com obesidade e resistência à insulina apresentam esteatose hepática. As evidências indicam que a esteatose hepática da resistência à insulina é causada pelo acúmulo de SREBP-1c, que está elevada em resposta aos altos níveis circulantes de insulina. De maneira semelhante, os níveis de SREBP-1c estão elevados no fígado de camundongos ob/ob (Elam, 2002). Apesar da presença de resistência à insulina nos tecidos

periféricos, a insulina continua a ativar a transcrição do SREBP-1c no fígado desses camundongos. O nível elevado de SREBP-1c nuclear aumenta a expressão de genes lipogênicos, a síntese de ácido graxo e o acúmulo de triglicérides (Scott et al., 2003).

2.15. Adipogênese

Os estudos sobre o processo de diferenciação do tecido adiposo, fenômeno denominado de adipogênese, têm sido extensivamente realizados em modelos *ex vivo*, com o intuito de desvendar a base molecular e celular do desenvolvimento do tecido adiposo e o seu comprometimento em estados fisiológicos e patológicos, de modo a permitir a formulação de estratégias terapêuticas e preventivas do excesso de tecido adiposo (obesidade) e de sua escassez (lipodistrofias e lipoatrofias). O modelo mais bem caracterizado para adipogênese utiliza pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1 (células oriundas de embriões de camundongos *Swiss* extraídas prematuramente). O emprego de coquetéis indutores constituídos classicamente por insulina, dexametasona (DEX), isobutilmetilxantina (IBMX) e soro bovino fetal (FBS) desencadeiam o processo de adipogênese (Ntambi & Young-Cheul, 2000).

Os adipócitos provêm de células-tronco mesenquimais multipotentes, residentes no estroma do tecido adiposo. Essas células multipotentes tornam-se pré-adipócitos quando perdem a habilidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais e tornam-se “comprometidas” com a linhagem adipocitária. Essa fase inicial da diferenciação do adipócito, ainda pouco caracterizada, é conhecida como determinação ou comprometimento. A segunda fase da adipogênese é a diferenciação terminal, onde os pré-adipócitos adquirem as características de adipócitos maduros, acumulando gotas lipídicas e a habilidade de responder a hormônios como a insulina (Ailhaud & Hauner, 2004).

A diferenciação dessas células compreende estágios precisamente controlados: parada do ciclo celular, expansão clonal e diferenciação (eventos iniciais, intermediários e terminais), por meio da ativação de centenas de genes anteriormente silenciosos. A exposição de uma placa de pré-adipócitos 3T3-L1 confluentes ao coquetel adipogênico ativa receptores de glicocorticoides (pela DEX), receptor de IGF-1 (pela insulina) e a via de sinalização do cAMP (AMP cíclico) (pelo IBMX, um inibidor de fosfodiesterases), o que leva à ativação dos eventos iniciais representados pela expressão das proteínas C/EBP- β e C/EBP- δ (Ntamb & Young-Cheul, 2000). As células, então, reiniciam o ciclo celular, sofrem divisão celular de forma regulada (expansão clonal), saem permanentemente do processo de ciclo celular e entram em diferenciação terminal por ativação do PPAR γ e C/EBP- α , os dois reguladores centrais do processo adipogênico (Farmer, 2006).

Após a adição do coquetel indutor, ocorre a expressão de c-fos, c-jun e myc, que são coletivamente chamados de fatores de transcrição da família de proteínas ativadoras 1 (AP-1), que dão início à mitose pós-confluente, importante para que ocorra o desenovelamento das hélices de DNA, permitindo o acesso de fatores de transcrição a elementos responsivos presentes em genes-alvos envolvidos na modulação do fenótipo do adipócito maduro (Spalding et al., 2008).

Os C/EBP- β e - δ são os primeiros fatores de transcrição induzidos após a exposição das células ao coquetel de diferenciação, de forma que é postulado o fato de estarem diretamente envolvidos no processo de diferenciação, em resposta a indutores hormonais. A expressão do C/EBP- δ cessa após 48 horas, enquanto que o declínio do C/EBP- β é mais gradual por volta do oitavo dia após-diferenciação. C/EBP- β e C/EBP- δ ativam a expressão de PPAR γ , que é transcricionalmente induzida durante o segundo dia pós-indução da diferenciação, sendo máxima por volta do terceiro ou quarto dia (Schopfer et al., 2005).

C/EBP- β e C/EBP- δ também induzem a expressão de C/EBP- α , que chega a expressão máxima entre o quarto e o quinto dia da diferenciação. Uma vez ativados os reguladores centrais da adipogênese, C/EBP- α e PPAR γ , estes se autorregulam positivamente para se manter expressos, ou seja, realizam um *feedback loop* positivo induzindo sua própria expressão, apesar da redução da expressão de C/EBP- β e - δ (Figura 5). C/EBP- α e PPAR γ , induzem a transcrição de muitos de genes-alvos anteriormente silenciosos, incluindo enzimas e proteínas envolvidas na geração e na manutenção do fenótipo do adipócito, como aquelas envolvidas no transporte de glicose sensível à insulina, lipogênese, lipólise e síntese e secreção de adipocinas (Wu et al., 1999). Os dois fatores são críticos e decisivos para os estágios finais de diferenciação, e atuam de maneira cooperativa e sinérgica, mas não são expressos em altos níveis nos pré-adipócitos e não estão envolvidos no desenvolvimento inicial. Alguns estudos apontam a SREBP-1c como importante na adipogênese devido a produção de ligantes endógenos para o PPAR γ , aumentando desta forma a atividade transcricional do mesmo, elevando conseqüentemente a proporção de células submetidas ao processo de diferenciação terminal (Tontonoz et al., 1993) (Figura 4).

Além desses fatores de transcrição adipogênicos, uma série de proteínas do ciclo celular estão envolvidas na diferenciação dos adipócitos. Logo após o estímulo indutor, há um aumento na expressão de ciclinas dependentes de quinase (CDK) da fase G1 do ciclo celular, bem como uma redução de proteínas inibidoras de CDK (CDKI) (p130, p27 e p21). Esses eventos são essenciais para que ocorra a progressão da fase G1 para fase de síntese de DNA (fase S) do ciclo celular (Morrison e Farmer, 1999; Tang et al., 2003). Estudos realizados na presença de indutores de diferenciação como a insulina, mostram que FOXO1 se transloca do núcleo para o citoplasma, reduzindo desta forma sua ação em proteínas CDKI, em especial a p21 favorecendo assim o processo de diferenciação (Nakae et

al.,2003). Além disso, estudos mostram que FOXO1 tem a capacidade de se ligar e reprimir a atividade do fator de transcrição PPAR γ inibindo desta forma o processo de maturação final do adipócito. (Figura 4)

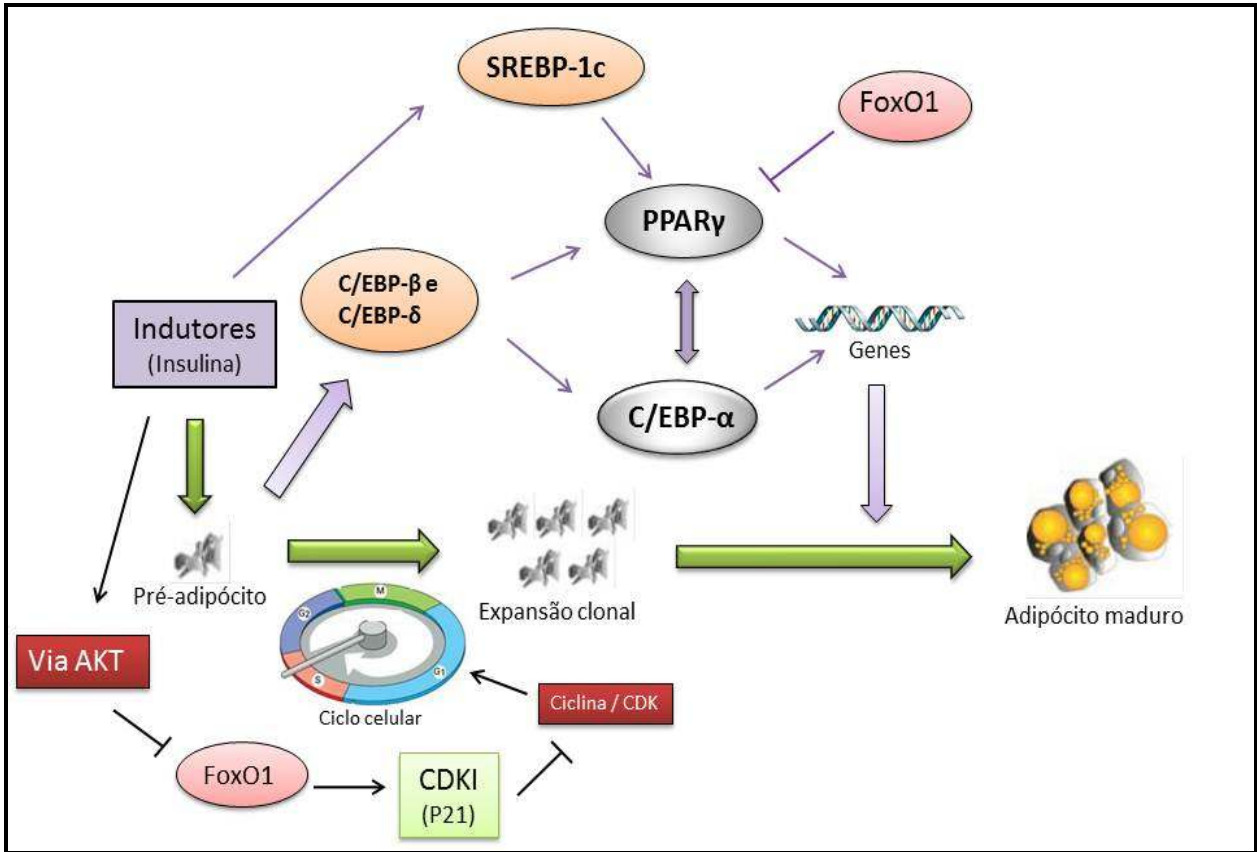


Figura 4: Processo de adipogênese, com os principais fatores de transcrição envolvidos.

2.16. Outras vias envolvidas na adipogênese

Como sabemos os fatores de transcrição induzem a transcrição de muitos genes envolvidos na geração e na manutenção do fenótipo do adipócito. Identificar elementos que atuam na expressão C/EBP- β e C/EBP- δ assim como nos seus efeitos cooperativos específicos, podem nos fornecer informações sobre a fase de diferenciação do pré-adipócito. Estudos de Klemm e Lane (2004) fornecem evidências convincentes de que a proteína de ligação do elemento responsivo a cAMP (CREB), é ativada no início do

processo de adipogênese em cultura de células 3T3-L1, e participa na indução da expressão de C/EBP- β (Zhang et al., 2004b). Esta observação é consistente com estudos anteriores mostrando um papel para a sinalização cAMP no controle da expressão de C/EBP- β (Cao et al., 1991) e também explica a necessidade de indutores de cAMP como o IBMX em coquetéis indutores utilizados na adipogênese. Já a expressão de C/EBP- δ é induzida por glicocorticoides como DEX e pelo próprio C/EBP- β (Cao et al., 1991). A elevação celular da concentração de cAMP tem sido associada com as etapas iniciais do programa de diferenciação do pré-adipócito que envolvem a indução de C/EBP e a supressão da via de sinalização *Wingless type* (WNT). (Krishnan et al., 2006).

2.17. Wingless type (WNT)

A via WNT secreta diferentes proteínas ricas em cisteína, que podem atuar de maneira autócrina e parácrina influenciando no desenvolvimento de diferentes tipos celulares. As proteínas WNTs podem inibir a diferenciação do pré-adipócito através de mecanismos dependentes ou não de uma unidade do complexo proteico de caderina (β -catenina). Evidências genéticas apontam que β -catenina é um importante regulador do processo de adipogênese (Arango et al., 2005). A sinalização é iniciada pela ligação da WNT a duas moléculas receptoras, proteínas *frizzled* (SFRP) e os receptores de lipoproteínas (LRP), estes por sua vez na via dependente de β -catenina inibem a enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), resultando na hipofosforilação e subsequente translocação de β -catenina do citoplasma em direção ao núcleo (Figura 6), onde ela se liga a fatores de transcrição *T-cell factor/lymphoid-enhancing factor* (TCF/LEF), dentre este destaca-se TCF7L2 conhecido também como TCF4 que atua reprimindo a expressão de C/EBP- α e PPAR γ e mantendo a expressão de CDKI p21 e p27, inibindo desta forma o

processo de adipogênese (Ross et al., 2000; Ross et al., 2002; Bennett et al., 2002) (Figura 5).

Diferentes estudos de coorte tem mostrado relação entre polimorfismos de TCF7L2 e o desenvolvimento de Diabetes tipo 2 em diferentes populações (Kanazawa et al., 2004; Grant et al., 2006). O mecanismo pelo qual modificações em TCF7L2 se relaciona com o surgimento de diabetes tipo 2 ainda são desconhecidos. No entanto é proposto que a sinalização via WNT através de TCF7L2 ativa *glucagon like peptide 1* (GLP-1) que atua nas células β pancreáticas (Yi et al., 2005). De fato a redução na secreção de insulina é observada em indivíduos que apresentam polimorfismos ou deficiência em TCF7L2, ratificando desta forma essa hipótese (Saxena et al., 2006).

As proteínas WNT1, WNT3a e WNT10b assim como as proteínas receptoras *frizzled* SFRP1 e SFRP5 e os receptores de lipoproteínas LRP5 e LRP6, tem sido associadas com a sinalização através da via β -catenina. Já as proteínas WNT5 e WNT11 e os receptores SFRP2 e SFRP7 atuam no mecanismo de sinalização independente de β -catenina (Rosen & MacDougald, 2006). A expressão de WNT10b é alta no pré- adipócito, mas cai rapidamente durante a diferenciação (Ross et al., 2000). Alguns pesquisadores mostram que outros fatores de transcrição como as proteínas pertencentes a família GATA e a família Kruppel-like factors (KLF) também atuam na expressão C/EBP e/ou PPAR γ influenciando desta forma no processo da diferenciação final do adipócito (Tong, 2005; Wu et al., 2005).

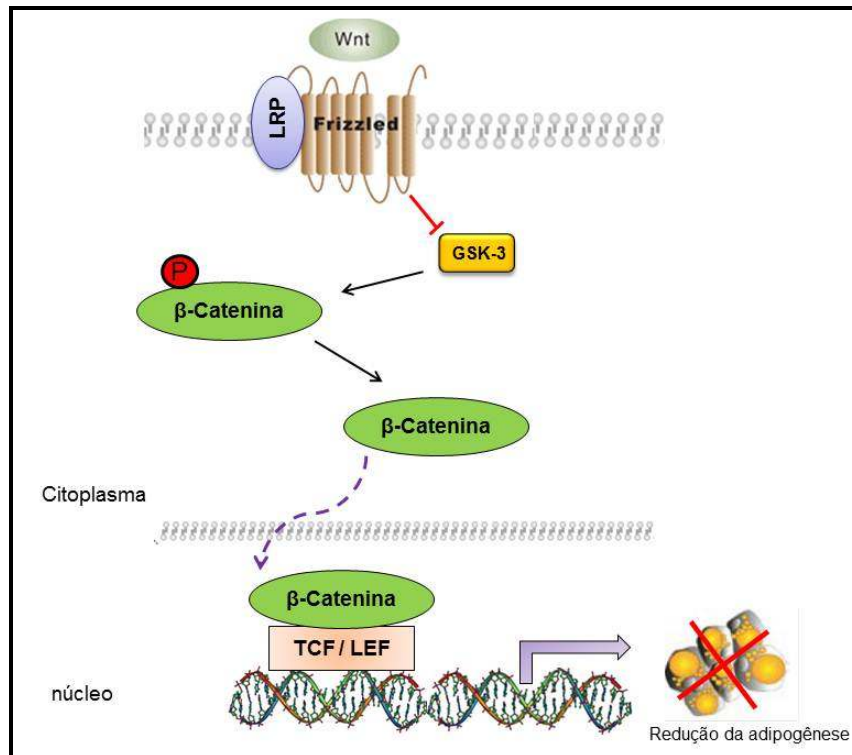


Figura 5: Via de sinalização WNT com translocação nuclear de β -catenina

2.18. GATA

A família de fatores de transcrição GATA é conservada evolutivamente e desempenham papéis importantes na diferenciação e desenvolvimento de todos os organismos eucarióticos (Weiss & Orkin, 1995). Nos vertebrados a família é composta por seis membros, definidos como GATA-1 à GATA-6, que podem ser separados conforme sua atuação. Todas as proteínas GATA contêm um domínio de ligação conservado no DNA, composto por dois multifuncionais *zinc fingers* e uma proteína de interação, além de outros elementos cofatores.

As proteínas de ligação GATA-2 e GATA-3 são expressas nos pré-adipócitos e controlam a diferenciação deste em adipócito maduro. Estudos recentes mostram que a expressão de GATA-2 e GATA-3 suprime a diferenciação dos adipócitos, o mecanismo envolve sua direta atuação em C/EBP- α e PPAR γ reprimindo a expressão dos mesmos

(Tong, 2005). Além disso, há evidências que GATA-2 é fosforilado e bloqueado via sinalização PI3K/AKT na presença insulina, demonstrando a similaridade desta via de ação com a do FOXO1.(menghenbi, 2005).

2.19. *Kruppel-like zinc fingers* (KLFs)

Os fatores de transcrição *Kruppel-like zinc finger* (KLFs) são conhecidos por atuar em diversas vias no desenvolvimento e na diferenciação celular. As proteínas KLF possuem três domínios *zinc fingers* próximo a sua região C terminal (Suske et al., 2005), que se relacionam com elementos promotores e acentuadores da transcrição. Embora as proteínas KLFs compartilhem domínios similares, suas regiões N-terminal são altamente variáveis, exibindo desta forma diferentes funções moleculares, com algumas operando principalmente na ativação gênica enquanto outras atuam na repressão da transcrição. Recentemente, uma combinação de estudos celulares e experimentos de *knockout* mostraram que diferentes proteínas KLF atuam na adipogênese (Mori et al., 2005).

Dentre as proteínas KLF a proteína KLF-2 é a mais expressa em pré-adipócitos caindo sua expressão durante as etapas de diferenciação (Wu et al., 2005). É bem caracterizado em modelos utilizando 3T3-L1, que KLF-2 apresenta-se como um inibidor de adipogênese através da inibição de PPAR γ . (Banerjee et al., 2003) Já a proteína KLF-5 produz um efeito contrário, ou seja, ela promove a adipogênese. Estudos mostram que ela é expressa durante a diferenciação e induz a expressão de PPAR γ . (Mori et al., 2005). A KLF-4 também está envolvida na promoção do processo de adipogênico, porém esta atua nas etapas iniciais da diferenciação promovendo a expressão de C/EBP- β (Birsoy et al., 2008). A KLF-6 promove o processo de adipogênese através da inibição da proteína *Delta-like protein 1* (DLK-1). (Li et al., 2005).

2.20. *Delta like protein 1 (DLK-1)*

A DLK-1 também conhecida como fator pré-adipócito 1 (pref-1) é altamente expressa em pré-adipócitos, mas decai durante o processo de diferenciação e é praticamente ausente no adipócito maduro, devido a este quadro muitos a utilizam como marcado para pré-adipócitos. (Gustafson & Smith, 2006). A sua expressão é inibida por agentes específico do coquetel indutor da diferenciação, como a DEX, que atua promovendo a expressão de C/EBP- δ e reprime DLK-1 (Pantoja et al., 2008). A DLK-1 é sintetizada como uma proteína de 385 aminoácidos contendo uma sequencia N terminal, tem ainda como característica marcante a presença de seis domínios extracelulares em *tandem* do fator de crescimento epidérmico (EGF), que atuam como sinais para a proliferação e diferenciação celular. No entanto a DLK-1 não possui conservado os resíduos de aminoácidos necessários para a ligação ao receptor EGF. Em vez disso, ela possui características estruturais com outra classe de EGF sinalizadora, conhecida como Notch/Delta/Serrate family, que de fato estão envolvidas na sinalização celular de DLK-1 (Kopan & Ilagan, 2009).

2.21. Balanço energético

Diante do que foi exposto fica claro que diferentes genes e fatores de transcrição estão intimamente ligados ao processo de adipogênese e que a obesidade não é uma condição singular, e sim um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas que, em última análise, refletem no fenótipo obeso (Jebb, 1999).

O balanço energético positivo, que ocorre quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, é um fator importante para o desenvolvimento da obesidade, promovendo aumento nos estoques de energia e peso corporal (Pereira et al., 1999a). A tendência secular no aumento da obesidade parece ocorrer paralelamente à redução na prática de atividade

física e aumento no sedentarismo (Martinez, 2000). Além disso, uma redução natural no gasto energético é observada com a modernização, ocasionando estilo de vida mais sedentário com transporte motorizado, equipamentos mecanizados que diminuem o esforço físico de homens e mulheres tanto no trabalho como em casa (WHO, 1998). Deste modo, o sedentarismo e os hábitos nutricionais parecem representar o principal fator de risco no desenvolvimento da obesidade mundial (Pereira et al., 1999b).

Atualmente, diversas estratégias são utilizadas visando à redução de peso corporal, como o uso de suplementos alimentares naturais contendo extratos de: *Ephedra sinica*, *Paullinia cupana*, *Plantago psyllium*, *Cecropia obtusifolia*, *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis* (Andersen & Fogh, 2001; Pittler et al., 2005; Nicasio et al., 2005; Fallon et al., 2008).

2.22. *Ilex paraguariensis* (erva-mate)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta nativa da América do Sul crescendo naturalmente em países como a Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (Heck & Mejia, 2007). O consumo de bebidas a base de erva-mate remonta centenas de anos.

A maior parte da erva-mate produzida na América do Sul destina-se ao consumo na forma de chimarrão, no entanto, o mercado para bebidas a base de chá-mate tem crescido a cada ano, seja pelos benefícios à saúde que começam a ser veiculados pela mídia seja pelo lançamento de novos produtos com maior aceitação pelo público, como as bebidas prontas para beber aromatizadas com aroma natural de frutas (maçã, pêsego) (Esmelindro et al., 2002 e Bastos & Torres, 2003). A erva-mate também pode ser consumida sob outras formas, como o tererê que constitui a bebida obtida pela maceração da erva em água fria ou gelada, forma como é ingerida, principalmente na região centro-oeste do Brasil ou ainda

sob a forma de chá-mate, sendo essa bebida produzida a partir da infusão da erva-mate que sofreu processo de torrefação (Bastos & Torres, 2003).

O processo de torrefação leva a modificações importantes em produtos de origem vegetal devido à degradação térmica progressiva, como a perda de nutrientes, assim como a possível diminuição do teor de polifenólicos. Contudo, este efeito pode ser minimizado pela formação de produtos antioxidantes da reação de Maillard, tais como as melanoidinas, que possuem uma forte atividade antioxidante, atuando como captadores de metais pesados e promovendo a decomposição de hidroperóxidos. Essas mudanças refletem-se na atividade antioxidante desses produtos (Manzocco et al. 2001; Bastos & Torres 2003).

A *Ilex paraguariensis* é utilizada na medicina popular e recomendada por herboristas para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. Devido a estas propriedades, a erva-mate encontra-se inclusive em importantes farmacopéias como a Martingdale e a *British Herbal Pharmacopeia*. (Anesini et al., 2006).

