



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANA DA ROCHA ALVES

**EFEITO DO EXTRATO DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) SOBRE O DECLÍNIO
COGNITIVO INDUZIDO PELA OBESIDADE**

**EFFECT OF HOP EXTRACT (*Humulus lupulus* L.) ON OBESITY-INDUCED COGNITIVE
DECLINE MODEL**

CAMPINAS

2023

MARIANA DA ROCHA ALVES

**EFEITO DO EXTRATO DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) SOBRE O DECLÍNIO
COGNITIVO INDUZIDO PELA OBESIDADE**

**EFFECT OF HOP EXTRACT (*Humulus lupulus* L.) ON OBESITY-INDUCED COGNITIVE
DECLINE MODEL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestra em Alimentos e Nutrição

Dissertation presented to the Faculty of Food
Engineering of the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the degree of
Master in Food and Nutrition

Supervisor/Orientador: Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA DA
ROCHA ALVES, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

AL87e Alves, Mariana da Rocha, 1990-
Efeito do extrato de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) sobre o declínio cognitivo induzido pela obesidade / Mariana da Rocha Alves. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Junior.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Lúpulos. 2. Obesidade. 3. Cognição. 4. *Humulus lupulus*. I. Maróstica Junior, Mário Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Effect of hop extract (*Humulus lupulus* L.) on obesity-induced cognitive decline model

Palavras-chave em inglês:

Hops

Obesity

Cognition

Humulus lupulus

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Mário Roberto Maróstica Junior [Orientador]

Glaucia Maria Pastore

Philippe dos Santos

Data de defesa: 28-07-2023

Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5920-744X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0599337819224877>

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior -
Faculdade de Engenharia de Alimentos
UNICAMP

Dr. Philipe dos Santos -
RUBIAN

Dra. Glaucia Maria Pastore
Faculdade de Engenharia de Alimentos -
UNICAMP

A ATA DE DEFESA COM AS RESPECTIVAS ASSINATURAS DOS MEMBROS ENCONTRA-SE NO SIGA/SISTEMA DE FLUXO DE DISSERTAÇÕES/TESES E NA SECRETARIA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO.

“Nothing in life is to be feared, it is only to
be understood. Now is the time to
understand more, so that we may fear less.”

- Marie Curie

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha querida mãe, a quem tudo devo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, razão de tudo. À memória de meu pai Jorge de Almeida Alves, minha gratidão e amor sem fim. À minha mãe Maria da Conceição da Rocha Alves, minha fonte maior de coragem e inspiração. Aos meus irmãos Décio José e Elias Henrique, por me apoiarem em dias de chuva e sol. Ao Roberto Nascimento, por cada passo do caminho. À Ana Paula Machado pelas palavras sempre generosas. Ao professor Mário Roberto Maróstica pela orientação. Aos demais mestres, funcionários e colegas da Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo conhecimento compartilhado. À Unicamp, por me proporcionar a conquista deste sonho.

Por fim, agradeço o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPQ) – Código de financiamento: 6921008433385202. Número do processo:131023/2021-7, pela viabilização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

RESUMO

As taxas de sobrepeso e obesidade no mundo têm incidido de forma crescente nos últimos anos, e o Brasil têm acompanhado esta tendência epidemiológica (WHO, 2016). O acúmulo de gordura corporal pode modificar respostas metabólicas como a capacidade antioxidante e oxidante a nível celular. O quadro inflamatório de baixo grau gerado favorece o surgimento de resistência à insulina, que por sua vez está associada ao desenvolvimento de outras patologias mais sérias como diabetes Mellitus tipo 2 e o declínio cognitivo. As doenças neurológicas anteriormente relacionadas ao período senil, recentemente tem surgido na população mais jovem e obesa. A falta de diversidade microbiana intestinal associada aos níveis aumentados de marcadores pró-inflamatórios no sangue e tecidos periféricos tem endereçado investigações sobre potenciais agentes redutores, sequestradores de radicais, inibidores de espécies reativas de oxigênio ou de complexos de íons metálicos que promovam maior proteção ao sistema de defesa cerebral. Neste contexto, diversos compostos bioativos vegetais como os alfa ácidos, beta ácidos e análogos encontrados no lúpulo (*Humulus lupulus* L.) já foram aplicados em experimentos *in vivo* indicando efeitos promissores ao beneficiar o metabolismo de lipídeos e carboidratos reduzindo a inflamação sistêmica. O atual estudo visou investigar possíveis efeitos biológicos do extrato seco de lúpulo (ESL) rico em alfa e beta ácidos, obtido por tecnologia de extração com dióxido de carbono supercrítico-SFE na obesidade. Setenta e oito camundongos machos da linhagem C57/JB6 foram submetidos ao consumo das dietas controle AIN-93M e AIN-93M modificada em teor de lipídeos contendo 0,35% g/kg e 3,5% g/kg em alfa ácidos do ESL. Após a aplicação dos testes de tolerância glicêmica e tolerância à insulina foi verificado melhor estabilização dos níveis de glicemia e ganho de peso entre àqueles animais tratados com ESL (HP1 e HP2) em relação ao grupo controle obeso (HP) ($p < 0,05$). Houve também redução do estresse oxidativo observado por verificação do perfil enzimático de SOD, e aparente mitigação sobre a expressão proteica de sinalizadores de degeneração cerebral por GSK3 β e p-IRS1 ($p < 0,05$). Contudo, o teste cognitivo y-maze aplicado para evidenciar possíveis efeitos deletérios no cérebro de animais obesos não indicou diferença estatística. Além disso, o consumo dietético semanal em gramas entre os grupos obeso HP2 ($33,32 \pm 4,11$, $p < 0,05$) versus controle HP ($42,3 \pm 5,88$, $p < 0,05$) foi diferente, entretanto os compostos bioativos presentes no ESL mostraram conferir efeitos relevantes sobre o controle glicêmico, na sinalização insulínica e consequente ação moduladora de marcadores orgânicos do estado obeso correlacionados à progressão inflamatória cerebral.

ABSTRACT

Overweight and obesity rates have increased in recent years globally, and Brazil has followed this epidemiological trend (WHO, 2016). Fat accumulation can modify metabolic responses, such as antioxidant and oxidant capacity in the cells. It's known that low-grade inflammation favors the emergence of insulin resistance and is highly associated with severe pathologies, such as diabetes Mellitus type 2 and cognitive decline appearance. Neurological diseases previously related to the senile period have emerged increasingly in the younger and obese population. In this context, several plant bioactive compounds applied in vivo experiments have shown promising effects by conferring better responses to lipid and carbohydrate metabolisms and systemic inflammatory states. For example, alpha and beta-acids compounds and their analogues found in hops (*