Os principais compostos bioativos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos podemos citar a cafeína, a teobromina e a teofilina (Alikaridis, 1987), componentes de reconhecida ação sobre o sistema nervoso central, aos quais é atribuída a ação estimulante do mate. (Figura 6)

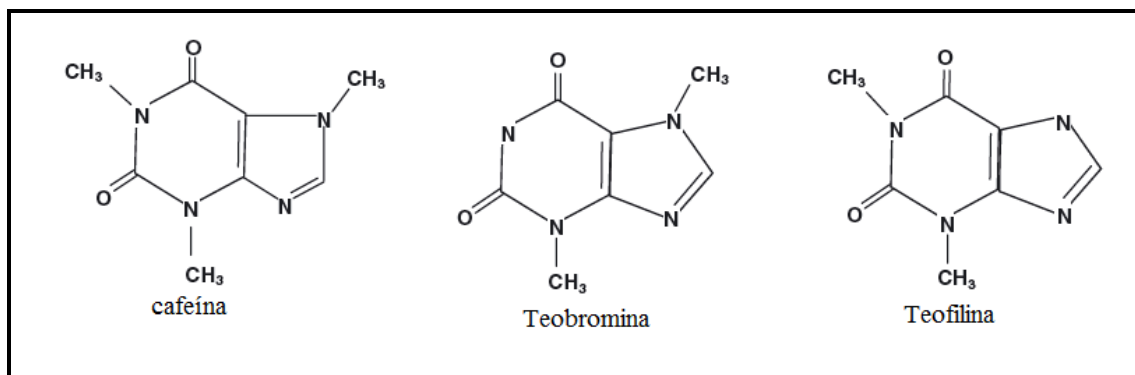


Figura 6: Compostos Bioativos presentes na erva-mate. (Heck & Mejia, 2007)

Dentre a classe de saponinas encontram-se tripenóides como as gliconas, os ácidos ursólico e oleanólico (Gnoatto et al., 2007), tais substâncias são responsáveis pelo amargor e espuma do mate, além de outras propriedades biológicas (Gnoatto et al., 2007). Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico (ACG) e seus isômeros (Figura 7), aos quais se atribui diferentes ações do produto (Clifford, 1990; Cardozo-Junior et al., 2007; Bastos et al., 2007). Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e a cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (Ricco et al., 1991; Carini et al., 1998; Filip et al., 2001).

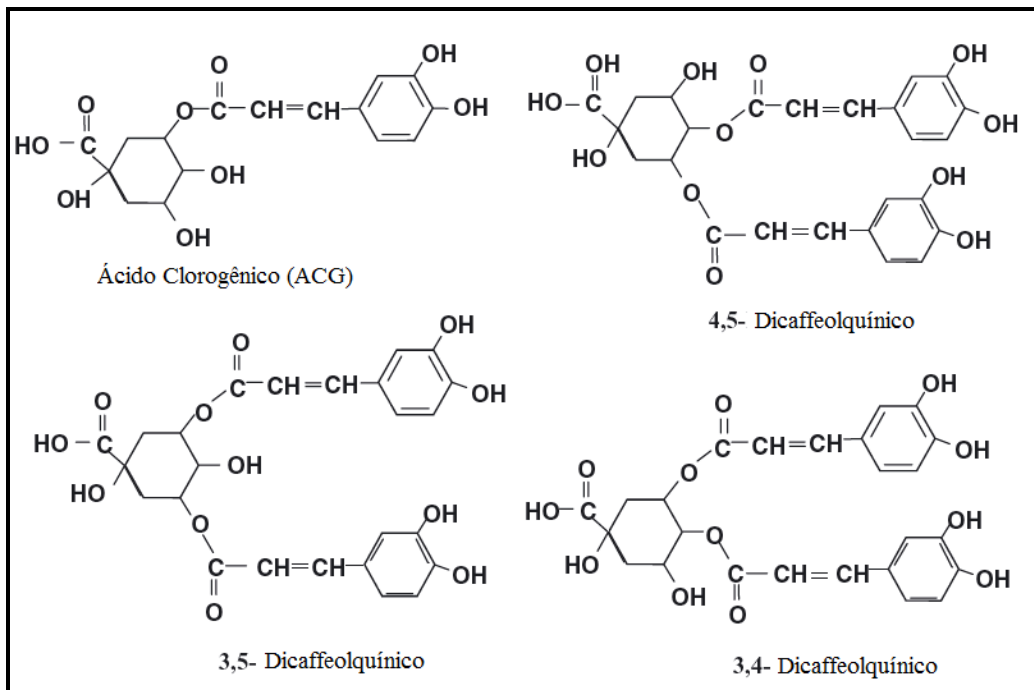


Figura 7: cafeoilquínicos - ácido clorogênico (ACG) e seus isômeros. (Heck & Mejia, 2007)

O interesse no potencial uso da erva-mate para a promoção de saúde é relativamente recente. Em meados da década de 90 foram publicados os primeiros trabalhos que demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de infusões de erva-mate verde e

seca (chimarrão) (Gugliucci e Stahl, 1995; Gugliucci, 1996; Campos et al., 1996). No estudo realizado por BASTOS et al. (2007), os extratos de erva-mate verde e tostada apresentaram atividade antioxidante *in vitro* superior à do chá-verde (*Camelia sinensis*). Outras pesquisas demonstraram que a erva-mate apresentava atividade antioxidante equivalente ou superior à vitamina C e a vitamina E, substâncias consideradas como padrão para essa propriedade (Laranjinha et al., 1994; Vinson e Dabbagh, 1998; Schinella et al., 2000; Gugliucci & Menini, 2002 e Chandra & Mejia, 2004).

Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa mostra o efeito benéfico do uso de erva-mate no combate ao stress oxidativo e oxidação da LDL em humanos (Arçari et al., 2011). Outros resultados publicados a partir de ensaios com infusões da erva-mate demonstraram alguns dos efeitos farmacológicos atribuídos a esta planta: efeito colerético e de motilidade intestinal (Gorzalczany et al., 2001); inibição da glicação, reação na qual açúcares reagem com proteínas e lipídeos plasmáticos que se acumulam formando locais propícios à formação de radicais livres (Lunceford & Gugliucci, 2005); ação hipocolesterolêmica (Stein et al., 2005) efeito vasodilatador e vasorelaxante (Baisch et al., 1998; Stein et al., 2005); atuação na progressão da aterosclerose (Mosimann et al., 2006). Trabalhos sobre as alterações na estrutura e no sistema de reparo do DNA, sugerem que o consumo de erva-mate poderia contribuir para prevenção da aterosclerose e câncer (Filip et al., 2000; Gugliucci & Menini, 2002; Bracesco et al., 2003; Ramirez-Mares et al., 2004; Bastos et al., 2006; Menini et al., 2007). Esses achados são condizentes com um estudo realizado por nosso grupo (Miranda et al., 2008) que mostrou uma grande capacidade da erva-mate em atuar no sistema de reparo e proteger o DNA contra danos oxidativos. Outro estudo do nosso grupo indica que o uso de erva-mate foi capaz de melhorar o quadro de algumas condições associadas à obesidade como dislipidemia, redução de peso, resistência

à insulina e ainda modificar a expressão de diversas citocinas TNF- α , IL-6, PAI-1, leptina, angiotensina, adiponectina, PPAR- γ e *uncoupling protein-1* (UCP-1) no tecido adiposo (Arçari et al., 2009). Diante desses achados fica evidente que a erva-mate possui eficácia em diferentes mecanismos relacionados com diferentes patologias, tanto em trabalhos realizados *in vitro* assim como os efetuados *in vivo*.

3. JUSTIFICATIVA

A obesidade é um problema de saúde pública, principalmente pelo fato desta estar associada ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas o que gera inúmeros gastos ao sistema público de saúde. Apesar da complexidade da pesquisa em doenças crônicas, as ferramentas de biologia molecular oferecem a melhor expectativa para a compreensão os processos moleculares que mantêm a saúde e previnem o desenvolvimento de doenças. Estudos recentes mostram que fatores de transcrição desempenham um importante papel na cascata transcricional que ocorre durante o processo de adipogênese e no mecanismo de ação da insulina.

A erva-mate é amplamente consumida na América do Sul e diversas pesquisas apontam para os benefícios que as bebidas a base de erva-mate propiciam à saúde, por sua atividade antioxidante; antiinflamatória; imunomodulatória e anticancerígena. As xantinas, cafeína, teobromina, teofilina, saponinas e os compostos fenólicos como ácido cafeico e seus derivados, principalmente os ácidos clorogênicos são responsáveis por vários dos efeitos citados. Muito embora diversos estudos destaquem as funções biológicas da erva-mate, pouco se sabe sobre a sua capacidade de modulação dos fatores de transcrição que regulam a expressão de genes ligados à adipogênese e seu efeito na via de sinalização da insulina. Considerando que a obesidade é um grave problema de saúde pública e tendo em vista os resultados descritos na literatura bem como os obtidos por nosso grupo, acredita-se que a ingestão de erva-mate poderia atuar nos fatores de transcrição, modulando a sinalização celular e alterando expressão de genes e proteínas envolvidos na obesidade assim como influenciar a via de sinalização da insulina.

Deste modo, torna-se importante avaliar a ação da erva-mate tostada e de alguns dos seus constituintes bioativos (ácido clorogênico, quercetina e rutina) na modulação dos fatores de transcrição gênica que regulam a expressão de genes relacionados à adipogênese assim como avaliar sua influência na via de sinalização da insulina.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a ação do extrato aquoso de erva-mate tostado no processo de adipogênese e sua ação nos mecanismos de sinalização da insulina.

4.2. Objetivos específicos

Modelo de obesidade induzido por dieta:

- Avaliar em tecido hepático os efeitos da erva-mate tostada na translocação nuclear dos fatores de transcrição NF-kB, FOXO1, PPAR γ e C/EBP- α ;
- Verificar no tecido hepático os efeitos da erva-mate tostada na modulação da expressão proteica de IRS-1, IRS-2 e AKT (proteína quinase B (PKB));
- Avaliar a ação da erva-mate tostada na modulação da expressão gênica associada com a sinalização da insulina no tecido hepático e na expressão gênica relacionada com o processo de adipogênese no tecido adiposo.

Cultura de Células 3T3-L1:

- Verificar a ação da erva-mate tostada e de alguns de seus constituintes bioativos (ácido clorogênico, quercetina e rutina) na diferenciação e maturação dos adipócitos.
- Avaliar a modulação da expressão gênica da erva-mate e dos seus constituintes bioativos supra-citados no processo de diferenciação dos adipócitos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Preparo do extrato aquoso e padrões

O extrato tostado de erva-mate administrado aos animais foi o liofilizado (Leão Jr. Curitiba, Paraná), eluído em água destilada na temperatura ambiente. Trabalhos recentes do nosso grupo (Martins et al., 2008; Miranda et al., 2008; Oliveira et al., 2008) indicam resultados mais expressivos utilizando-se intervenções com erva-mate na concentração de 1g de erva-mate por quilo corpóreo, deste modo os experimentos do presente projeto foram realizados com a dose de 1,0 g/Kg.

O extrato usado continha $348,80 \pm 16,35$ mg/g de compostos fenólicos, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. Além disso, determinamos por HPLC os níveis de ácido 5-O-cafeoilquínico ($32,25 \pm 0,50$ mg/g), cafeína ($5,82 \pm 0,17$ mg/g), ácido cafeico ($0,58 \pm 0,01$ mg/g) e teobromina ($3,30 \pm 0,35$ mg/g). (Arçari, 2009).

Os constituintes bioativos padronizados (ácido clorogênico, quercetina e rutina) utilizados neste trabalho foram adquiridos comercialmente através da Sigma Aldrich (St Louis, MO), todos os compostos foram eluídos em água destilada.

5.2. EXPERIMENTAÇÃO – MODELO ANIMAL

5.2.1. Animais

Foram utilizados 45 camundongos *Swiss*, machos, com peso variando entre 20 e 25 g e idade média de três meses provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP). Todos os animais ficaram alojados no Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Imunofarmacologia da UNIFAG/USF e passaram por um período de adaptação às condições ambientais durante uma semana. Os animais foram mantidos em um período

claro/escuro de 12 horas, temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 3$ e de umidade $55\% \pm 3$, com livre acesso a água e ração. Estes foram distribuídos em grupos experimentais de acordo com a dieta e a solução ingerida.

5.2.2 Sacrifício dos animais

Ao final do experimento os animais foram anestesiados com uma mistura 1:1 de cetamina 100 mg/mL e xilazina a 2% no volume de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo e sacrificados para a retirada do tecido hepático e adiposo, para a realização dos ensaios abaixo descritos.

5.2.3. Modelo de obesidade induzida por dieta

O modelo experimental que mais se assemelha a grande parte da obesidade humana é o modelo de obesidade exógena, onde é oferecido ao animal um maior aporte calórico através de uma sobrecarga de carboidratos ou gordura, isoladamente ou em associações. A dieta padrão (DP) empregada durante todo o experimento foi AIN-93G (Reeves et al., 1993), enquanto a dieta hiperlipídica (DH) utilizada foi AIN-93G modificada (Pauli et al., 2008) (Tabela 2).

Tabela 2 – Dietas utilizadas no trabalho.

	Dieta Padrão		Dieta Hiperlipídica	
	g.kg ⁻¹	kcal.kg ⁻¹	g.kg ⁻¹	kcal.kg ⁻¹
Amido de milho	397.5	1590	115.5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido dextrinado	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Minerais	35	-	35	-
Vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2.5	-	2.5	-
Total	1000	3948	1000	5358

(Pauli et al., 2008)

5.2.4. Desenho do experimento

Inicialmente os animais foram divididos em dois grupos: um deles alimentados com a dieta padrão (DP), e o outro com dieta hiperlipídica (DH) por oito semanas. Depois destas oito semanas iniciais os animais do grupo hiperlipídico (DH) foram subdivididos aleatoriamente conforme a intervenção escolhida. A intervenção consistiu na administração de uma dose diária de erva-mate tostada (1,0 g.kg⁻¹) (Grupo III) ou água destilada (grupo II) durante 60 dias (Tabela 3). A administração das substâncias foi realizada diariamente com auxílio de uma cânula orogástrica durante o período de claro dos animais. Os animais alimentados com DP receberam via cânula orogástrica água destilada durante o período de intervenção (Grupo I).

Tabela 3 – Grupos experimentais.

Grupos	Dieta		Intervenção	Nº. animais
	8 Sem	8 Sem		
Grupo I	DP	DP	Água	15
Grupo II	DH	DH	Água	15
Grupo III	DH	DH	Erva-mate (1,0 g.kg ⁻¹)	15

5.2.5. Ganho de peso, crescimento e consumo alimentar

Os animais foram pesados semanalmente com auxílio de uma balança digital (plenna) durante todo o experimento, para avaliar o ganho de peso e crescimento. No dia do sacrifício dos animais, a gordura epididimal foi retirada pesada.

A ingestão alimentar dos animais foi avaliada a cada dois dias durante toda a etapa de intervenção com o chá-mate, através do peso da dieta utilizada. Para se obter a quantidade ingerida por animal era ofertado ao mesmo 50g de dieta (padrão ou hiperlipídica) e após dois dias pesava-se novamente a quantidade de ração existente no comedouro. Para o cálculo de quantidade ingerida utilizava-se da seguinte fórmula:

$$50 \text{ g} - \text{Quant. de dieta existente no comedouro (g)} = \text{Quant. ingerida (g)}$$

5.2.6. Glicemia plasmática e Teste de Tolerância a Insulina (K_{ITT})

Após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (I.P) de uma mistura 1:1 de cetamina/xilazina conforme descrito anteriormente e as amostras sanguíneas foram obtidas da artéria caudal. Após a coleta da glicemia basal com auxílio de um glicosímetro, foi administrado insulina (1,5 U/kg) por injeção I.P, e coletadas as amostras após 0, 10, 15, 20 e 30 minutos para determinação dos níveis séricos de glicose. A constante da curva glicêmica (K_{ITT}) foi obtida após as coletas

realizadas, utilizando-se a fórmula $0,693/t_{1/2}$. (Bonora et al., 1987), a qual calcula a inclinação da curva glicêmica obtida através das mensurações séricas. O procedimento para determinação do K_{ITT} ocorreu 48 horas antes do dia do sacrifício dos animais.

5.2.7. Sinalização da insulina e *Imunoblotting*

A capacidade de sinalização da insulina no tecido hepático foi estudada. Desta forma, após jejum, os animais anestesiados receberam através da veia porta hepática 0,2 ml de salina contendo ou não 100 μ L de insulina e foram extraídas biópsias de tecido hepático (coletada após 30s), para análise de proteínas por *imunoblotting* (fosfoIRS/IRS, fosfoAKT/AKT) conforme descrito abaixo.

Amostras oriundas de fígado foram usadas para obtenção de extratos de proteínas totais. Após coleta os tecidos foram imediatamente homogeneizados e solubilizados em solução tampão (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM *sodium pyrophosphate*, 100 mM *sodium fluoride*, 10 mM EDTA, 10 mM *sodium orthovanadate*, 2.0 mM MSF e 0.1mg aprotinin/mL) à 4 °C. O material não solubilizado foi removido por centrifugação (20 min à 9000 x G) à 4 °C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Biureto.

Os extratos protéicos foram transferidos para tubos contendo tampão de Laemmli contendo DTT 100 mM e aquecidas em água fervente por 4 min. para posterior aplicação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separação por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e bloqueadas durante 2 horas. A membrana de nitrocelulose foi incubada com os anticorpos de interesse *overnight* a 4 °C antes de serem reveladas com Kits comerciais de

quimioluminescência. O extrato de proteínas totais foi usado para avaliar a atividade protéica de IRS-1, IRS-2 e AKT (proteína quinase B (PKB)).

5.2.8. Ensaio de mobilidade eletroforética– EMSA

Para analisar os efeitos da erva-mate na regulação de transcrição usamos o *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) em extratos de proteínas nucleares oriundas do tecido hepático, para tal usamos uma sequência consenso dos fatores de transcrição FOXO1, PPAR γ , C/EBP- α desenhadas manualmente e do fator de transcrição NF- κ B obtida comercialmente (Promega -Madison, WI, USA) descritas na Tabela 4. A marcação das sequências consenso foi realizada com o auxílio do Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Pierce Protein). Para a realização do EMSA foi utilizado o *LightShift Chemiluminescent EMSA Kit* (Pierce Protein) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, cada reação continha 10 μ g de proteína nuclear, 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2,5% glicerol, 5 mM Mgcl $_2$ e 2 pmol da sonda marcada de oligonucleotídeo incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. A ligação específica foi confirmada pelo uso em excesso (100 - 400 vezes) da sonda não marcada, atuando desta forma como um competidor específico na reação. O complexo proteico foi separado em gel de poliacrilamida a 6% e transferido posteriormente para uma membrana de nylon (Hybond N+, Pierce Protein) que foi exposta a luz UV. O gel foi transferido, e a visualização foi feita seguindo de detecção por quimioluminescência, conforme o protocolo do fabricante.

Tabela 4 – Sequências consenso utilizadas no EMSA – Sinalização da insulina.

Fator de Transcrição	Sequência (5'→3')
FOXO1	CTCTAGACAAAACAACAAAACAACAAAACAATCTAGAG
PPAR γ	CTCTAGATTAACCTTTAACCATCTAGAG
C/EBP- α	CTCTAGAGGGAGTTTGGCAAACCTCCTCTCTAGAG
NF-kB	AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC

5.2.9. Determinação da modulação da expressão gênica –PCR array

Amostras do tecido hepático foram destinadas à extração de RNA. Para a estabilização e proteção do RNA, todas as amostras destinadas a este fim armazenadas em RNAlater (Qiagen, Valencia, CA, USA) a -80 °C até o momento da extração do RNA. Esta foi feita usando-se o *RNAeasy[®] tissue kit* (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, ~100 μ g de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com XIN et al. (2004).

Posteriormente, para avaliar a expressão dos genes relacionados à via de sinalização da insulina usou-se o *Mouse PI3K-AKT Signaling Pathway RT² Profiler[™]* (Qiagen), que consiste em um set de 84 genes envolvidos na sinalização da via PI3K-AKT, assim como membros da família AKT (proteína B quinase) e da família PI3K, assim como seus reguladores (Tabela 5).

Para a realização dos arrays, cDNAs oriundos do tecido hepático de dois animais de cada grupo foram usados. A reação de PCR em tempo real foi realizada usando o SYBR[®] qPCR Supermix UDG (Invitrogen, USA) seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram cicladas no equipamento 7500 Real-Time PCR System e analisadas com o

auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Os experimentos foram feitos em triplicata. A análise dos dados foi feita usando o site <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>, e normalizado contra a expressão do grupo controle (Grupo I).

Tabela 5 – Painel de genes avaliados pelo *Mouse PI3K-AKT Signaling Pathway RT² Profiler™* (Qiagen)

Característica	Genes
Membros da família AKT e PI3K	<i>AKT1, AKT2, AKT3, BTK, GRB10, GRB2, HSPB1, ILK, MTCPI, PDK2, PDPK1, PIK3CA, PIK3CG, PIK3R1, PIK3R2, PRKCA, PRKCB, PRKCZ, PTEN, TCL1.</i>
Via de sinalização IGF-1	<i>CSNK2A1, ELK1, FOS, GRB2, HRAS1, IGF1, IGF1R, IRS1, JUN, MAP2K1, MAPK3, MAPK8, PTPN11, RAF1, RAS1, SHC1, SOS1, SRF.</i>
Inativação de GSK-3 e acumulação de β-catenina	<i>ADAR, AKT1, APC, CCND1, CD14, CTNNB1, EIF2AK2, GJA1, GSK3B, IRAK1, MYD88, NFKB1, PDK1, TIRAP, TLR4, TOLLIP.</i>
PI3K subunidade p85 e migração celular	<i>CDC42, PAK1, PDGFRA, RAC1, RHOA, WASL.</i>
Controle do ciclo celular e Apoptose	<i>AKT1, CDKN1B, FASL, FOXO3, GRB2, ILK, ITGB1, MAPK1, MAPK3, PDK1, PDK2, PTEN, PTK2, RBL2, SHC1, SOS1.</i>
Vias anti-apoptóticas	<i>AKT1, BAD, GRB2, HRAS1, IGF1R, IRS1, MAP2K1, MAPK1, MAPK3, RPS6KA1, SHC1, SOS1, YWHAH.</i>
Sinalização da via mTOR	<i>AKT1, EIF4B, EIF4E, EIF4EBP1, EIF4G1, FKBP1A, MTOR, PDK1, PDK2, PTEN, RHEB, RPS6KB1, TSC1, TSC2.</i>
Regulação de eIF4e e p70	<i>AKT1, EIF4E, EIF4EBP1, EIF4G1, MTOR, IRS1, MAPK1, MAPK14, MAPK14, MAPK3, PABPC1, PDK1, PDK2, PRKCA, PTEN, RPS6KB1.</i>
Outros genes envolvidos na via AKT	<i>CASP9, CHUK, FOXO1, NFKBIA</i>

5.2.10. Validação da expressão por PCR em tempo real

A validação dos genes que tiveram a expressão significativamente alterada após as análises dos *arrays* foi feita por meio da PCR em tempo real. Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados com o auxílio do site <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm> e estão dispostos na Tabela 6. A reação de PCR em tempo real foi feita usando o *Platinum® SYBR GREEN® qPCR Supermix UDG* (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. A reação utilizada continha para cada 50 μ L: 25 μ L de *Platinum® SYBR*

GREEN[®] *qPCR Supermix UDG* (Invitrogen), 10 μ M de cada *primer* e 10 μ L de cDNA (50ng). As reações foram previamente tratadas com UDG por 2 minutos a 50 °C e desnaturadas por 2 minutos a 95 °C, seguindo por 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento por 15 segundos e extensão a 72 °C por 15 segundos.

As amostras foram cicladas no equipamento 7500 Real-Time PCR System e analisadas com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t usada para avaliação da expressão gênica. As amostras foram normalizadas usando-se o controle constitutivo. A expressão relativa foi calculada de acordo com Livak & Schmittgen (2001).

Tabela 6 – Primers utilizados para a PCR em tempo real – Sinalização da insulina.

Gene	Primer	Sequência (5'→3')
<i>AKT2</i>	Sense	CGCCTCTTTGAGCTCATTCT
	Antisense	TTGGGTCCTTCTTCAGCAGT
<i>AKT3</i>	Sense	GCTGGCTATTGTGGAGGAAG
	Antisense	TCTGCACCGTCAGTACTTGG
β - <i>ACTINA</i>	Sense	GCTACAGCTTCACCACCACA
	Antisense	TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT
<i>CHUK</i>	Sense	TACTCCCAAGGTGGAAGTG
	Antisense	GGTGCCAAATTTCTTTCTGC
<i>CTNNB1</i>	Sense	GGTAGGGTGGGAATGGTTTT
	Antisense	AGCTGTGGCAAAAACATCAA
<i>G6Pase</i>	Sense	TTCTGGATGGTTCCTGAAG
	Antisense	ACCGCAAGAGCATTCTCAGT
<i>IL-6</i>	Sense	CCGGAGAGGAGACTTCACAG
	Antisense	TCCACGATTTCCAGAGAAC
<i>IRS-1</i>	Sense	GAAGAGACTGGCTCGGAAGA
	Antisense	ATTCTGCCAACTCAACTCC
<i>IRS-2</i>	Sense	CACATTGCAAACGCCTTTTA
	Antisense	TAGCACGCCTACAGGGATTT
<i>PI3KCG</i>	Sense	TCTCTGGACCTGTGCCTTCT
	Antisense	TTACCCACTGTGCTTTGCTG
<i>PDK -1</i>	Sense	TTTCTCCAGAGCTGCTCACA
	Antisense	GATATTCATTCCCGGCTCTG
<i>PEPCK</i>	Sense	CTGGCACCTCAGTGAAGACA
	Antisense	TCGATGCCTTCCCAGTAAAC
<i>PI3KCA</i>	Sense	CGGACATCCTTAAGCAGGAG
	Antisense	GACAGAAAACCCTGCAAAGC
<i>TNF-α</i>	Sense	TAGCCAGGAGGGAGAACAGA
	Antisense	TTTTCTGGAGGGAGATGTGG

5.3. EXPERIMENTAÇÃO – CULTURA CELULAR

5.3.1. Cultura de adipócitos

Pré-adipócitos 3T3-L1 foram obtidos da *American type culture Collection* (Manassas, VA) e mantidos no meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) com antibióticos e antifúngicos. Após 48 horas de confluência (designado como dia 0), as células foram estimuladas à diferenciação em um meio contendo DMEM com 10% FBS, 243 µL de insulina (100 UI), 0,5 mM isobutilmetilxantina (IBMX), 1mM *dexamethasone* e incubadas por 96 horas. No quarto dia as células foram colocadas em meio de maturação com 10% FBS/DMEM contendo 243 µL de insulina (100 UI), e incubadas por 48 horas, seguido por cultura em meio 10% FBS/DMEM por mais 8 dias.

5.3.2. Desenho do experimento

O extrato bruto de erva-mate tostada e alguns dos seus compostos bioativos (ácido clorogênico, rutina, quercetina) foram usados para caracterizar a sua possível ação no controle da adipogênese, tanto no processo de diferenciação, assim como no processo de maturação, para tal estes produtos foram incubados na cultura celular em diferentes concentrações (Tabela 7) e em períodos cronológicos distintos, conforme demonstrando pela Figura 8. Os constituintes bioativos padronizados acima descritos foram adquiridos comercialmente através da Sigma Aldrich (USA), todos os compostos foram eluídos em água destilada. Resumidamente, as células 3T3-L1 foram submetidas ao processo de expansão inicial, até atingirem confluência, após 48 hs, as células foram transferidas para placas de cultura. Neste momento foram estimuladas à diferenciação e divididas em dois grupos denominados: grupo A e grupo B. O grupo A recebeu juntamente com o coquetel de diferenciação os diferentes compostos avaliados (Tabela 7) e o grupo B recebeu somente o

coquetel de diferenciação (Figura 8). Após 96 hs da etapa de diferenciação as células do grupo A foram retiradas e analisadas, enquanto as células do grupo B receberam o coquetel de maturação juntamente com os diferentes compostos avaliados, que foram substituídos a cada 48 horas. Ao final de 10 dias do início da maturação os adipócitos do grupo B foram retirados e analisados. (Figura 8). Ao final de cada etapa (diferenciação e maturação) as células tratadas com os diferentes compostos foram coradas pelo método de *Oil Red O*.

Tabela 7: Compostos com suas respectivas concentrações utilizados na cultura celular.

Composto utilizado	Concentrações utilizadas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Erva-mate	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Ácido clorogênico	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Quercetina	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Rutina	250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

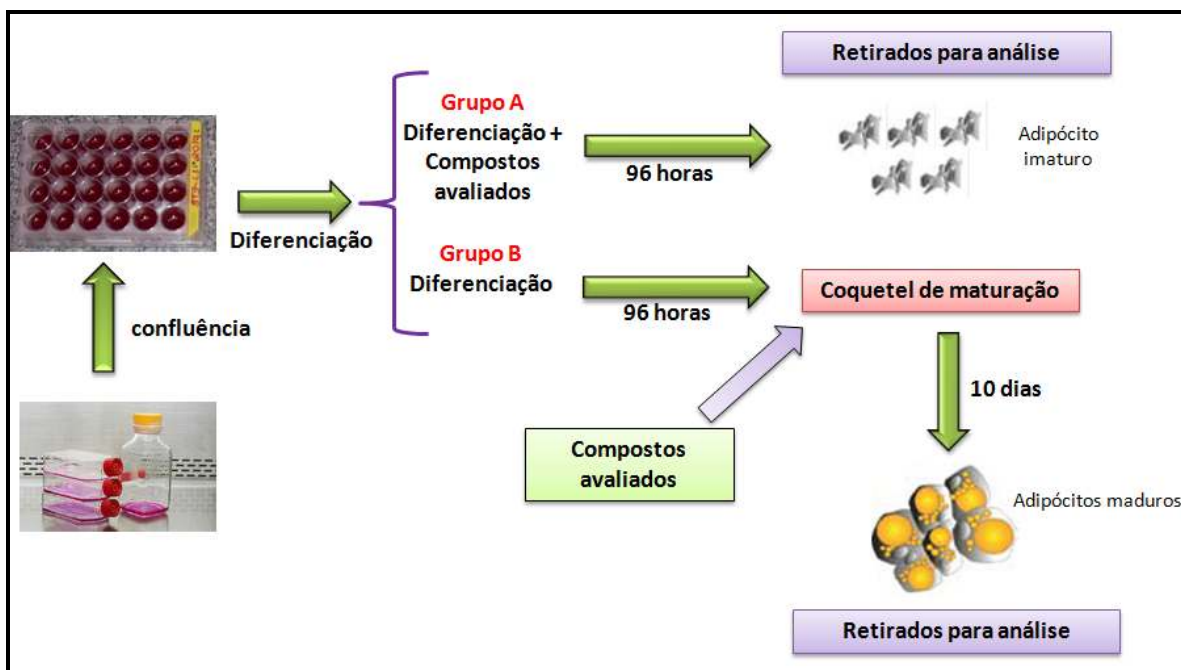


Figura 8: Ilustração das etapas realizadas na cultura celular.

5.3.3. Oil Red O

Para determinar o acúmulo de triacilgliceróis (TG) foi utilizado o teste *Oil Red O* (Sigma Aldrich, USA) conforme protocolo do fabricante. Para realizar a análise retirou-se a maior parte do meio (180 μ L) de cada poço e este foi substituído por uma quantidade igual de formalina a 10% para a fixação das células e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente (23 ± 1 °C). Posteriormente, retirou-se a formalina e adicionou-se 180 μ L de formalina a 10% fresca e as células foram incubadas durante 1h. Em seguida, retirou-se a formalina e lavou-se com isopropanol 60%. Retirou-se o isopropanol e deixou os poços secarem. Depois de secos, adicionou-se a solução de trabalho de *Oil Red O* e deixou-se em repouso por 10 minutos. Após 10 min, retirou-se o *Oil Red O* e lavou-se imediatamente com água Milli-Q por 4 vezes. Retirou-se a água e pode-se observar as células coradas ao

microscópio (dados não apresentados). As placas foram secas em temperatura ambiente e eluídas, com a adição de 200 µL de isopropanol 100%, incubando-se por 10 minutos. Após ressuspender o isopropanol com o *Oil Red O* o conteúdo foi transferido para uma placa de ELISA e mediu-se a absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios desta etapa foram realizados em triplicata.

5.3.4. Determinação da modulação da expressão gênica –PCR array

Os adipócitos obtidos através da cultura celular foram destinados à extração de RNA e síntese de cDNA conforme descrito no item 5.2.9.

Posteriormente, para avaliar o processo de adipogênese foi utilizado o *mouse Adipogenesis RT² Profiler™ PCR Array* (Qiagen). Este também consiste em um set de 84 genes que estão envolvidos no processo de diferenciação e maturação dos adipócitos (Tabela 8). A reação de PCR em tempo real foi feita usando o SYBR® qPCR Supermix UDG (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram cicladas no equipamento 7500 Real-Time PCR System e analisadas com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Os experimentos foram feitos em triplicata. A análise dos dados foi feita usando o site <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>, e normalizado contra a expressão do grupo controle (ausência de compostos).

Tabela 8 – Painel de genes avaliados pelo *mouse Adipogenesis RT² Profiler™ PCR Array* (Qiagen).

Característica	Genes
Genes Regulatórios	<i>ADIG (ADIPOGENIN), ADIPOQ, CFD, LEP, RETN, AGT, ANGPT2, LIPE, LPL.</i>
Alvos de PPARγ	<i>ADIPOQ, AGT, CEBPA, CFD, FABP4, FASN, IRS2, KLF15, LIPE, LPL, PPARG, PPARGC1A (PGC-1A), RETN, SIRT3, SLC2A4 (GLUT4), SREBF1.</i>
Pró-adipogênicos	<i>ACACB, AXINI, CCND1, CDK4, CEBPB, CEBPD, DKK1, E2F1, FABP4, FASN, FGF1, FGF2, IRS2, JUN, LMNA, LPL, PPARG, RXRA, SFRP1, SFRP5, SLC2A4 (GLUT4), WNT5B.</i>
Anti-adipogênicos	<i>ADRB2, CDKN1A, CDKN1B, DDIT3, DLK1, FOXO1, HES1, LRP5, NCOR2, RUNX1T1, SHH, SIRT1, SIRT2, TAZ, TCF7L2, TSC22D3, VDR, WNT1, WNT3A.</i>
Pró-tecido adiposo Branco	<i>BMP2, BMP4, CEBPA, EGR2, FGF10, KLF15, KLF4, SREBF1.</i>
Anti-tecido adiposo branco	<i>GATA2, GATA3, KLF2, KLF3.</i>
Pró-tecido adiposo Marrom	<i>BMP7, CREB1, DIO2, FOXC2, INSR, IRS1, MAPK14, NRF1, PPARA, PPARC, PPARGC1A (PGC-1A), PPARGC1B (PGC-1β), PRDM16, SIRT3, SRC, UCPI, WNT5A.</i>
Anti-tecido adiposo Marrom	<i>NCOA2, NR0B2, NRIH3, RB1, TWIST1, WNT10B.</i>

5.3.5 Validação da expressão por PCR em tempo real

A validação dos genes que tiveram a expressão alterada foi feita por PCR em tempo real. Os *primers* utilizados para esta etapa do estudo foram desenhados com o auxílio do site <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm> e estão dispostos na Tabela 9. A reação de PCR em tempo real foi realizada conforme descrito no item 5.2.10.

Tabela 9 – Primers utilizados para a PCR em tempo real – Adipogênese.

Gene	Primer	Sequência (5'→3')
<i>ACACB</i>	Sense	CTCCCTGCTGATTCTCTGCT
	Antisense	ACTGTCGGGCTACCTTGAGA
<i>CDKN1B</i>	Sense	AGCATGGGGGTGAAGAACT
	Antisense	CACCCAGGTTGCTTCTCTTT
<i>CREB1</i>	Sense	TTTGTCCTTGCTTTCCGAAT
	Antisense	CACTTTGGCTGGACATCTTG
<i>C/EBP-α</i>	Sense	GGGACCATTAGCCTTGTGTG
	Antisense	CTCTGGGATGGATCGATTGT
<i>DLK1</i>	Sense	GGAAAAATTGGCCCCTTTAG
	Antisense	TGGAGTCTTGGGCTAGGGTA
<i>E2F1</i>	Sense	AGCCTAGGGATTCAGGGTGT
	Antisense	TGGATCGTGCTATTCCAATG
<i>FOXC2</i>	Sense	AGGAGGCCGAGAAGAAAGTC
	Antisense	GCTCAGCGTCTCCACCTT
<i>FOXO1</i>	Sense	TACACATACGGCCAATCCAG
	Antisense	AGAGTCCTGGGGCACAGTTA
<i>GATA2</i>	Sense	TGAAGAAGGAAGGGATCCAG
	Antisense	TGGAGAGCTCCTCGAAACAT
<i>GATA3</i>	Sense	AAGTGCAAAAAGGTGCATGA
	Antisense	CAGGGATGACATGTGTCTGG
<i>KLF2</i>	Sense	CTGCGTACACACACAGGTGA
	Antisense	CTGTGTGCTTTCGGTAGTGG
<i>LRP5</i>	Sense	AAGACCCTGCTTGAGGACAA
	Antisense	TTGACCTTGTGGACCCTTTC
<i>PPARγ2</i>	Sense	GATGGAAGACCACTCGCATT
	Antisense	AACCATTGGGTCAGCTCTTG
<i>RXRA</i>	Sense	CTTTCCAAAGATGCCCTGAG
	Antisense	AACTGGGGGACATGACAGAG
<i>SFRP1</i>	Sense	GGAGGCCACTGCCTACTCTA
	Antisense	ATCCCGATGGACTGGTAGAA
<i>SIRT3</i>	Sense	CAGCTACATGCACGGTCTGT
	Antisense	ACACAATGTCGGGTTTCACA
<i>SREBP-1c</i>	Sense	GTGAGCCTGACAAGCAATCA
	Antisense	GGTGCCTACAGAGCAAGAGG
<i>TCF7L2</i>	Sense	CCCCTGCTTGATTGAAGTG
	Antisense	GGCGGCACAAAATTAAAGAG
<i>WNT10b</i>	Sense	TTCTCTCGGGATTTCTTGGA
	Antisense	CACTTCCGCTTCAGGTTTTTC
<i>WNT3a</i>	Sense	TTCTTACTTGAGGGCGGAGA
	Antisense	AAGGAACCCAGATCCCAAAT

5.4. Análise estatística

Para a significância dos dados de análise foi utilizado a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de *Dunnett's* para comparação múltipla. Todos os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SPSS 12.0 (SPSS Inc., USA). Os resultados são apresentados como razões de chance com um intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

5.5. Questões éticas

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa da Universidade São Francisco- USF, campus Bragança Paulista onde foi desenvolvida a parte experimental. (Anexo 1)

6. RESULTADOS

6.1. Intervenção com erva-mate: parâmetros bioquímicos.

Os dados relacionados aos parâmetros bioquímicos obtidos ao final dos 60 primeiros dias e após a intervenção com erva-mate por 60 dias acham-se descritos nas Tabelas 10 e 11.

Após 60 dias do início do tratamento dos animais com as diferentes dietas, observa-se que os animais submetidos à dieta hiperlipídica, apresentaram um aumento significativo no peso corpóreo, nível de glicose sanguínea e na resistência à insulina, determinado através da constante de queda de glicose durante o teste de tolerância à insulina (K_{ITT}). No entanto não houve modificação significativa na quantidade de alimento ingerido pelos diferentes grupos (Tabela 10).

Após 60 dias de intervenção com erva-mate na concentração de $1,0 \text{ g.Kg}^{-1}$, os resultados do presente trabalho, demonstram que houve uma modificação significativa no peso corpóreo e na quantidade de gordura epididimal dos animais avaliados (Tabela 11). Desta forma podemos inferir que o consumo de erva-mate levou a uma redução significativa no peso corpóreo total dos camundongos e no acúmulo de gordura oriunda do tecido epididimal, quando comparados com os animais que receberam a mesma dieta hiperlipídica, mas não sofreram nenhum tipo de intervenção (Grupo II). Além disso, observa-se no grupo submetido à dieta hiperlipídica em que houve a intervenção com erva-mate (Grupo III), que o nível de glicose sanguínea e o valor obtido através do teste de tolerância à insulina (K_{ITT}) foi similar aos observados nos animais controles submetidos a dieta padrão, demonstrando melhora na resposta à insulina pela administração de erva-mate na concentração de $1,0 \text{ g/kg}$ por 60 dias. (Tabela 11).

Tabela 10: Parâmetros bioquímicos dos grupos submetidos às diferentes dietas durante os primeiros 60 dias.

Parâmetros	Dieta Padrão (DP)		Dieta Hiperlipídica (DH)	
Peso Corpóreo (g)	36,83 ± 2,23		50,50 ± 4,42*	
Glicemia (mg/dL)	157,18 ± 17,93		377,00 ± 44,74*	
K _{ITT}	4,60 ± 0,84		1,35 ± 0,48*	
Consumo alimentar (g/dia)	3,08 ± 0,73		2,75 ± 0,41	
Gordura epididimal (g)	ND		ND	

K_{ITT} = Teste de tolerância à insulina, ND = Não Determinado.

* p < 0,05 comparado com Grupo DP.

Tabela 11: Parâmetros bioquímicos dos grupos submetidos às diferentes dietas e intervenções ao final do experimento.

Parâmetros	Dieta Padrão (DP)		Dieta Hiperlipídica (DH)	
	Água		Água	Erva-mate (1,0 g.Kg ⁻¹)
Peso Corpóreo (g)	39,67 ± 3,44		55,67 ± 2,73*	48,71 ± 6,70 [#]
Glicemia (mg/dL)	176,66 ± 33,60		270,50 ± 13,43*	196,33 ± 16,16 [#]
K _{ITT}	3,13 ± 0,54		1,27 ± 0,05*	3,14 ± 0,67 [#]
Consumo alimentar (g/dia)	3,22 ± 0,65		2,78 ± 0,45	2,75 ± 0,38
Gordura epididimal (g)	0,96 ± 0,32		2,37 ± 0,39*	1,40 ± 0,44 [#]

K_{ITT} = Teste de tolerância à insulina.

* p < 0,05 comparado com Grupo DP.

[#] p < 0,05 comparado com Grupo DH água.

6.2. Sinalização da insulina

6.2.1. Resposta a insulina

A resposta funcional sobre o valor do teste de tolerância à insulina obtido no experimento (Tabela 11) foi confirmado através da análise hepática da sinalização da insulina. Após 30 segundos de administração de insulina observa-se através da técnica de *Imunoblotting* que o nível de fosforilação de IRS-1, IRS-2 e AKT no fígado, dos animais tratados com erva-mate submetidos à dieta hiperlipídica, acham-se aumentados de maneira significativa quando comparados antes e após o estímulo, resposta semelhante à observada nos animais oriundos da dieta padrão. (Figura 9, 10 e 11, respectivamente).

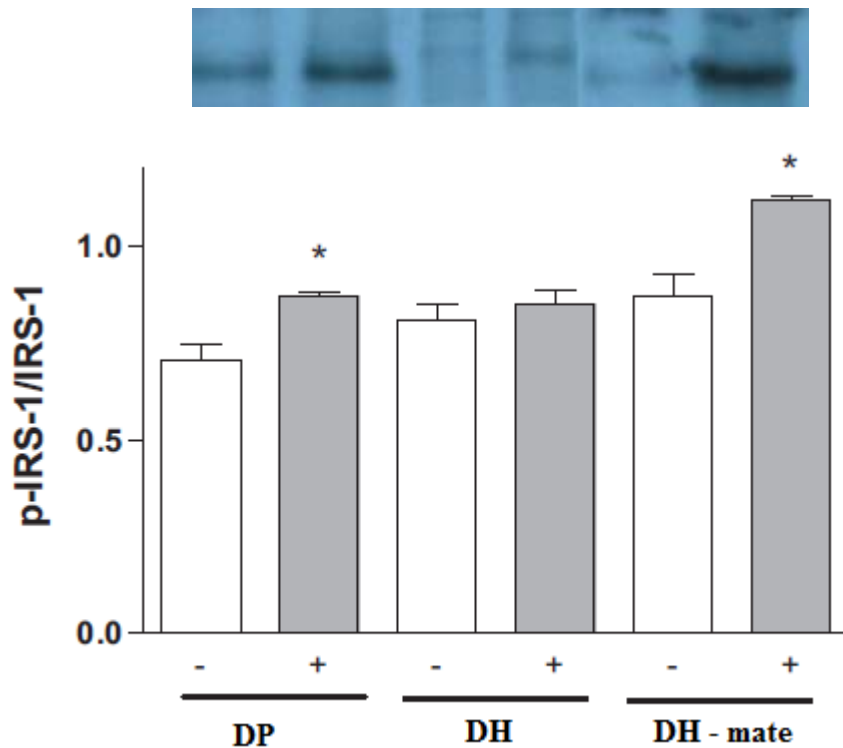


Figura 9: Nível fosforilação de IRS-1 tirosina no fígado dos grupos dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica intervenção com erva-mate (DH-mate). Tratamento *in vivo* antes (-) e após (+) 30s de administração de insulina (I.V). * $p < 0,05$.

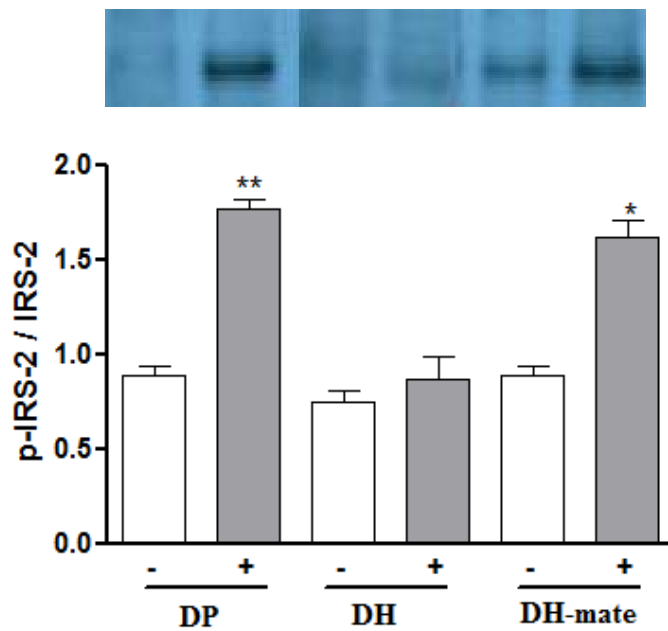


Figura 10: Nível fosforilação de IRS-2 tirosina no fígado dos grupos dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica intervenção com erva-mate (DH-mate). Tratamento *in vivo* antes (-) e após (+) 30s de administração de insulina (I.V). * p < 0,05; ** p < 0,01.

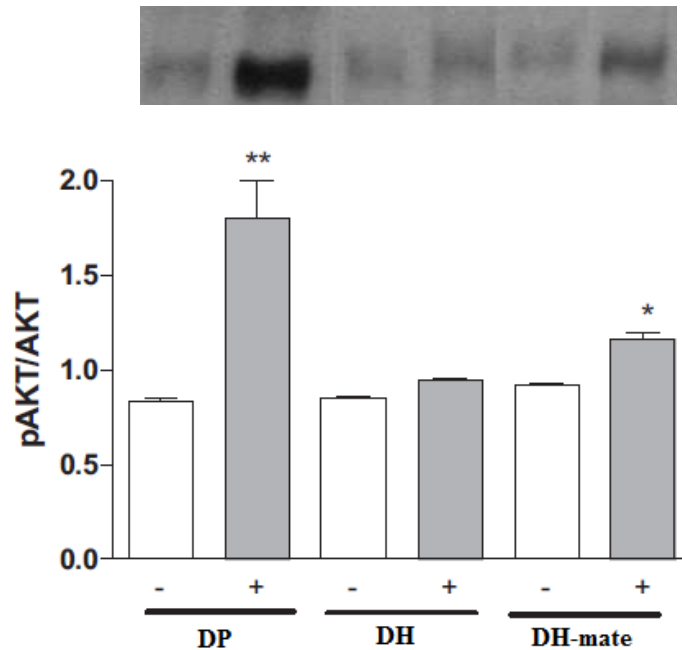


Figura 11: Nível fosforilação de AKT no fígado no fígado dos grupos dieta padrão (DP), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica intervenção com erva-mate (DH-mate). Tratamento *in vivo* antes (-) e após (+) 30s de administração de insulina (I.V). * p < 0,05; ** p < 0,01.

6.2.2. Expressão de genes ligados a sinalização da insulina

A fim de avaliar a influência da erva-mate nos genes que atuam na via de sinalização da insulina, amostras de tecido hepático foram submetidas ao *Mouse PI3K-AKT Signaling PCR Array* conforme descrito anteriormente. Os genes que apresentaram um padrão de expressão alterado no PCR array (dados não mostrados), foram validados através da PCR em tempo real e normalizados através da expressão do gene constitutivo β -actina (Tabela 12).

Nossos dados mostram que a dieta hiperlipídica causa um aumento significativo na expressão dos genes ligados ao processo inflamatório como o *TNF- α* e *IL-6* além de reduzir a expressão de diferentes genes como *AKT-2*, *IRS-1*, *PI3KCA*, *PI3KCG* e *PDK-1* envolvidos com a cascata de sinalização da insulina. Além disso, nossos dados demonstram que a dieta hiperlipídica provoca um aumento significativo na expressão de *PEPCK* e *G6Pase* os maiores reguladores do processo de gliconeogênese (Tabela 12).

Após a intervenção com erva-mate observa-se que o nível de expressão dos genes relacionados ao processo inflamatório (*IL-6* e *TNF- α*) é reduzido de maneira significativa, enquanto os genes relacionados à sinalização da insulina (*AKT-2*, *IRS-1*, *IRS-2*, *PI3KCA*, *PI3KCG* e *PDK-1*) aumentam sua expressão de maneira significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo dieta hiperlipídica intervenção com água (Grupo II), sendo ainda que alguns desses genes não apresentam diferença estatística em relação ao grupo controle (Grupo I) (Tabela 12). Nossos dados mostram ainda que a intervenção com erva-mate induziu uma redução significativa na expressão de *PEPCK* e *G6Pase* quando comparado ao Grupo II.

Tabela 12 – Nível de expressão gênica em tecido hepático após normalização com β -actina em Unidades Arbitrárias (U.A)

Genes avaliados	Dieta Padrão (DP)		Dieta Hiperlipídica (DH)	
	Água	Água	Água	Erva-mate (1,0 g.Kg-1)
<i>IL-6</i>	0,70 \pm 0,22	2,40 \pm 0,23**	0,52 \pm 0,11##	
<i>TNF-α</i>	1,02 \pm 0,26	2,70 \pm 0,29**	0,70 \pm 0,32##	
<i>PEPCK</i>	0,59 \pm 0,26	1,31 \pm 0,51*	0,69 \pm 0,26#	
<i>G6Pase</i>	0,58 \pm 0,27	1,22 \pm 0,56*	0,47 \pm 0,29#	
<i>AKT-2</i>	8,19 \pm 0,13	5,46 \pm 2,08*	7,97 \pm 2,11#	
<i>AKT-3</i>	4,15 \pm 2,35	4,20 \pm 1,47	4,58 \pm 1,75	
<i>CTNNB1</i>	1,53 \pm 0,14	1,36 \pm 0,37	1,69 \pm 0,44	
<i>CHUK</i>	1,37 \pm 0,39	1,04 \pm 0,36	1,36 \pm 0,37	
<i>IRS-1</i>	3,08 \pm 0,97	1,46 \pm 0,37*	2,04 \pm 0,72##	
<i>IRS-2</i>	1,82 \pm 0,08	0,80 \pm 0,12**	1,61 \pm 0,15#	
<i>PI3KCA</i>	1,89 \pm 0,36	1,16 \pm 0,51*	2,16 \pm 0,96#	
<i>PI3KCG</i>	7,09 \pm 0,65	4,70 \pm 1,63**	7,06 \pm 1,82##	
<i>PDK-1</i>	1,65 \pm 0,50	0,71 \pm 0,34**	1,57 \pm 0,71##	

* p < 0,05 e ** p < 0,01 quando comparado ao grupo DP

p < 0,05 e ## p < 0,01 quando comparado ao grupo DH – água

6.2.3. Análise dos fatores de transcrição

No presente trabalho avaliamos a translocação nuclear no tecido hepático dos seguintes fatores: NF- κ B, FOXO1, PPAR γ e C/EBP- α , conforme demonstra as Figuras 12 e 13. Utilizou-se a sequência consenso dos fatores de transcrição anteriormente descritos (Tabela 4). Após a avaliação dos fatores de transcrição, nossos dados indicam que NF- κ B e FOXO1 apresentam uma resposta semelhante, na qual é observada uma banda fracamente visível no grupo submetido à dieta padrão, que é intensificada no grupo submetido a dieta hiperlipídica por 16 semanas (Grupo II) (Figura 12). Observa-se ainda que o grupo com dieta hiperlipídica submetido a intervenção com erva-mate (Grupo III), apresenta uma redução na intensidade desta banda, sendo mais evidente para NF- κ B. (Figura 12). Já os fatores de Transcrição PPAR γ e C/EBP- α , não apresentam mudanças no padrão de banda identificado pelo EMSA (Figura 13).

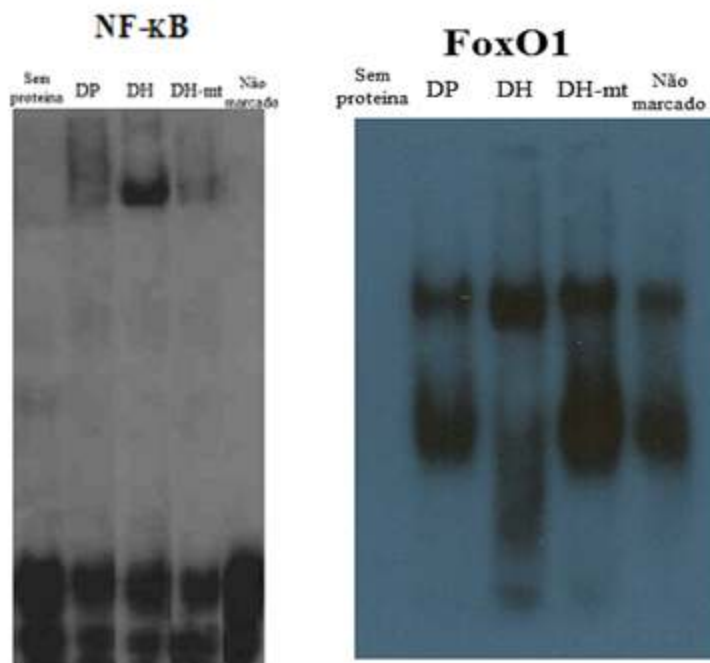


Figura 12: Imagem representativa do EMSA realizado através da incubação de extratos nucleares de fígado dos animais tratados com o oligonucleotídeo da região consenso de NF- κ B e FOXO1, . DP = Dieta padrão, DH= Dieta Hiperlipídica, DH-mt = Dieta Hiperlipídica intervenção com erva-mate.

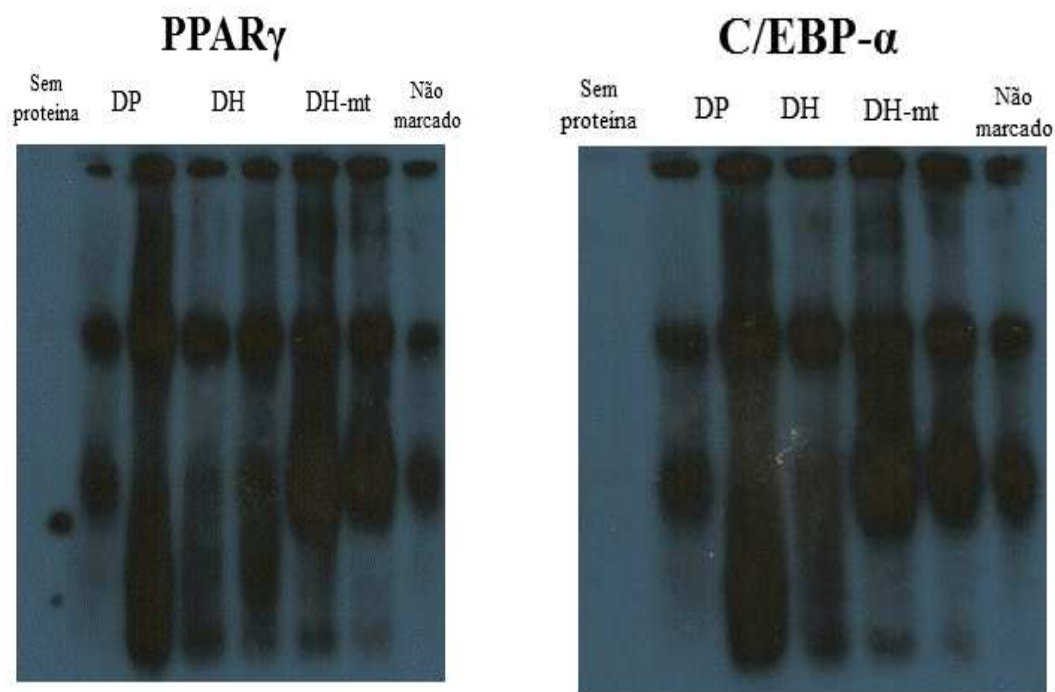


Figura 13: Imagem representativa do EMSA realizado através da incubação de extratos nucleares de fígado dos animais tratados com o oligonucleotídeo da região consenso do PPAR γ e C/EBP- α . DP = Dieta padrão, DH= Dieta Hiperlipídica, DH-mt = Dieta Hiperlipídica intervenção com erva-mate.

6.3. Adipogênese

6.3.1 Acúmulo de triacilgliceróis – *Oil Red O*

O extrato de erva-mate utilizado no presente trabalho possui em sua composição alguns compostos bioativos como: o ácido clorogênico, rutina e quercetina aos quais são atribuídos os efeitos benéficos da erva-mate (Clifford, 1990; Cardozo-Junior et al., 2007). A fim de investigar a possibilidade de que esses compostos possam atuar individualmente no processo de adipogênese os mesmos foram avaliados isoladamente em cultura de pré-adipócitos 3T3-L1.

Induzidas à diferenciação por estímulos químicos juntamente com os meios de cultura adequados, as células sofreram influência da erva-mate tostada e dos compostos bioativos padronizados, a partir do dia zero, como descrito em “Métodos”. Para determinar

a influência destes no acúmulo de triacilgliceróis (TG) durante o processo de adipogênese utilizou-se o ensaio de *Oil Red O*.

De uma forma geral os resultados obtidos através da cultura de 3T3-L1, indicam que os compostos avaliados apresentam uma redução do processo de adipogênese mais expressiva durante a etapa de diferenciação (Figura 14) quando comparado à etapa de maturação do adipócito (Figura 15). Nossos resultados indicam que na etapa de diferenciação o extrato de erva-mate e o ácido clorogênico apresentam uma redução significativa ($p < 0,05$) na concentração de 50 ug/mL quando comparado ao controle. Já o composto quercetina apresentou uma redução significativa na incorporação de triacilgliceróis na concentração 250 ug/mL, enquanto no composto rutina essa redução se torna significativa somente na concentração de 500 ug/mL. Na etapa denominada como maturação a avaliação dos compostos indicou uma redução tardia em relação à etapa de diferenciação, visto que a erva-mate tostada apresenta dados significativos a partir da concentração de 250 ug/mL, o ácido clorogênico na concentração de 500 ug/mL, quercetina na concentração de 250 ug/mL e no composto rutina essa redução não é significativa (Figura 15).

Diante dos nossos achados podemos inferir que a erva-mate, assim como seus compostos bioativos avaliados isoladamente, apresentam efeito mais evidente durante o processo de diferenciação do adipócito. Com base nestes resultados selecionamos as culturas oriundas da etapa de diferenciação (Grupo A) para avaliar a expressão gênica através do PCR array conforme anteriormente descrito.

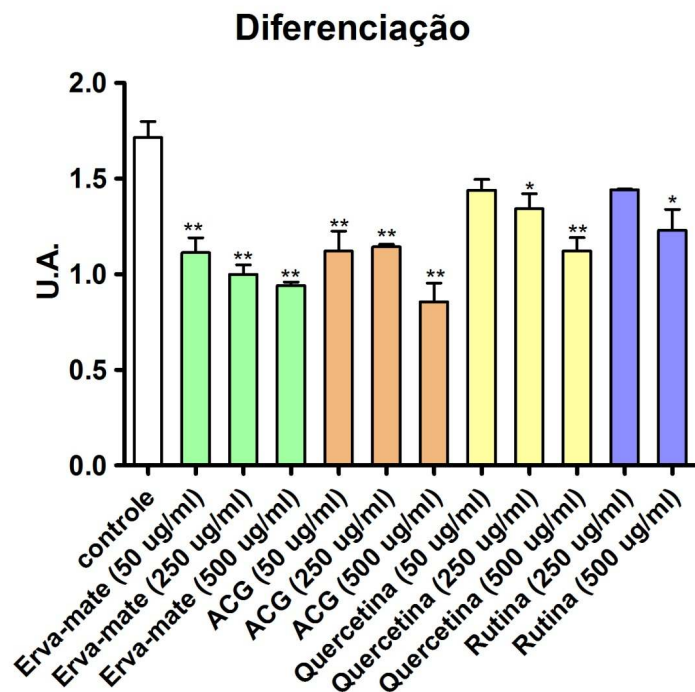


Figura14: Gráfico comparativo das diferentes concentrações utilizadas na cultura celular de 3T3-L1, etapa de diferenciação. ACG- ácido Clorogênico, concentração utilizada em $\mu\text{g/mL}$. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

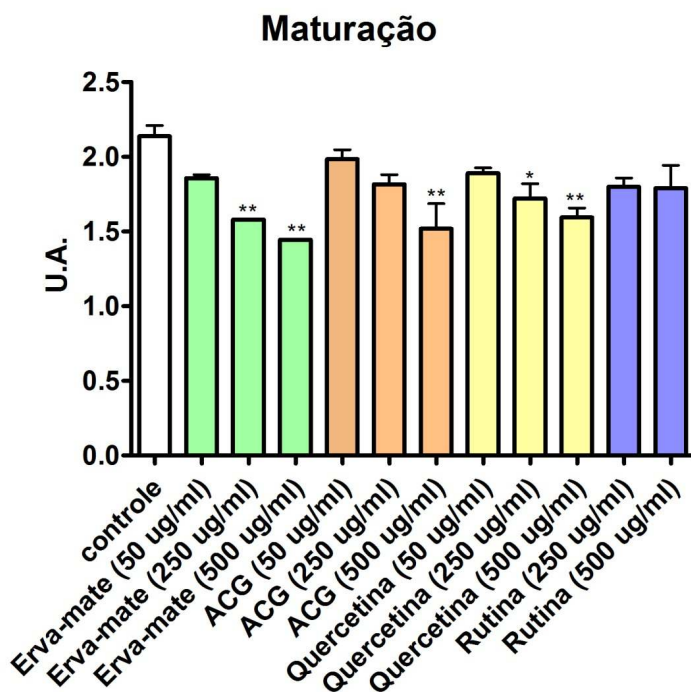


Figura 15: Gráfico comparativo das diferentes concentrações utilizadas na cultura celular de 3t3-l1, etapa de maturação. ACG- ácido Clorogênico, concentração utilizada em $\mu\text{g/mL}$. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

6.3.2. Expressão de genes ligados a Adipogênese.

6.3.2.1. Cultura celular

A fim de avaliar a influência da erva-mate e de alguns dos seus compostos bioativos nos genes que atuam na adipogênese, células provenientes da etapa de diferenciação por apresentarem um resultado mais expressivo quando comparadas com a etapa de maturação (Figura 14 e 15) foram submetidas ao *mouse Adipogenesis RT² Profiler™ PCR Array* (Qiagen) conforme anteriormente descrito. Os genes que apresentaram um padrão de expressão alterado no PCR array (dados não mostrados) foram validados através do PCR em tempo real e normalizados através da expressão do gene constitutivo, β -actina (Tabela 13). Os dados encontrados no presente trabalho indicam que a erva-mate foi capaz de modular a expressão de genes específicos relacionados ao processo de adipogênese. Além disso, observa-se que os compostos bioativos padronizados também exercem uma função positiva na regulação do processo de diferenciação dos adipócitos (Tabela 13). No entanto a quantidade de genes modulados pelos compostos isolados é menor do que os regulados pela o extrato de erva-mate tostado (Tabela 13), o que reforça a teoria que o sinergismo entre os compostos existentes na erva-mate tostada seria responsável pela sua ação mais eficiente diante da etapa de diferenciação sofrida pelo adipócito. Esses achados corroboram os dados obtidos pelo *Oil Red O* que apresenta a utilização do extrato bruto de erva-mate tostada com o melhor resultado obtido para a inibição do processo de adipogênese tanto na etapa de diferenciação como para a etapa de maturação.

Nossos dados de expressão gênica indicam que a erva-mate tostada na concentração de 50ug/mL foi capaz de reprimir de maneira significativa a expressão de genes importantes para adipogênese como o *CREB-1*, *E2F1*, *C/EBP α* e *PPAR γ ²*, além de induzir a expressão dos genes *DLK-1*, *GATA-3*, *LRP-5*, *SFRP-1*, *TCF7L2*, *WNT10b* e *WNT3a*

importantes inibidores do processo de adipogênese (Tabela 13). O ácido clorogênico na concentração de 50ug/mL foi capaz de reprimir de forma significativa a expressão de *CREB-1*, *E2F1* e *C/EBP α* , além de apresentar uma indução de *LRP-5*, ficando evidente, desta forma, sua ação na repressão de genes que favorecem o processo de adipogênese. Os dados obtidos para a quercetina (250ug/mL) e rutina (500ug/mL) deixam claro que ambas atuam favorecendo genes repressores do processo de adipogênese, visto que a quercetina aumentou a expressão de *DLK-1*, *FOXC2*, *GATA-2*, *GATA-3* e *LRP-5*, enquanto a rutina modulou somente a expressão de *FOXC2* e *LRP-5*.

Tabela 13 – Nível de expressão gênica em cultura de células após normalização com β -actina em Unidades Arbitrárias (U.A)

Genes Avaliados	Controle	Erva-mate (50ug/mL)	Ácido Clorogênico (50ug/mL)	Quercetina (250ug/mL)	Rutina (500ug/mL)
<i>C/EBPα</i>	1,97 \pm 0,28	0,93 \pm 0,33*	0,97 \pm 0,78*	1,96 \pm 0,55	1,86 \pm 0,38
<i>PPARγ²</i>	1,38 \pm 0,03	0,68 \pm 0,23*	1,31 \pm 0,02	1,19 \pm 0,18	1,49 \pm 0,23
<i>CREB1</i>	3,78 \pm 0,14	1,18 \pm 0,52*	1,02 \pm 0,35*	3,21 \pm 1,10	3,94 \pm 0,48
<i>E2F1</i>	1,20 \pm 0,46	0,73 \pm 0,12*	0,65 \pm 0,27*	0,95 \pm 0,26	0,88 \pm 0,04
<i>SREBP-1c</i>	1,98 \pm 0,29	1,11 \pm 0,59	1,09 \pm 0,64	1,45 \pm 0,48	1,26 \pm 0,61
<i>DLK1</i>	0,15 \pm 0,03	0,94 \pm 1,16*	0,14 \pm 0,03	0,75 \pm 0,42*	0,24 \pm 0,12
<i>GATA2</i>	0,24 \pm 0,01	0,60 \pm 0,05	0,25 \pm 0,12	2,06 \pm 0,63*	0,17 \pm 0,01
<i>GATA3</i>	0,28 \pm 0,02	1,65 \pm 0,36*	0,44 \pm 0,40	2,67 \pm 0,84*	0,47 \pm 0,08
<i>KLF2</i>	0,08 \pm 0,01	0,18 \pm 0,15	0,13 \pm 0,08	0,32 \pm 0,27	0,21 \pm 0,17
<i>FOXO1</i>	1,92 \pm 0,27	1,63 \pm 0,11	1,75 \pm 0,53	1,68 \pm 0,84	2,03 \pm 0,34
<i>FOXC2</i>	0,40 \pm 0,06	0,78 \pm 0,59	0,45 \pm 0,03	2,97 \pm 0,13*	3,06 \pm 0,48*
<i>WNT10b</i>	0,76 \pm 0,1	3,31 \pm 0,39*	1,52 \pm 0,24	0,35 \pm 0,15	0,61 \pm 0,28
<i>WNT3a</i>	0,53 \pm 0,04	1,56 \pm 0,19*	0,84 \pm 0,05	0,82 \pm 0,18	0,89 \pm 0,37
<i>LRP5</i>	2,70 \pm 0,55	4,71 \pm 1,43*	4,21 \pm 1,42*	3,50 \pm 0,69*	4,00 \pm 1,15*
<i>SFRP1</i>	0,20 \pm 0,01	5,58 \pm 1,25*	0,39 \pm 0,12	0,53 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01
<i>TCF7L2</i>	0,55 \pm 0,03	1,71 \pm 0,33*	0,56 \pm 0,08	0,85 \pm 0,42	0,41 \pm 0,12
<i>SIRT3</i>	0,09 \pm 0,02	0,18 \pm 0,06	0,12 \pm 0,03	0,26 \pm 0,16	0,35 \pm 0,38
<i>RXRA</i>	2,37 \pm 0,12	2,14 \pm 0,38	2,12 \pm 0,68	3,49 \pm 0,79	2,60 \pm 1,46
<i>ACACB</i>	1,04 \pm 0,04	1,07 \pm 0,07	1,06 \pm 0,05	1,12 \pm 0,04	1,05 \pm 0,03
<i>CDKN1B</i>	0,43 \pm 0,04	0,67 \pm 0,27	0,53 \pm 0,05	0,49 \pm 0,14	0,82 \pm 0,32

* p < 0,05 quando comparado ao grupo controle.

6.3.2.2. Tecido adiposo - animais.

A fim de, avaliar se os resultados obtidos *in vitro* se reproduziriam *in vivo*, avaliamos, no tecido adiposo dos animais submetidos as diferentes dietas, a expressão dos mesmos genes avaliados em cultura celular.

Os resultados para essa etapa acham-se descritos na Tabela 14. Após a normalização com β -actina nossos dados indicam que a erva-mate foi capaz de reprimir os genes *CREB1*, *C/EBP α* e *PPAR γ ²*, determinantes para que ocorra a etapa de diferenciação dos adipócitos. E que a erva-mate foi capaz de induzir a expressão os genes anti-adipogênicos *DLK1*, *GATA2*, *GATA3*, *KLF-2*, *WNT10b*, *WNT3a*, *LRP5*, *SFRP1* e *TCF7L2*.

Tabela 14 – Nível de expressão gênica em tecido adiposo após normalização com β -actina em Unidades Arbitrárias (U.A)

Genes avaliados	Dieta Padrão (DP)	Dieta Hiperlipídica (DH)	
	Água	Água	Erva-mate (1,0 g.Kg-1)
<i>C/EBPα</i>	1,53 + 0,70	2,10 + 0,22	1,09 + 0,73 [#]
<i>PPARγ²</i>	2,08 + 0,42	3,01 + 0,62	1,26 + 0,54 [#]
<i>CREB1</i>	0,44 + 0,12	1,26 + 0,19**	0,54 + 0,09 ^{##}
<i>E2F1</i>	0,34 + 0,08	0,19 + 0,01	0,17 + 0,04
<i>SREBP-1c</i>	4,41 + 0,67	3,08 + 0,19	3,71 + 0,41
<i>DLK1</i>	2,90 + 0,24	0,08 + 0,02**	0,48 + 0,12 ^{**##}
<i>GATA2</i>	1,31 + 0,33	0,09 + 0,02*	0,70 + 0,14 [#]
<i>GATA3</i>	4,63 + 0,63	0,20 + 0,05**	4,47 + 0,60 ^{##}
<i>KLF2</i>	2,01 + 0,90	0,57 + 0,21*	0,83 + 0,18*
<i>WNT10b</i>	4,33 + 0,30	0,27 + 0,01**	1,88 + 0,18 ^{*##}
<i>WNT3a</i>	4,35 + 0,18	0,66 + 0,16*	2,49 + 0,19 [#]
<i>LRP5</i>	1,07 + 0,12	0,25 + 0,12*	0,94 + 0,17 [#]
<i>SFRP1</i>	3,03 + 0,22	1,88 + 0,09	6,07 + 0,64 ^{*#}
<i>TCF7L2</i>	2,85 + 0,23	0,72 + 0,18*	2,18 + 0,11 [#]
<i>FOXO1</i>	1,18 + 0,24	1,49 + 0,52	1,03 + 0,43
<i>FOXC2</i>	3,12 + 0,75	2,78 + 0,44	2,99 + 0,51

* p < 0,05 e ** p < 0,01 quando comparado ao grupo DP;

p < 0,05 e ## p < 0,01 quando comparado ao grupo DH - água

7. DISCUSSÃO

7.1. Sinalização da insulina

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que intervenção, por sessenta dias, com erva-mate em camundongos obesos foi capaz de reduzir de forma significativa a glicemia basal (Tabela 11). Esses dados confirmam um estudo prévio realizado por nosso grupo (Arçari et al., 2009), no qual demonstramos a influência do consumo de erva-mate em diferentes moléculas (TNF- α , IL-6, PAI-1, leptina, angiotensina, adiponectina, PPAR γ , UCP-1) e no metabolismo de colesterol de animais submetidos a uma dieta hiperlipídica. A redução glicêmica observada no presente estudo é uma consequência da melhora significativa do quadro de resistência à insulina observada ao final do experimento, após a intervenção com erva-mate nos animais obesos (Tabela 11). A resistência à insulina gera uma série de distúrbios metabólicos e possui a hiperglicemia como uma das características mais marcantes para o seu diagnóstico (Zecchin et al., 2004).

A obesidade é uma condição que culmina em uma inflamação caracterizada pelo aumento na produção de citocinas inflamatórias e a presença de algumas dessas são importantes para o estabelecimento do quadro de resistência à insulina, entre estas destaca-se a IL-6 e o TNF- α (Hotamisligil et al., 1996). Sabe-se que aproximadamente um terço da IL-6 circulante provém do tecido adiposo em seres humanos (Mohamed-Ali et al., 1997) e que esta desempenha papel na redução da expressão do IRS-1 (Papanicolaou et al., 1998; Pradhan et al., 2001) e do GLUT-4 (Espósito et al., 1999 ; Fasshauer et al., 2003) no tecido muscular e hepático, sendo um fator preditivo para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Zhang et al., 1994). O TNF- α desempenha um papel regulador no acúmulo de gordura corporal e no GLUT-4 (Arner, 1995; Montague et al., 1998). Em indivíduos obesos, há uma

forte correlação inversa entre os níveis de TNF- α e o metabolismo da glicose (Winkler et al., 2003; Hsueh e Law, 2003). Este efeito ocorre em razão da supressão pelo TNF- α da sinalização da insulina, reduzindo a fosforilação em tirosina do IRS-1 e IRS-2, tal fato resulta na redução de atividade da AKT com conseqüente diminuição na captação de glicose pelas células mediada pela ação da insulina, levando a um quadro de hiperinsulinemia e em último estágio a diabetes tipo 2 (Arner, 1995; Araújo et al., 2007).

Diversos estudos mostram que os níveis de RNAm de *TNF- α* são elevados em humanos e animais obesos, estando estes positivamente correlacionados com o aumento do volume dos adipócitos, tanto no depósito visceral quanto subcutâneo (Montague et al., 1998; Winkler et al., 2003; Araújo et al., 2007).

Deste modo, nossos dados indicam que a dieta hiperlipídica ocasionou um aumento de peso nos animais que por sua vez levou a um aumento significativo na expressão gênica de *IL-6* e *TNF- α* . No entanto após a intervenção com erva-mate nos animais obesos (Grupo III) a expressão destas citocinas é reduzida de maneira significativa, não apresentando diferenças em relação ao grupo controle (Grupo I) (Tabela 12). Além disso, estudos mostram que o TNF- α e a IL-6 ativam a transcrição do NF-kB, que orchestra uma série de alterações inflamatórias promovendo a transcrição de outros genes envolvidos com o processo inflamatório (Bayon et al., 2003) além de induzir a produção do próprio TNF- α (Siebenlist, 1997). De fato, a análise da translocação nuclear de NF-kB indicou um aumento nos animais obesos e redução desta nos animais que sofreram a intervenção com erva-mate (Figura 12), contribuindo assim para uma redução na expressão de TNF- α . Desta forma, podemos inferir que a redução da resistência à insulina observada após intervenção, poderia parcialmente estar associada a uma repressão de IL-6 e TNF- α , ocasionada por uma

redução no peso corpóreo dos animais tratados com erva-mate (Tabela 11). Os resultados descritos nesta etapa foram publicados no periódico *Molecular and Cellular Endocrinology* conforme Anexo 2.

Os efeitos biológicos da insulina iniciam-se após a ativação do seu receptor, o que resulta na fosforilação em tirosina de vários substratos protéicos intracelulares incluindo o IRS-1 e IRS-2 (Kahn et al., 1993; Van Obberghen 1994). Estes substratos, quando fosforilados em tirosina, se associam e ativam a AKT, cuja interação parece ser essencial para a ação metabólica da insulina em distintos processos (Shepherd et al., 1995, White, 1998; Czech & Corvera, 1999). Os dados apresentados neste estudo mostram que o extrato de erva-mate foi capaz de reestabelecer de forma significativa a sinalização da insulina em ambos substratos nos animais obesos, dados esses observados pelo aumento significativo na expressão gênica de *IRS-1* e *IRS-2* (Tabela 12) e melhora na fosforilação hepática do IRS-1, IRS-2 após o estímulo com insulina (Figuras 9 e 10).

A fosforilação em tirosina das proteínas IRS-1 e IRS-2 cria sítios de reconhecimento para as moléculas PI3K (Lietzke et al., 2000). Tem sido sugerido que a subunidade catalítica de PI3K, PI3KCA, é essencial para ativação da AKT, ao passo que a ausência da subunidade catalítica PI3KCB não reduz de maneira significativa a fosforilação da AKT (Chattopadhyay et al, 2004). Desse modo, observou-se neste estudo que a erva-mate alterou a expressão de *PI3KCA* (Tabela 12), confirmando os resultados positivos encontrados na fosforilação da AKT observados por nosso grupo (Figura 11).

A ativação do complexo da PI3K permite que as proteínas da família PDK fosforilem os resíduos de serina e treonina (Adams et al., 2004; Cohen 2006; Taniguchi et al., 2006). Dentre as proteínas da família serina/treonina quinases (PDK) a PDK-1 é a melhor caracterizada (Alessi et al., 1997). Diferentes estudos mostram que a deficiência de

PDK-1 no tecido hepático resulta em intolerância a glicose, diminuição da expressão de genes regulados pela insulina e dano hepático (Michael et al., 2000; Mora et al., 2005; Okamoto et al., 2007). De forma geral esses estudos mostram que no tecido hepático a ausência de PDK-1 ocasiona vários defeitos na sinalização da insulina assim como no surgimento de diabetes tipo II, caracterizada por hiperinsulinemia e hiperglicemia pós prandial. Nossos dados indicam que a intervenção com erva-mate, nos animais obesos, apresenta uma significativa ação modulatória em *PDK-1*, contribuindo para os efeitos funcionais observados neste grupo (Tabela 12).

A ativação das proteínas da família PDK ocasiona a ativação de distintas formas da proteína AKT (AKT-1, AKT-2 e AKT-3) (Chan & Tschlis, 2001). Dentre as isoformas de AKT, sugere-se que AKT-2 seja a principal delas, estando envolvida no controle homeostático da glicose, associada à sinalização da insulina. Atualmente é bem comprovado que a AKT-2 é a principal isoforma envolvida no metabolismo da glicose (Taniguchi et al., 2006). Dentre as isoformas da AKT avaliadas por nosso trabalho, a expressão de *AKT-2* foi reprimida nos animais submetidos à dieta hiperlipídica por 120 dias (Tabela 12). No entanto, no grupo submetido a intervenção com erva-mate (Grupo III) observou-se um aumento significativo da expressão de *AKT-2*. Desse modo, estes dados indicam que o aumento da ativação da AKT, observada no tecido hepático dos animais que sofrem intervenção com erva-mate após o estímulo com insulina (Figura 11), ocorreu via reestabelecimento da expressão da isoforma *AKT-2*.

Uma das principais funções do tecido hepático é o controle do processo de gliconeogênese, que ocorre através da ação de enzimas como: PEPCK e G6Pase, controladas pelo fator de transcrição FOXO1, principal isoforma presente em tecidos com resposta à insulina (Nakae et al., 2001; Matsumoto et al., 2007). Sob condições de jejum

FOXO1 está localizado no núcleo, com a ativação da AKT ele é translocado do núcleo para o citoplasma reduzindo desta forma a expressão de PEPCCK e G6Pase (Altomonte et al., 2003).

Acredita-se, pois, que a insulina exerce seus efeitos no metabolismo da glicose no tecido hepático através da inibição de FOXO1 (Samuel et al., 2006; Zhang et al., 2006; Matsumoto et al., 2007). Os resultados oriundos deste trabalho mostram que a intervenção com erva-mate reduziu a translocação nuclear de FOXO1 (Figura 12). Fato este que possivelmente reprimiu a expressão das principais enzimas reguladoras da gliconeogênese *PEPCCK* e *G6Pase*. Por fim, pode-se inferir que a erva-mate foi capaz de reduzir o processo de gliconeogênese, no tecido hepático, através de sua atuação na AKT, tendo em vista a íntima relação entre os mesmos.

De forma geral, os dados do presente trabalho indicam que, a erva-mate foi capaz de aumentar de forma significativa a expressão dos seguintes genes no tecido hepático dos animais submetidos à dieta hiperlipídica: *IRS-1*, *IRS-2*, *PI3KCA*, *PI3KCG*, *PDK-1* e *AKT-2* favorecendo desta forma a sinalização da insulina AKT. Além disso, a erva-mate foi capaz de reprimir a expressão de *PEPCCK* e *G6Pase* relacionadas com o processo de gliconeogênese (Figura 16). Assim, os resultados obtidos nesta etapa demonstram a ação específica da erva-mate sobre algumas das principais isoformas existentes na via hepática de sinalização à insulina, contribuindo desta forma para a reversão do quadro de resistência à insulina.

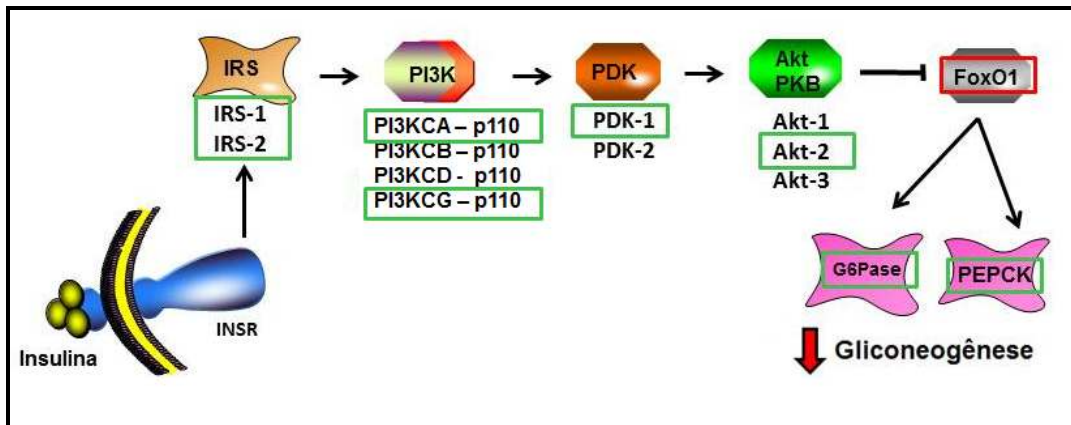


Figura 16: Ação da erva-mate nas principais isoformas presentes nas diferentes etapas da via de sinalização da insulina em tecido hepático dos animais em dieta hiperlipídica. Verde: expressão induzida após intervenção / vermelho: repressão da translocação nuclear.

Os efeitos benéficos da erva-mate observados neste estudo devem-se provavelmente à existência de diferentes compostos bioativos, em especial os compostos fenólicos como o ácido clorogênico e seus isômeros, presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.

Alguns autores relatam que, em modelo animal, o ácido clorogênico poderia ter uma importante ação anti-obesidade devido à redução da glicemia pós prandial, colesterol e triglicerídeos plasmáticos, redução na resistência à insulina e melhora no *pool* de minerais (Herling et al., 1999; Rodriguez de Sotillo e Hadley, 2002). Um estudo realizado com seres humanos mostrou que o ácido clorogênico foi capaz de reduzir a glicemia plasmática em relação ao grupo placebo (Van Dijik et al., 2009). Resultados semelhantes também foram observados em modelos animais (Andrade-Cetto et al., 2001; Bassoli et al., 2008). Estudos mostrando as vias de atuação do ácido clorogênico no mecanismo de ação da insulina são escassos.

No entanto uma das vias propostas pela qual o ácido clorogênico parece influenciar na glicemia é através da inibição da G6Pase hepática. Estudos *in vivo* em modelos animais demonstram que o ácido clorogênico é capaz de reduzir a glicemia através dessa via

(Herling et al.,1999; Bassoli et al.,2008). Conforme descrito anteriormente, a erva-mate também foi capaz de reprimir a expressão de *G6Pase*.

Além do ácido clorogênico, a erva-mate possui outro importante composto bioativo, a quercetina. Estudos mostram que o consumo de quercetina, em modelos animais induzidos à diabetes, é capaz de controlar os níveis plasmáticos glicêmicos devido a uma maior proteção pancreática nesses animais (Coskun et al., 2005; Adewole et al., 2006). Estudos reportam que a quercetina é capaz de inibir a α -glicosidase *in vitro*. A α -glicosidase é um agente oral hipoglicemiante que atua inibindo a digestão de carboidratos no intestino delgado, levando conseqüente a uma redução da glicose plasmática pós prandial (Standl et al., 1999). Ainda não existem evidências na literatura indicando uma possível ação da quercetina nos mecanismos envolvidos na via de sinalização da insulina.

7.2. Adipogênese

Considerando que a obesidade é um grave problema de saúde pública e tendo em vista os resultados descritos na literatura bem como os obtidos recentemente por nosso grupo (Martins et al., 2008; Miranda et al., 2008; Arçari et al., 2009; Arçari et al., 2011), acreditamos que a ingestão de erva-mate modula a sinalização celular e altera a expressão de genes e proteínas envolvidos no processo de adipogênese. O modelo, *in vitro* mais bem caracterizado na literatura para adipogênese utiliza pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1 (Ntambi & Young-Cheul, 2000). Desta forma, o presente trabalho procurou avaliar a influência da erva-mate e alguns dos seus principais compostos bioativos (ácido clorogênico, rutina e quercetina) no processo de diferenciação e maturação dos adipócitos

em cultura de 3T3-L1, bem como convalidar os resultados obtidos nesta etapa com experimento *in vivo*.

Os resultados obtidos através da cultura de 3T3-L1, indicam que todos os compostos avaliados apresentam uma redução do processo de adipogênese mais expressiva durante a etapa de diferenciação (Figura 14) quando comparado à etapa de maturação do adipócito (Figura 15). Desta forma, podemos inferir que, de fato, a erva-mate exerce função no controle do processo de adipogênese, confirmando assim outros resultados descritos na literatura, inclusive do nosso laboratório (Arçari et al., 2009); que demonstram perda de peso em animais obesos após administração de erva-mate (Rodriguez de Sotillo & hadley, 2002; Pang et al., 2008). Além disso, podemos com base nos resultados deste trabalho, sugerir que a interferência ocasionada pela erva-mate e por seus compostos bioativos é mais proeminente na etapa de diferenciação em culturas de células 3T3-L1 submetidas ao processo de adipogênese. Os dados descritos neste trabalho ainda revelam que o sinergismo entre os compostos bioativos da erva-mate são responsáveis pela sua atuação, visto que observou-se uma redução mais exarcebada no processo de diferenciação quando compara-se o extrato de erva-mate com seus compostos bioativos isolados (Figura 14). Além disso, estes dados são ratificados pelo maior número de genes modulados pelo extrato de erva-mate em cultura celular em relação aos compostos bioativos (Tabela 13).

Diante dos resultados obtidos na etapa de diferenciação da cultura celular, avaliamos nestas células uma possível modulação da expressão gênica influenciada pela erva-mate ou seus compostos bioativos (ácido clorogênico, quercetina e rutina) em diferentes genes e fatores de transcrição envolvidos no processo de adipogênese. Além disso, validamos os dados obtidos na cultura celular de 3T3-L1 com o tecido adiposo de animais submetidos a diferentes dietas e intervenção com erva-mate.

Conforme descrito anteriormente a diferenciação dos pré adipócitos, requer uma série de eventos em sequência, tais como: parada do ciclo celular, expansão clonal e diferenciação (eventos iniciais, intermediários e terminais), por meio da ativação de centenas de genes anteriormente silenciosos. No entanto, para que ocorram esses processos são necessários diferentes fatores de transcrição que incluem a ativação inicial dos *C/EBP-β* e *C/EBP-δ*, seguidos da indução da ativação do *PPARγ*, em especial a isoforma *PPARγ²* (principal isoforma relacionada ao processo de adipogênese) e do *C/EBP-α*, que atuam diretamente em diferentes genes associados ao processo de adipogênese (Mandrup and Lane, 1997; Morrison and Farmer, 2000; Rosen et al., 2000; Srujana et al., 2007).

Os resultados obtidos em cultura celular mostram que o extrato de erva-mate (50 µg/mL) assim como o composto ácido clorogênico (50 µg/mL) foram capazes de reduzir expressão de *C/EBP-α* (Tabela 13). Por outro lado, ao analisarmos o tecido adiposo observa-se que a erva-mate, na concentração de 1,0 g/kg, foi capaz de reduzir a tanto a expressão de *PPARγ²* como de *C/EBP-α* (Tabela 14). Os dados aqui apresentados são confirmados por alguns estudos utilizando *Ilex paraguariensis* os quais demonstram uma redução na expressão de *PPARγ²* após intervenção com erva-mate em camundongos e ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica (Pang et al., 2007; Arçari et al., 2009).

Diversos estudos demonstram que o *PPARγ* é o principal regulador do processo de adipogênese e que sua manutenção é fundamental para a progressão dos estágios finais de diferenciação (Tamori et al., 2002). O *PPARγ²* é expresso essencialmente em tecido adiposo e promove a diferenciação e proliferação dos adipócitos provenientes dos fibroblastos resultando em um aumento na adiposidade (Fajas et al., 1998). Diversos estudos mostram que a ativação de *PPARγ* em diferentes linhagens de fibroblastos resulta na expressão de diferentes genes adipogênicos incluindo o *C/EBP-α* (Wu et al., 1999; Evans

et al., 2001). De modo similar estudos demonstram que a expressão de *C/EBP- α* , aumenta a expressão de *PPAR γ* (FOX et al., 2006). Spiegelman (1998) sugeriu que a autoregulação de *C/EBP- α* e *PPAR γ* é fundamental para a manutenção do estágio de diferenciação do adipócito. Assim, os resultados provenientes deste trabalho são importantes para caracterizar o mecanismo de ação da erva-mate, visto que esses fatores de transcrição são fundamentais para os estágios finais de diferenciação e progressão dos adipócitos. Além disso, sugere-se que o composto bioativo mais abundante na erva-mate, o ácido clorogênico, também exerce efeito neste mecanismo.

Alguns estudos mostram que a expressão dos principais reguladores da diferenciação dos adipócitos (*C/EBPs* e *PPAR γ*), depende fundamentalmente da ação de outras vias, genes e proteínas indispensáveis para o processo. Dentre essas podemos destacar a *DLK-1* (*Pref-1*), onde estudos utilizando várias abordagens distintas *in vitro* mostram claramente a atuação de *DLK-1* na inibição da diferenciação do adipócito (Wang et al., 2006). A *DLK-1* inibe a expressão de fatores de transcrição como *C/EBP- β* , *C/EBP- δ* , além de outros fatores envolvidos no processo de adipogênese. De uma forma geral esses estudos mostram que *DLK-1* inibe adipogênese e que sua inibição é um passo necessário para que ocorra a diferenciação do adipócito (Kopan & Ilagan, 2009). Os resultados apresentados mostram que a erva-mate (50 $\mu\text{g/mL}$) assim como a quercetina (250 $\mu\text{g/mL}$) atuam aumentando a expressão de *DLK-1*, (Tabela 13). Quando avaliamos a expressão de *DLK-1* em tecido adiposo observamos que a mesma se correlaciona com os valores observados na cultura celular e com os dados descritos na literatura.

Um estudo conduzido por SHEN et al. (2009), demonstrou que o aumento da expressão de *E2F1*, um membro da família de fatores de transcrição denominados E2F, resulta na redução da expressão de *DLK-1*. De modo complementar, estudos em tecido

adiposo revelam que, E2F1 induz a expressão de PPAR γ e de C/EBP α , favorecendo desta forma o processo de adipogênese (Venugopal et al., 2007). Ao avaliarmos em cultura celular a influencia dos diferentes compostos na expressão de *E2F1*, observa-se que a erva-mate e o ácido clorogênico reduzem a sua expressão. No entanto, ao avaliar em tecido adiposo proveniente dos animais, não são observadas alterações na expressão de *E2F1*.

Diferentes estudos nos fornecem evidências convincentes de que a proteína CREB-1 (também conhecida somente como CREB) é ativada no início do processo de adipogênese em cultura de células 3T3-L1 e participa na indução da expressão de C/EBP- β (Klemm & Lane 2004; Zhang et al., 2004). Posteriormente, FOX et al. (2006) demonstrou, em cultura de 3T3-L1, que CREB promove a expressão de C/EBP- β e também a induz diretamente a expressão de PPAR γ^2 , sendo desta forma fundamental nesse processo. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que extrato de erva-mate (50 $\mu\text{g/mL}$), assim como o ácido clorogênico (50 $\mu\text{g/mL}$) foram capazes de reduzir expressão de *CREB-1 in vitro* (Tabela13). Do mesmo modo, as análises feitas em tecido adiposo demonstram a clara relação entre o aumento da expressão de *CREB-1* nos animais do grupo II e a posterior redução na sua expressão após a intervenção com erva-mate (Tabela 14).

Estudos recentes sugerem que o elevado nível intracelular de cAMP ativa CREB via fosforilação de proteínas quinases, um exemplo desta ativação é a própria insulina estimulando a AKT (Klemm et al., 1998). Estudos realizados por TSENG et al. (2005), revelaram que na presença de insulina ocorre supressão de WNT10b, pertencente a via WNT. Além disso, este estudo demonstrou que a fosforilação de CREB, assim como sua ativação, são elevadas na presença de insulina e que a ativação de CREB ocasionava uma redução nos níveis de WNT10b. MACDOUGALD & MANDRUP (2002) demonstraram

que WNT10b reprime o processo de adipogênese em 3T3-L1 via WNT por mecanismos dependentes de β -catenina.

Conforme anteriormente descrito as proteínas WNTs podem inibir a diferenciação do pré-adipócito através de mecanismos dependentes β -catenina, um importante regulador do processo de adipogênese. No presente trabalho fica claro que a erva-mate atua nos mecanismos dependentes de β -catenina, visto que ocorre inicialmente uma repressão significativa de *CREB-1*, favorecendo desta forma a ativação desta via. A sinalização desta via nos mecanismos dependente de β -catenina é iniciada pela ligação da WNT especificamente as proteínas WNT1, WNT3a e WNT10b que se ligam a moléculas receptoras as SFRP (SFRP1 e SFRP5) e os LRP, especificamente LRP5 e LRP6. Estudos mostram que a expressão de WNT10b estabiliza a β -catenina no citoplasma inibindo assim a adipogênese, sugerindo que WNT10b é a principal proteína WNT reguladora da adipogênese, e que as proteínas WNT1 e WNT3a atuam de maneira sinérgica neste processo (Tseng et al., 2005). Adicionalmente, estudos mostram que WNT5b é induzida durante a adipogênese e através de um mecanismo ainda não muito elucidado, desestabiliza β -catenina favorecendo a adipogênese. (Kanazawa et al., 2004).

A ligação WNT nas moléculas receptoras (SFRP e LRP) inibem GSK-3, resultando na hipofosforilação de β -catenina que se transloca do citoplasma em direção ao núcleo, onde ela se liga ao fator de transcrição TCF/LEF que atua reprimindo a expressão de *C/EBP α* e *PPAR γ* , inibindo desta forma o processo de adipogênese (Rosen et al., 2000; Harrison & Macdougald, 2002). Dentre os fatores de transcrição da família TCF/LEF destaca-se o fator TCF7L2 conhecido também como TCF4. Alguns estudos procuram relacionar modificações em TCF7L2 e o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Kanazawa et al., 2004; Grant et al., 2006).

Após avaliação de diferentes genes envolvidos com o processo de adipogênese em cultura celular e no tecido adiposo, o presente trabalho indica que a erva-mate atua de forma expressiva na via de repressão da adipogênese conhecida como via WNT (Tabela 13 e 14).

Nossos dados evidenciam que a erva-mate foi capaz de induzir *in vitro* e *ex vivo* a expressão de *WNT10b*, *WNT3a*, *SFRP1* e *LRP5* o que poderia contribuir na translocação de β -catenina para o núcleo, aumentando desta forma a expressão de *TCF7L2*, conforme observado por nossos resultados, que por sua vez culminou em uma repressão significativa observada de *C/EBP α* e *PPAR γ 2*, reduzindo desta forma o processo de adipogênese (Figura 17). Além disso, nossos dados demonstram que somente a expressão de *LRP5* foi modificada pelos demais compostos bioativos isolados utilizados na cultura celular.

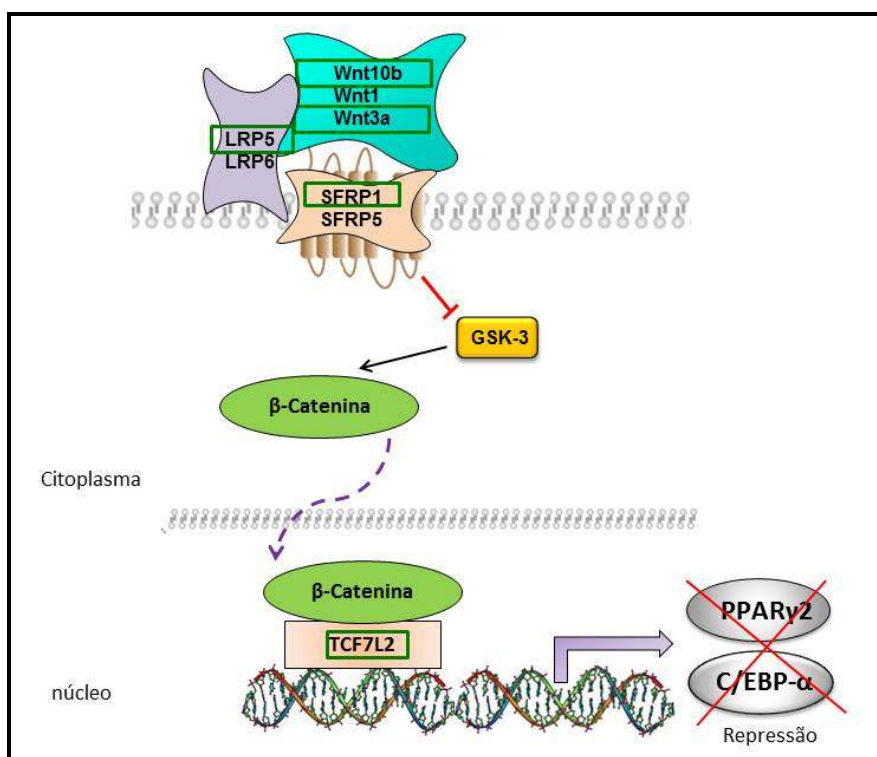


Figura 17: Ação da erva-mate nas principais isoformas presentes na ativação da via WNT no tecido adiposo por mecanismo dependente de β -catenina. Em destaque (verde) isoformas com expressão induzida após intervenção.

Além dos fatores e vias acima apresentados, evidências científicas demonstram que a expressão de proteínas como GATA e KLF influenciam diretamente no processo de adipogênese. As proteínas de ligação GATA-2 e GATA-3 são expressas nos pré-adipócitos e controlam a diferenciação deste em adipócito maduro. Além disso, estudos realizados por TONG et al. (2003 e 2005), demonstram que a contínua expressão de proteínas GATA nos pré-adipócitos inibem a diferenciação final destes, não se tornando desta forma adipócitos maduros. Estudos recentes mostram que a expressão de GATA-2 e GATA-3 suprimem a diferenciação dos adipócitos, o mecanismo envolve sua direta atuação em C/EBP- α e PPAR γ reprimindo a expressão dos mesmos (Tong, 2005). Corroborando estes achados um estudo realizado por HU & DAVIES (2009) utilizando berberine, um alcalóide derivado de diferentes ervas medicinais, mostrou que a mesma foi capaz de reprimir a expressão de C/EBP- α e PPAR γ através do aumento de *GATA-2* e *GATA-3* influenciando desta forma no processo da diferenciação final do adipócito.

Os dados obtidos em cultura celular indicam que a quercetina (250 μ g/mL) aumentou a expressão de *GATA-2* e *GATA-3*, entretanto a erva-mate, foi capaz de modular somente a expressão de *GATA-3*, apesar de esboçar um aumento em *GATA-2* (Tabela 13). Ao avaliarmos a expressão dos mesmos em tecido adiposo, observamos que há um aumento significativo na expressão de ambos nos animais que foram submetidos à intervenção com erva-mate, no entanto essa expressão é mais evidente em *GATA-3* (Tabela 14), ratificando, desta forma, nossos dados de cultura celular (Tabela 13). Deste modo, sugere-se que a expressão de *GATA-2* e *GATA-3* também contribua para a repressão de C/EBP- α e PPAR γ ², com conseqüente redução da adipogênese.

Diferentes efeitos para proteínas da família KLF tem sido reportados, envolvendo diferentes processos celulares que incluem: controle da proliferação, diferenciação e apoptose em distintos tecidos (Kaczynski et al., 2003; Suske et al., 2005). É bem caracterizado em modelos utilizando 3T3-L1, que KLF-2 é um inibidor de adipogênese e tem sido proposto que sua atuação ocorra através da inibição de PPAR γ . (Banerjee et al., 2003). Ao avaliarmos a expressão de proteínas da família KLF, observa-se que a erva-mate foi capaz de aumentar a expressão de *KLF-2* somente no tecido adiposo avaliado, que poderia também contribuir para a repressão de *PPAR γ* ² observada nesses animais (Tabela 14).

De forma complementar estudos revelam a proteína FOXC2 é estritamente expressa no tecido adiposo branco e marrom, e também está ligada ao processo de adipogênese (Gronning et al., 2002). Estudos realizados utilizando linhagens celulares de 3T3-L1 revelam que FOXC2 é capaz de reduzir o processo de adipogênese por inibir a indução de genes alvos do PPAR γ (Davis et al., 2004). Os resultados apresentados indicam que tanto rutina quanto quercetina exercem influência na expressão de *FOXC2*, no entanto esse efeito não é observado nos animais (Tabelas 13 e 14).

Após realizarmos a avaliação da expressão gênica na cultura celular de 3T3-L1 com erva-mate e seus principais compostos bioativos, fica evidente que cada composto atua de maneira distinta na repressão do processo de adipogênese. Ao avaliarmos os resultados oriundos da modulação da expressão gênica, verificou-se que os resultados mais expressivos foram obtidos com o extrato de erva-mate. Assim, pode-se afirmar que o efeito sinérgico entre os compostos bioativos presentes no extrato de *Ilex paraguariensis* seja responsável por tais resultados (Tabela 13). Dentre os compostos bioativos utilizados, os dados do presente trabalho indicam que o único a atuar na repressão de genes que são

indutores da diferenciação em adipócitos é o ácido clorogênico, pois este atua na repressão de *CREB-1*, *E2F1* e *C/EBP α* .

Desta forma, esses dados mostram, pela primeira vez na literatura que o ácido clorogênico, principal composto bioativo existente da erva-mate atua, reprimindo genes pró-adipogênicos, elucidando assim os resultados de diversos autores que sugerem que este poderia ter uma importante ação anti-obesidade atuando na redução da glicemia pós prandial, colesterol e triglicerídeos plasmáticos em ratos e camundongos (Herling et al., 1999; Sotillo & Hadley, 2002).

Muitos estudos associam a perda de peso evidenciada em animais com dieta hiperlipídica a um efeito termogênico devido à presença de cafeína na *Ilex paraguariensis*. Estudos em animais e humanos sugerem que o consumo de café pode reduzir o peso corpóreo e adiposidade, provavelmente pelo aumento da termogênese, oxidação lipídica e lipólise (Acheson, 2005; Westerterp-Plantenga et al., 2006). Estudos sugerem que a cafeína possa aumentar a concentração circulante de epinefrina em humanos, acelerando desta forma o metabolismo, caracterizando seu efeito termogênico e na lipólise. Outro mecanismo proposto para a ação da cafeína na lipólise sugere que a cafeína pode inibir a fosfodiesterase, reduzindo a degradação intracelular de cAMP, levando desta forma ao aumento na concentração de cAMP e subsequentemente aumento da lipólise (Acheson, 2005).

Um estudo recente realizado por nosso laboratório mostrou, no tecido adiposo de camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica, que a erva-mate exerce um efeito termogênico evidenciado pelo aumento na expressão de *UCP-1* (Arçari et al., 2009). De forma complementar outro estudo realizado por PANG et al. (2008), atribuíram a perda de

peso nos animais, após intervenção com erva-mate, a um aumento de *UCP-2* e *UCP-3*, também associadas ao processo de termogênese.

No entanto o presente estudo sugere que a perda de peso e gordura epididimal, nos animais submetidos a dieta hiperlipídica ocasionada pelo consumo de erva-mate, pode ser em parte atribuído em função de sua ação na modulação de diferentes genes que controlam o processo de diferenciação dos adipócitos, além do seu efeito termogênico anteriormente descrito (Pang et al., 2008; Arçari et al., 2009).

8. CONCLUSÃO

Diante do que foi exposto fica evidente que o processo de sinalização da insulina e de adipogênese estão intimamente relacionados e que a administração de erva-mate foi capaz de melhorar ambos. De uma forma geral nossos dados mostram uma melhora na resposta da sinalização à insulina após a intervenção com erva-mate visto que a mesma atuou em diferentes genes responsáveis pela ativação da AKT, o que foi comprovado de forma sistêmica pela melhora no K_{ITT} . Além disso, em resposta a ativação da AKT, houve uma redução da translocação nuclear de FOXO1, que culminou em uma redução da expressão de genes ligados ao processo de gliconeogênese no tecido hepático, visualizado pela repressão significativa em *PEPCK* e *G6Pase*.

A melhora na resposta da sinalização a insulina observada neste trabalho pode ser parcialmente atribuída a uma redução na produção das citocinas pró-inflamatórias em especial o TNF- α , caracterizado por uma redução na translocação nuclear de NF-kB. Além disso, nosso trabalho demonstra, pela primeira vez na literatura, que a erva-mate é capaz de modular de forma específica diferentes genes relacionados com a sinalização da insulina via AKT, melhorando desta forma o quadro glicêmico observado ao final da intervenção. A redução na produção das citocinas acima mencionadas, por sua vez, está intimamente relacionada com a redução do peso corpóreo e da quantidade de gordura epididimal.

A erva-mate demonstrou-se eficaz na redução de peso e gordura epididimal, por atuar diretamente durante o processo de adipogênese. Foi possível também demonstrar que a erva-mate e alguns de seus principais compostos bioativos, atuam de forma expressiva na etapa de diferenciação dos adipócitos. Além disso, observou-se que os compostos bioativos presentes na erva-mate atuam modulando distintos genes relacionados ao processo de

diferenciação do adipócito, sendo o ácido clorogênico o único composto a atuar reprimindo genes pró-adipogênicos. Estes resultados demonstram que o sinergismo entre os diferentes compostos bioativos presentes na erva-mate é responsável por sua ampla ação na modulação de genes relacionados ao processo de adipogênese.

O trabalho ainda sugere que a erva-mate possa atuar de maneira mais expressiva na redução da adipogênese através da via WNT, visto pelo aumento da expressão de diferentes genes associados a esta via. O resultado final dessa ativação é a repressão significativa de *PPAR γ ²* e *C/EBP α* , que contribui para elucidar a redução do peso corpóreo e da gordura epididimal observada nos animais submetidos à dieta hiperlipídica tratados com erva-mate (1,0g/kg) durante 60 dias, que por sua vez reduz a produção de citocinas, em especial o TNF- α , contribuindo parcialmente para a melhora do quadro de sinalização a insulina exposto acima.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 2004; 117:421–426.
- Adams TE, McKern NM & Ward CW. Signalling by the type 1 insulin-like growth factor receptor: interplay with the epidermal growth factor receptor. *Growth Factors* 2004; 22 89–95.
- Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JAO. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic β -cells of streptozotocintreated diabetic rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2006; 4:64-74.
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:327-32.
- Ailhaud G, Hauner H. Development of white adipose tissue. In: Bray AGB, editor. *Handbook of obesity: etiology and pathophysiology*. New York, USA: Marcel Dekker; 2004.
- Alessi, D. R. et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol*. 1997; 7: 261–269.
- Altomare, D.A., K. Guo, J.Q. Cheng, G. Sonoda, K. Walsh, J.R. Testa. Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene*. 1995; 11: 1055–1060.
- Altomonte J, Richter A, Harbaran S, Suriawinata J, Nakae J, Thung SN. Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285:E718–E728.
- Amemiya-Kudo M., H. Shimano, A.H. Hasty, N. Yahagi, T. Yoshikawa, T. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, J. Osuga, K. Harada, T. Gotoda, R. Sato, S. Kimura, S. Ishibashi, N.Yamada, Transcriptional activities of nuclear SREBP- 1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *American Journal of Physiology*. 2002; 6:1220–1235
- Andersen T, Fogh J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *J Hum Nutr Diet*. 2001; 14(3):243-50.
- Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2001;78:145–149
- Arango NA, Szotek PP, Manganaro TF, Oliva E, Donahoe PK, Teixeira J. Conditional deletion of beta-catenin in the mesenchyme of the developing mouse uterus results in a switch to adipogenesis in the myometrium. *Dev Biol* 2005;288:276–283.
- Araújo EP, De Souza CT, Ueno M, Cintra DE, Bertolo MB, Carvalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology*. 2007;148:5991-7.

- Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, de Souza MF, Saad MJ, Bastos DH, Gambero A, Carvalho Pde O, Ribeiro ML. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity* (Silver Spring). 2009 Dec;17(12):2127-33.
- Arner P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med*. 1995; 27:435-8.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
- Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, et al. Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J Biol Chem*. 1997;272:2551-8.
- Banerjee, S. S., M. W. Feinberg, M. Watanabe, S. Gray, R. L. Haspel, D. J. Denking, R. Kawahara, H. Hauner, and M. K. Jain. The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J. Biol. Chem*. 2003; 278:2581–2584.
- Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116(3):590-7.
- Bassoli BK, Cassolla P, Borba-Murad GR, Constantin J, Salgueiro-Pagadigorria CL, Bastie CC, Nahle Z, McLoughlin T, Esser K, Zhang W, Unterman T. FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 2005; 280:14222–14229.
- Bastos DHM, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules* 2007; 12:423–32.
- Bayon Y, Ortiz MA, Lopez-Hernandez FJ, Gao F, Karin M, Pfahl M, Piedrafita FJ. Inhibition of I κ B kinase by a new class of retinoid-related anticancer agents that induce apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(3):1061-74.
- Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: An adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab*. 2002; 13:84–89.
- Bernstein HG, Keilhoff G, Reiser M, Freese S, Wetzker R. Tissue distribution and subcellular localization of a G-protein activated phosphoinositide 3-kinase. An immunohistochemical study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1998; 44:973–983
- Birnbaum MJ. Turning down insulin signaling. *J Clin Invest* 2001;108:655-9.
- Bracesco N, Dell MRA, Behtash S, Glugliucci A. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Méd*. 2003; 9(3):379-387.
- Brady MJ, Nairn AC, Saltiel AR. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J Biol Chem* 1997;272:29698-703.

- Bulló M, García-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res.* 2003; 11(4):525-31.
- Campos AM, Escobar J, Lissi EA. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. *J. Braz. Chem. Soc.* 1996; 7:43-49.
- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004;84:277-359.
- Cantrell, D.A. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. *J. Cell Sci.*, 2001; 114, 1439-1445.
- Carvalho JB, Ribeiro EB, Araujo EP, et al. Selective impairment of insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia.* 2003;46:1629-40.
- Chan, T.O. & Tsichilis, P.N. PDK2: a complex tail in one Akt. *Science's* 2001; 66, 1-5.
- Chandra S, Mejia EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camelia sinensis*) teas. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52:3583-3589.
- Chattopadhyay Mohar, Elzbieta S. Selinger, Lisa M. Ballou and Richard Z. Lin. Ablation of PI3K p110- α Prevents High-Fat Diet-Induced Liver Steatosis. *Diabetes* 2011; 5: 1483-1492
- Chen G., G. Liang, J. Ou, J.L. Goldstein, M.S. Brown, Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 11245–11250.
- Chen, W., et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes Dev.* 2001; 15:2203–2208.
- Cho, H., Thorvaldsen, J., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M.. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 2001a; 276:38349–38352.
- Cho, H., et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science.* 2001b; 292:1728–1731.
- Cohen P. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2006; 7 867–873.
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005; 51:117-23.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-9.
- Csehi SB, Mathieu S, Seifert U, Lange A, Zweyer M, Wernig A, Adam D. Tumor necrosis factor (TNF) interferes with insulin signaling through the p55 TNF receptor death domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 329(1):397-405.

- Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo a gordura. Os ácidos graxos. São Paulo:Manole; 2002. p.163-72.
- Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(4):1865-1868.
- Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes.* 2003; 52:642–649.
- Davis KE, Moldes M, Farmer SR The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41):42453-61. Epub 2004 Jul 23.
- DeFronzo RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl.* 2004;(143):9-21.
- Desvergne, b., l. michalik, w. wahli.. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physio X.* Deng, L.M. Cagen, H.G. Wilcox, E.A. Park, R. Raghow, 2006.
- Eberlé D, Clément K, Meyre D, Sahbatou M, Vaxillaire M, Le Gall A, Ferré P, Basdevant A, Froguel P, Fougelle F. SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. *Diabetes.* 2004; 53(8):2153-7.
- Edwards, p.a. d. tabor, h.r. kast, a.venkateswaran.. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta.*, 2000; 1529: 103–113.
- Elam M.B., Regulation of the rat SREBP-1c promoter in primary rat hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 256–262. 1 Rev.,86: 465-514.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999;283:1544-8.
- Espósito P.G, D’Alessio M.A, Barbieri M. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? *Diabetes Metab.* 1999; 25,298-306.
- Evans D., J. Aberle, D. Wendt, A. Wolf, U. Beisiegel, and W. A. Mann, “A polymorphism, L162V, in the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) gene is associated with lower body mass index in patients with non-insulindependent diabetes mellitus,” *Journal of Molecular Medicine*, 2001; vol. 79, no. 4, pp. 198–204.
- Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Apr;10(2):165-73.
- Fallon E, Zhong L, Furne JK, Levitt M. A mixture of extracts of black and green teas and mulberry leaf did not reduce weight gain in rats fed a high-fat diet. *Altern Med Rev.* 2008; 13(1):43-9.
- Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li CS, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R. GLP-1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 2003; 144:5149–5158
- Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006;4(4):263-73.

- Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res.* 2003; 35:147-52.
- Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven south american *Ilex* species. *Fitoterapia.* 2001; 72:774-778.
- Flavell D. M., I. Pineda Torra, Y. Jamshidi et al., "Variation in the PPAR α gene is associated with altered function in vitro and plasma lipid concentrations in type II diabetic subjects," *Diabetologia*, 2000; vol. 43, no. 5, pp. 673–680.
- Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem* 1992;267:22171-7.
- Fox KE, Fankell DM, Erickson PF, Majka SM, Crossno JT Jr, Klemm DJ. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J Biol Chem.* 2006 Dec 29;281(52):40341-53.
- Francischi RP, Pereira LO, Lancha Jr AH. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. *Rev Paul Educ Fís* 2001; 15:117-40.
- Freitas CS, Klopfer M, Vieira P, Francischi R, Santos R, Pereira L. Perfil das mulheres obesas que procuram o programa de atividade física da Escola de Educação Física e Esporte. In: V Congresso de Iniciação Científica e III Simpósio de Pós Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998:87-8.
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83:847–850.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998; 395:763–770.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima and Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2004; 114:1752–1761.
- Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest.* 2003 Jul;112(2):197-208.
- Gomis RR, Alarcon C, Nadal C, Van Poznak C, Massague J: C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytosstatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 2006, 10:203-214.
- Goldfarb B. ADA/EASD statement cast critical eye on metabolic syndrome: risk may be no more than the some of the parts. *DOC News.* 2005; 2 (10): 1.

- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006;38:320–323.
- Gronning LM, Cederberg A, Miura N, Enerbäck S, Taskén K. Insulin and TNF alpha induce expression of the forkhead transcription factor gene *Foxc2* in 3T3-L1 adipocytes via PI3K and ERK 1/2-dependent pathways. *Mol Endocrinol.* 2002 Apr;16(4):873-83.
- Gugliucci A, Stahl AJ. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995; 35:47-56
- Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of Human LDL in vivo. *Biochem. and Biophys. Res.* 1996; 224:338-344.
- Gustafson B, Smith U Cytokines promote WNT signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2006; 281:9507–9516
- Guzik TJ, Mangalat D, Korbust R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57:505-28
- Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276(21):18464-71.
- Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Mediumchain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res.* 2003;11(6):734-44.
- Hanke S & Mann M The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Molecular and Cellular Proteomics* 2009; 8 519–534.
- Harrison K. W., , S. D., and MacDougald, O. A. Regulation of WNT signaling during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 30998–31004
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha-and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996;271:665-8.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosisfactor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259:87–91.
- Hsueh WA, Law R. The central role of fat and effect of peroxisome proliferator-activated and cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2003; 92:3-9
- Hu Y, Davies GE. Berberine increases expression of GATA-2 and GATA-3 during inhibition of adipocyte differentiation. *Phytomedicine.* 2009 Sep;16(9):864-73.
- Isomaa B, Henricsson M, Almgren P, Tuomi T, Taskinen MR, Groop L. The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. *Diabetologia.* 2001; 44(9):1148-54.
- Jebb SA. Obesity: from molecules to man. *Proc Nutr Soc.* 1999; 58:1-14.
- Jia S, Liu Z, Zhang S, et al Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature* 2008;454:776–779

- Kaczynski, J., T. Cook, and R. Urrutia. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol.* 2003; 4:206.
- Kahn AM, Seidel CL, Allen JC, O'Neil RG, Shelat H, Song T. Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1993; 22(5):735-42.
- Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A, Tsunoda T, Takahashi A, Kashiwagi A, Tanaka Y, Babazono T, Matsuda M, Kaku K, et al. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* 2004;75:832– 843.
- Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med.* 1989;149(7):1514-20.
- Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 1999;104:733-41.
- Kitamura T, Ogawa W, Sakaue H, et al. Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol Cell Biol.* 1998;18:3708-17.
- Klemm, D. J., Roesler, W. J., Boras, T., Colton, L. A., Felder, K., and Reusch, J. E.-B. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 917–923
- Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem.* 1996; 271:31372-8.
- Kopan R, Ilagan MXG The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009; 137:216–233
- Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, et al. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol.* 1998;18:6971-82.
- Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by WNT signaling. *J Clin Invest* 2006;116:1202–1209.
- Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, Johnson CL. Increasing prevalence of overweight among US adults: The national health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA* 1994; 272:205-211.
- Lacquemant, C., F. Lepretre, I. Pineda Torra et al., “Mutation screening of the PPAR α gene in type 2 diabetes associated with coronary heart disease,” *Diabetes and Metabolism.* 2000; 393–401,.
- Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 2004; 30(4):294-309.
- Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ Glucagonlike peptide-1 receptor signaling modulates -cell apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278:471–478

- Libermann T. A. and Baltimore D. Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF-KB Transcription Factor. *Molecular and Cellular biology*, 1990, p. 2327-2334
- Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 2000; 6:385-94.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
- MacDonald PE, Joseph JW, Yau D, Diao J, Asghar Z, Dai F, Oudit GY, Patel MM, Backx PH, Wheeler MB. Impaired glucose-stimulated insulin secretion, enhanced intraperitoneal insulin tolerance, and increased beta-cell mass in mice lacking the p110gamma isoform of phosphoinositide 3-kinase. *Endocrinology*. 2004 Sep;145(9):4078-83.
- MacDougald OA, Mandrup S. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab*. 2002 Jan-Feb;13(1):5-11.
- Mandrup S, Lane MD. Regulating adipogenesis. *J Biol Chem*. 1997;272:5367-5370.
- Manolagas SC, Almeida M. Gone with the WNTs: Beta-catenin, T-cell factor, Forkhead box O and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid and glucose metabolism. *Mol Endocrinol*. 2007; 21(11):2605-14
- Martinez JA. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc Nutr Soc*. 2000 ;59:337-45.
- Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DH, Carvalho PD. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *Br J Nutr*. 2008; 19:1-6.
- Matsumoto M, Pocai A, Rossetti L, Depinho RA, Accili D. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor foxo1 in liver. *Cell Metab*. 2007; 6:208–216.
- Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2004; 24:29–33.
- Mattison R, Jesen M. The adipocyte as an endocrine cell. *Curr Opin Endocrinol Diab* 2003;10:317-21.
- McNeill AM, Rosamond WD, Girman CJ, Golden SH, Schmidt MI, East HE, et al. The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care* 2005;28:385-90.
- Michael, MD., Kulkarni, RN., Postic, C., Previs, SF., Shulman, GI., Magnuson, MA. and Kahn, CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell*. 2000; 6, 87–97
- Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J Jr, Carvalho PD, Cerutti SM, Bastos DH, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. 2008; 24(4):375-81.
- Miron M, Verdu J, Lachance PE, Birnbaum MJ, Lasko PF, Sonenberg N. The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*. 2001;3:596-601.

Miron M, Verdu J, Lachance PE, Birnbaum MJ, Lasko PF, Sonenberg N. The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signaling and cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 2001;3:596-601.

Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Panahloo A, Goodrick S, Coppack SW, Yudkin JS. Relationships between plasma leptin and insulin concentrations, but not insulin resistance, in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1997;14:376-80.

Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, et al. Depot -related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*. 1998; 47:1384-90.

Monteiro CA, Mondini L, Souza ALM, Popkin BM. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: Monteiro CA, editor. *Velhos e novos males da saúde no Brasil – a evolução do país e de suas doenças*. São Paulo: Hcitech-NUPENS/USP 1995; 247-255.

Mora A, Lipina C, Tronche F, Sutherland C, Alessi DR Deficiency of PDK1 in liver results in glucose intolerance, impairment of insulin-regulated gene expression and liver failure. *Biochem J*. 2005 Feb 1;385(Pt 3):639-48.

Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr*. 2000;130:3116S-3121S.

Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs III WH, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell*. 2003; 4:119–129.

Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D. L. & Accili, D. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest*. 2001; 108, 1359–1367.

Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 2004; 84:623-47.

Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption *J Agric Food Chem*. 2002; 50(20):5735-5741.

Nerlov C: The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol* 2007, 17:318-324.

Nicasio P, Aguilar-Santamaría L, Aranda E, Ortiz S, González M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phytother Res*. 2005; 19(8):661-4.

Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*. 2000;130(12):3122-6.

O'Neill LAJ, Kaltschmidt C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *TINS* 1997;20:252-8.

Okamoto Y, Ogawa W, Nishizawa A, Inoue H, Teshigawara K, Kinoshita S, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Sakaue H, Noda T, Kasuga M. Restoration of glucokinase expression in the liver normalizes postprandial glucose disposal in mice with hepatic deficiency of PDK1. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):1000-9.

Oliveira DM, Freitas HS, Souza MF, Arçari DP, Ribeiro ML, Carvalho PO, Bastos DH. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extract Decreases Intestinal SGLT1 Gene

Expression but Does Not Affect Other Biochemical Parameters in Alloxan-Diabetic Wistar Rats. *J Agric Food Chem.* 2008; [Epub ahead of print]

Pang J, Choi Y, Park T. *Arch Biochem Biophys.* Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. 2008 Aug 15;476(2):178-85.

Pantoja C, Huff JT, Yamamoto KR. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell* 2008; 19:4032–4041

Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med.* 1998; 128:127-37.

Pénicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition* 2000;16:903-8.

Pereira LO, Francischi RP, Klopfer M, Sawada LA, Santos R, Vieira P. Obesidade e sua Implicações – Ação da Atividade Física e Controle Nutricional. *Rev Bras Nutr Clin.* 1999a;14:9-17.

Pereira LO, Klopfer M, Vieira P, Francischi RP, Camargo RS, Freitas C. The evaluation of the best strategy to increase muscle mass and improve health in obese women. *Proc Nutr Soc.* 1999b; 59:99.

Pauli JR, Ropelle ER, Cintra DE, Carvalho-Filho MA, Moraes JC, De Souza CT, Velloso LA, Carvalheira JB, Saad MJ. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. *J Physiol.* 2008 15;586(2):659-71.

Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann Rev Physiol* 1992;54:885-909.

Pittler MH, Schmidt K, Ernst E. Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. *Obes Rev.* 2005; 6(2):93-111.

Pond C. Ecology of storage and allocation of resources: animals. *Encyclopedia of Life Sciences* 2001;1-5.

Postic C, Dentin R, Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 2004; 30: 398–408.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001; 286:327-34.

Previs S. F., D. J. Withers, J.-M. Ren, M. F. White, and G. I. Shulman, “Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo,” *Journal of Biological Chemistry.* 2000; 50: 38990– 38994.

Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, and Spiegelman BM. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* 1999; 286: 1368–1371.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente FI. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1alpha interaction. *Nature.* 2003; 423:550–555.

- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51
- Repa, J.J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J.M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M.S. Brown, J.L. Goldstein, D.J. Mangelsdorf. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.*, 2000; 14: 2819–2830.
- Rodriguez de Sotillo DV, Hadley M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J Nutr Biochem* 2002;13: 717–726
- Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:885–896.
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P and Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1293-1307.
- Ross SE, Erickson RL, Gerin I, DeRose PM, Bajnok L, Longo KA, Misek DE, Kuick R, Hanash SM, Atkins KB, Andresen SM, Nebb HI, Madsen L, Kristiansen K, MacDougald OA. Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of WNT signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(16):5989-99.
- Ross SE, Erickson RL, Hemati N, MacDougald OA: Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol* 1999, 19:8433-8441.
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by WNT signaling. *Science* 2000;289:950–953.
- Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem.* 2003; 278(46):45777-84.
- Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1992;90:1839-49.
- Samuel VT, Choi CS, Phillips TG, Romanelli AJ, Geisler JG, Bhanot S. Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes.* 2006; 55:2042–2050.
- Sarruf DA, Yu F, Nguyen HT, Williams DL, Printz RL, Niswender KD, Schwartz MW. Expression of PPAR{gamma} in key neuronal subsets regulating glucose metabolism and energy homeostasis. *Endocrinology.* 2008; [Epub ahead of print]
- Saxena R, Gianniny L, Burt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjogren M, Florez JC, Almgren P, Isomaa B, Orho-Melander M, et al. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes* 2006;55:2890–2895.

- Schinella GR, Troiani G, Dávila V, Buschiazzo PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2000; 269:357-360.
- Schoonjans K., B. Staels, and J. Auwerx, "Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression," *Journal of Lipid Research*, vol. 37, no. 5, pp. 907–925, 1996.
- Schopfer FJ, Lin Y, Baker PR, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, et al. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(7):2340-5.
- Scott D.K., J.J. Collier, T.T. Doan, A.S. Bunnell, M.C. Daniels, D.T. Eckert, R.M. O'Doherty, A modest glucokinase overexpression in the liver promotes fed expression levels of glycolytic and lipogenic enzyme genes in the fasted state without altering SREBP-1c expression, *Mol. Cell. Biochem.* 254 (2003) 327–337.
- Shen YN, Kim YM, Yun CH, Moon YS, Kim SH. Transcriptional activation of pref-1 by E2F1 in 3T3 L1 cells. *BMB Rep.* 2009 Oct 31;42(10):691-6.
- Shepherd PR, Navé BT, Siddle K. Involvement of PI 3-kinase in stimulation of glucose transport and recruitment of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Soc Trans.* 1995; 23(2):201S.
- Siebenlist U. NF- κ B/I κ B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:7-13.
- Sopasakis VR, Liu P, Suzuki R, et al. Specific roles of the p110 α isoform of phosphatidylinositol 3-kinase in hepatic insulin signaling and metabolic regulation. *Cell Metab* 2010;11:220–230
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008;453(7196):783-7.
- Spiegelman BM. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* 1998 Apr;47(4):507-14. Review.
- Srujana R, Mary ADF, Clifton A.B. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem.* 2007;19:717-726.
- Standl E, Baumgartl HJ, Fuchtenbusch M, Stemplinger J. Effect of acarbose on additional insulin therapy in type 2 diabetic patients with late failure of sulphonylurea therapy. *Diabetes Obes Metab* 1999;1:215-20.
- Steemburgo T, Dall'alba V, Gross JL, Azevedo MJ. Fatores dietéticos e síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007; 51(9):1425-33.
- Steensberg A., C. Keller, R. L. Starkie, T. Osada, M. A. Febbraio, and B. K. Pedersen, "IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle," *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Dec;283(6):E1272-8
- Stein, R.C. & Waterfield, M.D. PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol. Med. Today.* 2000; 6, 347-357.

Subauste AR, Burant CF. Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293:E159–E164.

Suske, G., E. Bruford, and S. Philipsen. 2005. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* 85:551–556.

Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996;351:191-9.

Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* 2002 Jul;51(7):2045-55.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 85-96.

Tong, Q., Tsai, J., Hotamisligil, G.S., GATA transcription factors and fat cell formation. *Drug News Perspect.* 2003;16, 585–588.

Tong, Q., Tsai, J., Tan, G., Dalgin, G., Hotamisligil, G.S., Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25, 706–715.

Tontonoz P., D.J. Mangelsdorf, Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease, *Mol. Endocrinol.* 17 2003; 985–993.

Trumper A, Trumper K, Trusheim H, Arnold R, Goke B, Horsch D Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol Endocrinol* 2001; 15:1559–1570

Tsao TS, Lodish HF, Fruebis J. ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 440:213–221.

Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, Yechoor VK, Taniguchi CM, Kriauciunas KM, Cypess AM, Niinobe M, Yoshikawa K, Patti ME, et al. Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nat Cell Biol* 2005;7:601–611.

Unger RH. The physiology of cellular liporegulation. *Annu. Rev. Physiol.* 2003; 65:333–347.

Van Dijk AE, Olthof MR, Meeuse JC, Seebus E, Heine RJ, van Dam RM. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. *Diabetes Care.* 2009 Jun;32(6):1023-5

Van Obberghen E. Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia.* 1994; Suppl 2:S125-34.

Venugopal, J., Hanashiro, K. and Nagamine, Y. Regulation of PAI-1 gene expression during adipogenesis. *J. Cell Biochem.* 2007; 101, 369-380.

Vohl, M.-C., P. Lepage, D. Gaudet et al., “Molecular scanning of the human PPAR α gene: association of the L162V mutation with hyperapobetalipoproteinemia,” *Journal of Lipid Research.* 2000; vol. 41, no. 6, pp. 945–952,.

- Wang Y, Kim KA, Kim JH, Sul HS Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr* 2006; 136:2953–2956
- Weiss MJ, Orkin SH GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol.* 1995; 23: 99–107
- White M F, “IRS proteins and the common path to diabetes,” *American Journal of Physiology.* 2002; vol. 283, no. 3, pp. E413–E422,.
- White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; 40(suppl 2):S2-17.
- White MF. the IRS-signaling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol cell biochem.* 1998; 182:3-11.
- Whitehead J. P., P. Humphreys, A. Krook, et al., “Molecular scanning of the insulin receptor substrate 1 gene in subjects with severe insulin resistance: detection and functional analysis of a naturally occurring mutation in a YMXM motif,” *Diabetes.* 1998; vol. 47, no. 5, pp. 837–839.
- WHO – World Health Organization. Obesity – preventing and managing the global epidemic. 1998.
- Winkler G, Kiss S, Ketszhelyi L, Sapi Z, Ory I, Salamon F, et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF-alfa) protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alfa, soluble serum TNF receptor-2 concentrations and C-peptide level. *Eur J Endocrinol.* 2003;149:129-35.
- Wohlens M, Nascimento CM, Xavier RA, Ribeiro EB, Silveira VL. Participation of corticosteroids and effects of indomethacin on the acute inflammatory response of rats fed n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets. *Inflammation.* 2003;27(1):1-7.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell.* 1999;3(2):151-8.
- Wu, J., S. V. Srinivasan, J. C. Neumann, and J. B. Lingrel.. The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes. *Biochemistry.* 2005; 44:11098–11105.
- Xie W, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Oleate-induced formation of fat cells with impaired insulin sensitivity. *Lipids.* 2006;41(3):267-71.
- Xin W, Huang DW, Xiao H. High efficiency DNA mutagenesis mediated by using in vitro transcription, DNase I digestion, and RT-PCR. *Biotechniques.* 2004; 37(4):556-560.
- Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 2005; 280:1457–1464.
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 2001; 293:1673-7.

Yudkin JS, Yajnik CS, Mohamed-Ali V, Bulmer K. High levels of circulating proinflammatory cytokines and leptin in urban, but not rural, Indians. A potential explanation for increased risk of diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care*. 1999; 22(2):363-4

Zecchin H.G., Carvalheira J. B. C., Saad M.J.A., Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2004;4:574-89.

Zhang B, Szalkowski D, Diaz E, Hayes N, Smith R, Berger J. Potentiation of insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by thiazolidinedione-derived antidiabetic agents in Chinese hamster ovary cells expressing human insulin receptors and L6 myotubes. *J Biol Chem*. 1994; 14;269:25735-41.

Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser270 to promote insulin resistance in response to TNF-alpha signaling through IKK2. *J Biol Chem*. 2008; [Epub ahead of print]

Zhang W, Patil S, Chauhan B, Guo S, Powell DR, Le J et al. FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem*. 2006; 281: 10105–10117.

10. ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer do Comitê de ética em pesquisa.



Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 14 de Abril de 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Avaliação da erva mate (Ilex paraguariensis) na adipogenese e sinalização da insulina.

Autor(es): Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro; Demetrius Paiva Arçari

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO


Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou expressamente a pendência no dia **14/04/2009** do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Atenciosamente,


Maria Bétania de Oliveira Garcia
Vice - Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - USF
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036



Anti-inflammatory effects of *yerba maté* extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity

Demétrius P. Arçari^a, Waldemar Bartchewsky Jr.^a, Tanila W. dos Santos^a, Karim A. Oliveira^a, Carlorine C. DeOliveira^a, Érica M. Gotardo^a, José Pedrazzoli Jr.^a, Alessandra Gambero^a, Lucio F.C. Ferraz^b, Patricia de O. Carvalho^b, Marcelo L. Ribeiro^{a,*}

^a Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brazil

^b Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 August 2010
Received in revised form
21 December 2010
Accepted 5 January 2011

Keywords:
Insulin resistance
Yerba maté
Inflammation

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effects of *yerba maté* extract upon markers of insulin resistance and inflammatory markers in mice with high fat diet-induced obesity. The mice were introduced to either standard or high fat diets. After 12 weeks on a high fat diet, mice were randomly assigned to one of the two treatment conditions, water or *yerba maté* extract at 1.0 g kg⁻¹. After treatment, glucose blood level and hepatic and soleus muscle insulin response were evaluated. Serum levels of TNF- α and IL-6 were evaluated by ELISA, liver tissue was examined to determine the mRNA levels of TNF- α , IL-6 and iNOS, and the nuclear translocation of NF- κ B was determined by an electrophoretic mobility shift assay. Our data show improvements in both the basal glucose blood levels and in the response to insulin administration in the treated animals. The molecular analysis of insulin signalling revealed a restoration of hepatic and muscle insulin substrate receptor (IRS)-1 and AKT phosphorylation. Our data show that the high fat diet caused an up-regulation of the TNF- α , IL-6, and iNOS genes. Although after intervention with *yerba maté* extract the expression levels of those genes returned to baseline through the NF- κ B pathway, these results could also be secondary to the weight loss observed. In conclusion, our results indicate that *yerba maté* has a potential anti-inflammatory effect. Additionally, these data demonstrate that *yerba maté* inhibits hepatic and muscle TNF- α and restores hepatic insulin signalling in mice with high fat diet-induced obesity.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The high prevalence of obesity is a major threat to public health due to the causal role it plays in the predisposition to complications such as atherosclerosis, hepatic steatosis, and type 2 diabetes (Berg and Scherer, 2005). Such conditions are closely associated with chronic inflammation, characterised by abnormal cytokine production, increased acute-phase reactants and other mediators, and activation of a network of inflammatory signalling pathways (Wellen and Hotamisligil, 2005). There is growing evidence that a large component of obesity-associated pathophysiology may stem from a low-grade pro-inflammatory state. The manifestation of this pro-inflammatory state includes increased production of pro-inflammatory molecules, such as TNF- α , monocyte chemoat-

tractant protein 1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in liver, adipose, and muscle tissue. An increased activation of inflammatory signalling pathways, such as the nuclear factor- κ B pathway, is also involved (NF- κ B) (Weisberg et al., 2003; Cinti et al., 2005).

The cytokine gene expression is initiated following the activation of the NF- κ B signal transduction pathway, which is mediated by TNF- α (Andreaskos et al., 2005). NF- κ B itself is a heterodimeric transcription factor that is retained in the cytosol in its inactive state as a complex with a set of inhibitory proteins designated I κ B. Upon activation of NF- κ B signalling, the I κ B complex is phosphorylated by I κ B kinase- β (IKK β). Free NF- κ B is then able to translocate to the nucleus where it binds to specific promoter elements resulting in the activation of several genes, including those for inflammatory proteins (Andreaskos et al., 2005). Additionally, activation of the TNF receptor results in serine phosphorylation of insulin receptor substrates (IRSs) via Ikk β , which attenuates its ability to transduce insulin-mediated cellular events (Hotamisligil, 2006).

* Corresponding author at: Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia, Universidade São Francisco, Av. São Francisco de Assis, 218, Jd. São José, Bragança Paulista, SP, Brazil. Tel.: +55 11 2454 8982; fax: +55 11 4034 1825.
E-mail address: marcelo.ribeiro@saofrancisco.edu.br (M.L. Ribeiro).

Insulin is the most potent anabolic hormone known and is essential for appropriate tissue development, growth, and the maintenance of whole-body glucose homeostasis. Insulin resistance occurs when normal circulating concentrations of the hormone are insufficient to regulate these processes appropriately (Pessin and Saltiel, 2000). In the presence of insulin, the insulin receptor autophosphorylates and catalyses several intracellular substrates, including IRS proteins (Taniguchi et al., 2006). These substrates are involved in the activation of two main signalling pathways: the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) protein kinase B/Akt pathway, which is responsible for most of the metabolic actions of insulin, and the Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, which regulates the expression of some genes and participates in glucose transport (González-Yanes et al., 2005).

It has been reported that natural products may improve glucose metabolism and insulin action (Broadhurst et al., 2000). *Yerba maté* (*Ilex paraguariensis*), one of the most widely consumed plants in South America, has been shown to have some beneficial effects on glucose absorption and on metabolism (Oliveira et al., 2008). Additionally, *maté* beverages have been reported to have various biological activities, which have been attributed to its high polyphenol content. Along with polyphenols, such as flavonoids (quercetin and rutin) and phenolic acids (chlorogenic and caffeic acids), *yerba maté* is also rich in caffeine and saponins (Bastos et al., 2007). Recently published evidence has shown some beneficial effects of *I. paraguariensis*, including antioxidant activity (Miranda et al., 2008), a protective effect against induced DNA damage (Miranda et al., 2008), vasodilatation effects (Stein et al., 2005), inhibition of glycation and atherosclerosis (Mosimann et al., 2006), thermogenic effects (Pomilio et al., 2002), and anti-obesity effects (Arçari et al., 2009).

Based on previous data showing that *yerba maté* extract has potent anti-obesity activity and a modulatory effect on the expression of several genes related to obesity in white adipose tissue *in vivo* (Arçari et al., 2009), the aim of the present study was to evaluate the effects of *yerba maté* extract upon markers of insulin resistance and inflammatory markers in mice with high fat diet-induced obesity.

2. Materials and methods

2.1. Maté tea preparation

The roasted *yerba maté* extract was prepared by dissolving lyophilised instant maté tea (Leao Jr. Curitiba-PR, Brazil) in water using a homogeniser and was prepared fresh each day. The aqueous maté tea and vehicle (pure water) were administered by intragastric gavage. The extract contained 348.80 ± 16.35 mg/g of phenolic compounds, 5.82 ± 0.17 mg/g of caffeine, 32.25 ± 0.50 mg/g of 5-caffeoylquinic acid, 0.58 ± 0.01 mg/g of caffeic acid, and 3.30 ± 0.35 mg/g of theobromine (Arçari et al., 2009).

2.2. Animals and diets

Thirty 6-week-old male Swiss strain mice (Sw/Uni) (27.3 ± 0.4 g) free of specific pathogens were obtained from CEMIB (State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil). The experiments were performed in accordance with the principles outlined by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and received approval from the Ethics Committee of São Francisco University, Bragança Paulista, SP, Brazil. The animals were maintained on a 12 h:12 h artificial light:dark cycle and housed in individual cages.

After random selection, mice were introduced to either standard (SD, $n = 10$) or high fat diets (HFD, $n = 20$) for sixteen weeks. The compositions of experimental diets are shown in Table 1. After the first eight weeks on a high fat diet, the obesity status was observed, and the animals were randomly divided into two treatment subgroups. The first group (HFD + Mt, $n = 10$) received an aqueous extract of roasted *yerba maté* extract (1.0 mg kg⁻¹), and the other group received the vehicle (HFD, $n = 10$) for eight weeks. The compositions of the experimental diets have been described previously (Arçari et al., 2009). At the end of sixteen weeks, mice were anaesthetised with 1 μ l/g of body weight (1:1 xylazine 2%–ketamine 10%) and blood samples were collected from the heart. Transcardiac perfusion with 70 ml isotonic saline solution (4 °C) was then carried out over a period of 6 min.

Table 1
Experimental diets composition.

	Standard diet		High fat diet	
	g kg ⁻¹	kcal kg ⁻¹	g kg ⁻¹	kcal kg ⁻¹
Cornstarch (Q.S.P.)	397.5	1590	115.5	462
Casein	200	800	200	800
Sucrose	100	400	100	400
Dextrinated starch	132	528	132	528
Lard	–	–	312	2808
Soybean oil	70	630	40	360
Cellulose	50	–	50	–
Mineral mix	35	–	35	–
Vitamin mix	10	–	10	–
L-Cystine	3	–	3	–
Choline	2.5	–	2.5	–
Total	1000	3948	1000	5358

2.3. Blood glucose levels and insulin tolerance test

After 6 h of fasting, mice were anaesthetised with an intraperitoneal 4 μ l/g injection of xylazine/ketamine of body weight (1:1 xylazine 2%–ketamine 10%), and blood samples were collected from the tail. Glucose was measured using the glucose oxidase method. Insulin (1.5 U/kg) was administered by i.p. injection, and blood samples were collected at 0, 10, 15, 20, and 30 min for serum glucose determination. The rate constant for glucose disappearance during an insulin tolerance test (K_{ITT}) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase (Bonora et al., 1987).

2.4. RNA extraction and quantitative real-time PCR

Liver and interscapular brown adipose tissue (BAT) fragments were collected, snap frozen, and stored at -80 °C in RNAlater (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Total RNA was isolated using the RNeasy[®] tissue kit (QIAGEN). The single-stranded cDNA was synthesised using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was performed using a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and threshold cycle numbers were determined using RQ Study Software (Applied Biosystems). Reactions were performed in triplicate, and the threshold cycle numbers were averaged. The 50- μ l reaction mixture was prepared as follows: 25 μ l of Platinum[®] SYBR Green Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen[™] Life Technologies, Alameda, CA, USA), 10 μ M of each primer (Table 2) and 10 μ l of cDNA (100 ng). The reaction was cycled with preliminary UDG treatment for 2 min at 50 °C and denatured for 2 min at 95 °C, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing for 15 s, and primer extension at 72 °C for 15 s. This was followed by a melting point analysis of the double-stranded amplicons consisting of 40 cycles with a 1 °C decrement (15 s each) beginning at 95 °C. The first derivative of this plot, dF/dT , is the rate of change of fluorescence in the reaction. A significant change in fluorescence accompanies the melting curve of the double-stranded PCR products. A plot of $-dF/dT$ vs. temperature displays these changes as distinct peaks. The liver expression of *TNF- α* , *IL-6* and *iNOS*, and the BAT mRNA levels of *UCP-1* and *PGC-1 α* were examined and normalised to a constitutive gene (β -actin), and the relative fold induction was calculated according to the formula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Table 2
Primers used in quantitative real-time PCR.

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
<i>β-actin</i>	Sense	GCTACAGTTCACACCACA
	Antisense	TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT
<i>TNF-α</i>	Sense	TAGCCAGGAGGGAGAACAGA
	Antisense	TTTTCTGGAGGGAGATGTGG
<i>IL-6</i>	Sense	CCGAGAGGAGACTTCACAG
	Antisense	TCCACGATTTCCAGAGAAC
<i>iNOS</i>	Sense	TGGTGGTGACAAGCACATTT
	Antisense	AAGGCCAAACACAGCATACC
<i>PGC-1α</i>	Sense	CCGAGAATTCATGGAGCAAT
	Antisense	TTTCTGTGGGTTTGGTGTGA
<i>UCP1</i>	Sense	TCAGGGCTGAGTCTTTTGT
	Antisense	CTGAACTCCGGCTGAGAAG

2.5. TNF- α and IL-6 serum determination

TNF- α and IL-6 were determined in serum of mice by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with Quantikine® ELISA Kit (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.6. Protein extraction and western immunoblot analysis

Liver and soleus muscle fragments were excised and immediately homogenised in a solubilising buffer [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate, 2.0 mM PMSF, and 0.1 mg aprotinin/ml] at 4 °C. Insoluble material was removed by centrifugation for 20 min at 9000 \times g at 4 °C. The protein concentration of the supernatants was determined using the Biuret method. The extracts were treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM dithiothreitol, heated in a boiling water bath for 5 min, and subjected to SDS-PAGE in a Bio-Rad miniature slab gel apparatus (Mini-Protean). For immunoblot experiments, 0.15 mg of protein extract from each tissue was separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with anti-IRS-1, anti-p-IRS-1/2, anti-AKT or anti-p-AKT. The nitrocellulose membranes were developed using commercial chemiluminescent kits. Band intensities were quantified by optical densitometry (Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD, USA) of the developed autoradiography.

2.7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Liver fragments were excised, and the nuclear and cytoplasmic proteins were extracted immediately using the NE-PER-Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit (Pierce Protein Research Product, Rockford, IL, USA) following the manufacturer's protocol. Binding of NF- κ B was assessed in nuclear extracts by an electrophoretic mobility-shift assay (EMSA). Double-stranded oligonucleotides for NF- κ B (Promega, Madison, WI, USA) were labelled on the 3' end with biotin by using the 3'-Biotin end-label kit from Pierce. EMSA was carried out by using the Lightshift kit from Pierce. Briefly, binding reactions containing 10 μ g of nuclear protein, 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 2.5% glycerol, 5 mM MgCl₂, 0.05% Nonidet P-40, and 2 pmol of oligonucleotide probe were incubated for 20 min at room temperature. Specific binding was confirmed by using a 100–400-fold excess of unlabeled probe as the specific competitor. Protein DNA complexes were separated by 6% non-denaturing acrylamide gel electrophoresis. Complexes were transferred to positively charged nylon membranes and UV-crosslinked. Gel shifts were visualised with a streptavidin-horse radish peroxidase followed by chemiluminescent detection.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm S.E.M. Comparisons among groups of data were performed using one-way ANOVA followed by the Dunnett's Multiple Comparisons test. Statistical significance for expression analysis was also assessed by ANOVA, and the differences identified were pinpointed by the unpaired Student's *t*-test. An associated probability (*P* value) of less than 5% was considered as significant (*p* < 0.05).

3. Results

3.1. Glucose blood level and insulin response

Consumption of the HFD induced a significant weight gain, but after eight weeks of *yerba maté* intervention, we observed a reduction in final body weight. This weight loss was not related to a reduction in food intake (Table 3).

After 16 weeks of HFD consumption, the mice presented an increase of glucose blood level and insulin resistance, as determined by the constant of glucose decay during an insulin tolerance test. After *yerba maté* treatment, the blood glucose level was similar to that observed in control animals, and the response to insulin administration was improved (Table 3). This functional response was confirmed by hepatic analysis of insulin signalling. After 30 s of insulin administration, the level of hepatic IRS-1- and AKT-phosphorylation observed in animals that received *yerba maté* was significantly increased as compared with non-treated HFD animals (Fig. 1A and B). Similar results were observed by soleus muscle analysis of insulin signalling. After 90 s of insulin administration, the level of IRS-1- and AKT-phosphorylation observed in animals that received *yerba maté* was significantly increased as compared with non-treated HFD animals (Fig. 1C and D).

Table 3

Anthropometric data, biochemical parameters gene expression and serum levels of control (SD), high-fat diet (HFD) and *Yerba maté* (HFD + Mt)-treated mice.

	SD	HFD	HF+Mt
Anthropometrical data			
Total weight (g)	43.00 \pm 1.41	61.02 \pm 3.16*	50.08 \pm 2.05#
Epididymal fat (g)	1.27 \pm 0.12	2.43 \pm 0.21**	1.82 \pm 0.10#
Food intake (g/day)	3.22 \pm 0.65	2.78 \pm 0.45	2.75 \pm 0.38
Glucose (mg/dl)	154.67 \pm 36.78	284.60 \pm 24.48**	163.6 \pm 14.0##
K _{ITT}	2.75 \pm 0.20	1.33 \pm 0.18*	2.42 \pm 0.93#
Gene expression (U.A.)			
Liver			
TNF- α	1.02 \pm 0.26	2.70 \pm 0.29**	0.70 \pm 0.32##
IL-6	0.70 \pm 0.22	2.40 \pm 0.23**	0.52 \pm 0.11##
iNOS	0.42 \pm 0.12	1.83 \pm 0.17*	0.41 \pm 0.13#
BAT			
PGC-1 α	0.65 \pm 0.23	0.31 \pm 0.16**	0.59 \pm 0.15#
UCP1	1.45 \pm 0.33	0.43 \pm 0.18**	1.32 \pm 0.22#
Serum levels (pg/ml)			
TNF- α	3.10 \pm 2.19	24.51 \pm 8.81**	18.56 \pm 6.30
IL-6	38.06 \pm 6.47	131.12 \pm 12.74**	114.50 \pm 12.42

* *p* < 0.05 when compared to the control group.

** *p* < 0.01 when compared to the control group.

p < 0.05 when compared to the HFD group.

p < 0.01 when compared to the HFD group.

3.2. *Yerba maté* increases the expression of genes involved in thermogenesis

Quantitative real time PCR analysis was performed to evaluate the expression of *PGC-1 α* , and *UCP2* in interscapular brown adipose tissue. In BAT, the HFD significantly down regulated the expression of *UCP1* and *PGC-1 α* . The *yerba maté* intervention recovered the expression of the genes implicated in thermogenesis in BAT (Table 3).

3.3. *Yerba maté* modulates inflammatory markers through the NF- κ B pathway

The mRNA expression levels of *TNF- α* , *IL-6*, and *iNOS* were determined by means of real time PCR using isolated liver tissue from each group of animals. Our data showed that the HFD caused an up-regulation of the *TNF- α* , *IL-6* and *iNOS* genes. After treatment with *yerba maté* extract, the expression levels of those genes were significantly reduced. On the other hand, *yerba maté* did not change the serum levels of TNF- α and IL-6 (Table 3).

To evaluate the nuclear translocation of NF- κ B, nuclear extracts were subjected to EMSA using a NF- κ B consensus sequence (Fig. 2). The NF- κ B-derived band was barely visible in the SD group, and as expected, it was strongly enhanced in animals fed with the HFD for 16 weeks. *Yerba maté* extract was able to reduce the nuclear translocation of NF- κ B. The specificity of this band was confirmed by the addition of 100-fold excess of the unlabelled probe (data not shown). Thus, the treatment with *yerba maté* extract significantly down-regulated the inflammatory gene response, possibly through a decrease on the activation of NF- κ B.

4. Discussion

Previously, we demonstrated that treatment with *yerba maté* extract has potent anti-obesity effects in adipose tissue *in vivo* by modulating the expression of several genes related to obesity processes, such as inflammatory markers (Arçari et al., 2009). Because the increase in adipokine production can influence glucose metabolism, insulin sensitivity, and inflammation, this finding could represent a molecular link between obesity and the development of diabetes mellitus, metabolic syndromes,

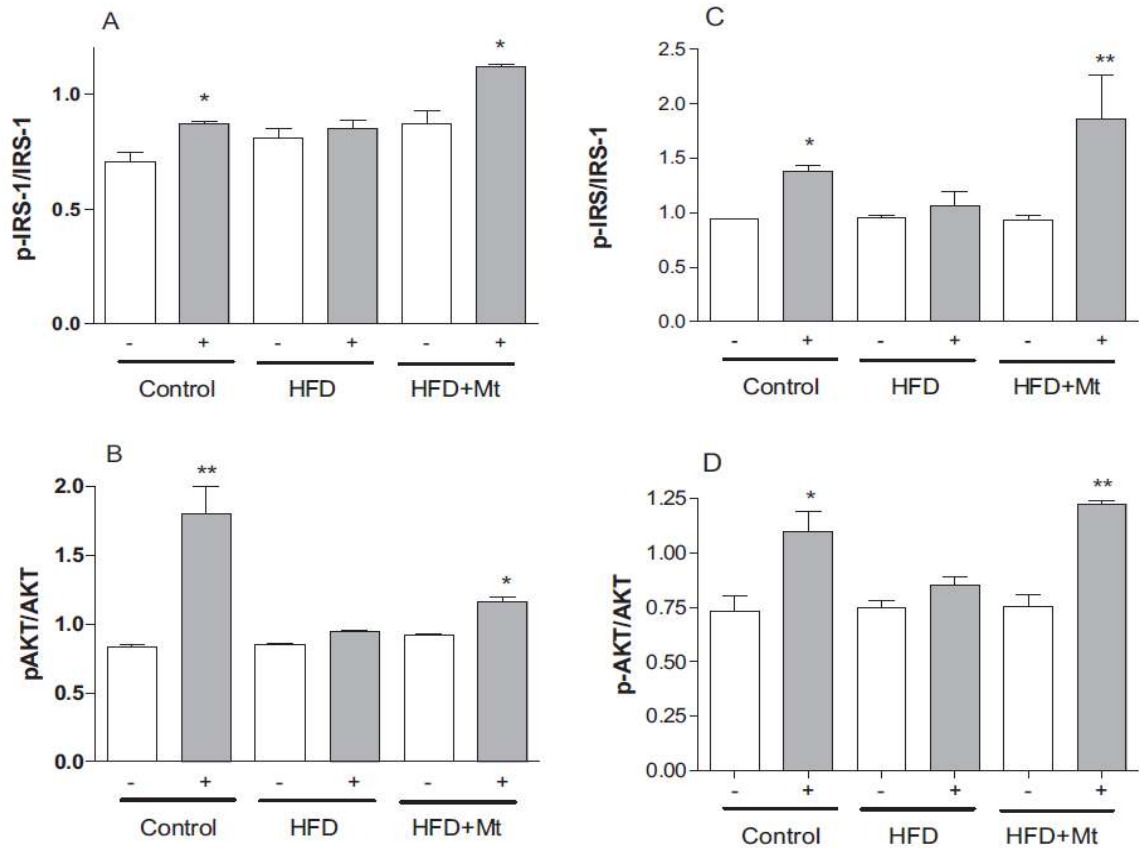


Fig. 1. (A) Level of IRS-1 tyrosine phosphorylation and (B) level of AKT phosphorylation in liver. (C) Level of IRS-1 tyrosine phosphorylation and (D) level of AKT phosphorylation in soleus muscle, in control (SD), high fat diet (HFD), and *yerba maté* (HFD+Mt)-treated mice before (–) and after (+) 1 min of *in vivo* insulin administration (*i.v.*). Data are expressed as means \pm SEM of 6 mice. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, when compared with the non-insulinic group.

and cardiovascular diseases (Shimomura et al., 1999). We studied the putative effects of *yerba maté* extract on blood glucose levels, insulin resistance, and the regulation of gene expression of inflammatory markers in mice with high fat diet-induced obesity.

Our data demonstrated that obese mice when treated with *yerba maté* exhibited marked attenuation of weight gain adiposity with-

out a reduction on food intake. Therefore, it was evaluated the effect of *yerba maté* treatment on mRNA levels of genes involved whole body energy expenditure such as *PGC-1 α* (Argilés et al., 2002) and *UCP1* (Lowell and Spiegelman, 2000). Our data showed that a high fat diet down regulates the expression of *PGC-1 α* and *UCP1* in BAT, which may have decreased energy expenditure and increased diet-induced obesity (Argyropoulos and Harper, 2002). The present study also showed that *PGC-1 α* and *UCP1* mRNA levels in BAT were recovered after *yerba maté* treatment, as previously described (Arçari et al., 2009).

In the present study, blood glucose homeostasis was evaluated, and a significant decrease in fasting blood glucose was observed, along with an increase in the K_{ITT} value. In addition, insulin IRS/AKT phosphorylation was measured in the liver and in muscle, and an improvement in signalling was detected. In accordance with our data, it has been shown that *yerba maté* treatment improves glucose tolerance in obese animals (Pomilio et al., 2002; Rodriguez de Sotillo and Hadley, 2002). It has been suggested that this effect could be attributed to chlorogenic acid, the main polyphenol in *yerba maté*. Chlorogenic acid is thought to modulate the activity of glucose-6-phosphatase, which is involved in glucose metabolism (Hemmerle et al., 1997).

Insulin resistance is a central feature of many physiological and pathological states and can be the result of a wide variety of biochemical defects in the insulin action cascade (Virkamäki

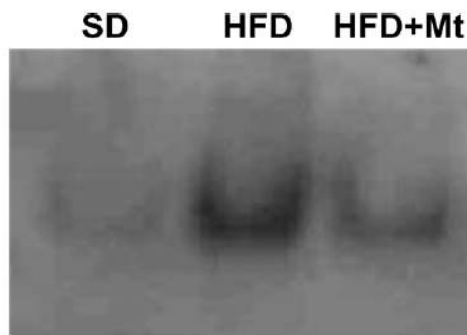


Fig. 2. Nuclear translocation of NF- κ B transcription factor in control (SD), high-fat diet (HFD), and *yerba maté* (HFD+Mt)-treated mice.

et al., 1999). It is known that TNF- α , a major pro-inflammatory factor, mediates insulin resistance through multiple targets: (i) activation of the insulin receptor via stimulation of phosphorylation of serine residues of IRS-1 (Hotamisligil et al., 1996), which negatively regulates insulin receptor tyrosine phosphorylation, blunts the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1 (Ozes et al., 2001), and inhibits glucose uptake (del Aguila et al., 1999); and (ii) activation of the NF- κ B pathway (Hotamisligil et al., 1993).

Our data showed that obesity led to an increase of serum and liver mRNA levels of TNF- α . Adipose tissue is an important source of TNF- α in obesity (Arçari et al., 2009). Additionally, free fatty acids that are provided by adipose tissue to the liver increase both hepatic insulin resistance and hepatic TNF- α production, the latter of which contributes to insulin resistance (Diehl, 2005). Although after the *yerba maté* treatment a reduction in adiposity and hepatic TNF- α mRNA levels was observed, we cannot exclude that the results could also be secondary to the weight loss observed. The decrease of TNF- α expression was correlated with an increase of IRS-1 tyrosine phosphorylation. Because tyrosine phosphorylation of the insulin receptor is crucial for activation of the downstream signalling components that lead to the metabolic effects of insulin, our data demonstrated that *yerba maté* treatment could result in improvements in hepatic insulin sensitivity through down-regulation of TNF- α .

It is well known that an up-regulation of TNF- α leads to an increase in NF- κ B nuclear translocation, which results in the activation of a battery of genes. These genes include those encoding for inflammatory proteins such as IL-6 and iNOS, which play a critical role in obesity-related inflammation and metabolic pathologies (Andreaskos et al., 2005; Xie et al., 1994). Therefore, we evaluated the effects of *yerba maté* treatment on the nuclear translocation of NF- κ B. The data presented herein showed that *yerba maté* extract was able to reduce the nuclear translocation of NF- κ B in liver when compared to the HFD group. Additionally, we found that HFD caused an up-regulation of the *IL-6* and *iNOS* genes, which were significantly reduced after *yerba maté* extract treatment. IL-6 is known as the major determinant of the acute phase response of inflammation (Gabay, 2006). Because IL-6 also has effects on glucose transport and insulin action (Kern et al., 2001), the reduction of hepatic IL-6 expression levels by *yerba maté* could help restore these parameters in our model. The iNOS expression in ob/ob mice was increased in the liver, and treatment with an iNOS inhibitor reversed fasting hyperglycaemia and improved insulin sensitivity by enhancing IRSs-mediated insulin signalling in the liver (Fujimoto et al., 2005). It is believed that iNOS promotes the nitrosylation of proteins that are involved in the transduction of the insulin signal, including the insulin receptor, IRSs and AKT, and that this process contributes to the reduction in insulin sensitivity (Carvalho-Filho et al., 2006).

Thus, the reduction of NF- κ B nuclear translocation and the consequent down-regulation of *IL-6* and *iNOS* seems to be correlated with down-regulation of *TNF- α* mRNA expression, demonstrating that suppression of *TNF- α* production occurs at the transcriptional level.

5. Conclusions

Taken together, our results indicate that *yerba maté* has a potential anti-inflammatory effect that is mediated through the NF- κ B pathway, as previously described (Puangraphant and de Mejia, 2009). Additionally, these data demonstrate, for the first time, that *yerba maté* can inhibit hepatic TNF- α and restore hepatic and muscle insulin signalling in mice with high fat diet-induced obesity.

Acknowledgment

We thank FAPESP (06/61797-0) and Leão Junior S/A for financial support.

References

- Berg, A.H., Scherer, P.E., 2005. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 96, 939–949.
- Wellen, K.E., Hotamisligil, G.S., 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115 (5), 1111–1119.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante Jr., A.W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112 (12), 1796–1808.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., Obin, M.S., 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* 46 (11), 2347–2355.
- Andreaskos, E., Sacre, S., Foxwell, B.M., Feldmann, M., 2005. The toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci.* 10, 2478–2488.
- Hotamisligil, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867.
- Pessin, J.E., Saltiel, A.R., 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106 (2), 165–169.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., Kahn, C.R., 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2), 85–96.
- González-Yanes, C., Serrano, A., Bermúdez-Silva, F.J., Hernández-Dominguez, M., Pérez-Ochoa, M.A., Rodríguez de Fonseca, F., Sánchez-Margalet, V., 2005. Oleylethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289 (5), 923–929.
- Broadhurst, C.L., Polansky, M.M., Anderson, R.A., 2000. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 48 (3), 849–852.
- Oliveira, D.M., Freitas, H.S., Souza, M.F., Arçari, D.P., Ribeiro, M.L., Carvalho, P.O., Bastos, D.H., 2008. *Yerba Maté* (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats. *J. Agric. Food Chem.* 56 (22), 10527–10532.
- Bastos, D.H.M., De Oliveira, D.M., Matsumoto, R.L.T., Carvalho, P.O., Ribeiro, M.L., 2007. *Yerba mate*: pharmacological properties, research and biotechnology. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 1, 37–46.
- Miranda, D.D., Arçari, D.P., Pedrazzoli, J., et al., 2008. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis* 23, 261–265.
- Stein, F.L.P., Schmidt, B., Furlong, E.B., 2005. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol. Res. Nurs.* 7, 146–156.
- Mosimann, A.L.P., Wilhelm-Filho, D., Silva, E.L., 2006. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors* 23, 1–12.
- Pomilio, A.B., Trajtemberg, S., Vitale, A.A., 2002. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochem. Anal.* 13, 235–241.
- Arçari, D.P., Bartchewsky, W., dos Santos, T.W., Oliveira, K.A., Funck, A., Pedrazzoli, J., de Souza, M.F., Saad, M.J., Bastos, D.H., Gambero, A., Carvalho Pde, O., Ribeiro, M.L., 2009. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity* 17 (12), 2127–2133.
- Bonora, E., Manicardi, V., Zavaroni, I., Coscelli, C., Butturini, U., 1987. Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance in mild glucose intolerance. *Diabetes Metab.* 13, 116–121.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−(Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25, 402–408.
- Shimomura, I., Hammer, R.E., Ikemoto, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1999. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401, 73–76.
- Argilés, J.M., Busquets, S., López-Soriano, F.J., 2002. The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1145–1152.
- Lowell, B.B., Spiegelman, B.M., 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652A–660A.
- Argyropoulos, G., Harper, M.E., 2002. Uncoupling proteins and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.* 92, 2187–2198.
- Rodriguez de Sotillo, D.V., Hadley, M., 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J. Nutr. Biochem.* 13, 717–726.
- Hemmerle, H., Burger, H.J., Below, P., et al., 1997. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *J. Med. Chem.* 40, 137–145.
- Virkamäki, A., Ueki, K., Kahn, C.R., 1999. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 103 (7), 931–943.

- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F., Spiegelman, B.M., 1996. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271, 665–668.
- Ozes, O.N., Akca, H., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Maehama, T., Dixon, J.E., Donner, D.B., 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (8), 4640–4645.
- del Aguila, L.F., Claffey, K.P., Kirwan, J.P., 1999. TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol.* 276 (5 Pt 1), E849–E855.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259 (5091), 87–91.
- Diehl, A.M., 2005. Hepatic complications of obesity. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 34, 45–61.
- Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., Nathan, C., 1994. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269 (7), 4705–4708.
- Gabay, C., 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* 8 (Suppl. 2), S3.
- Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., Ranganathan, G., 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, 745–751.
- Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J.A., Ueki, K., Kaneki, M., 2005. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 54, 1340–1348.
- Carvalho-Filho, M.A., Ueno, M., Carvalheira, J.B., Velloso, L.A., Saad, M.J., 2006. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IR β /IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 291, E476–E482.
- Puangpraphant, S., de Mejia, E.G., 2009. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguayensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NF κ B pathways. *J. Agric. Food Chem.* 57 (19), 8873–8883.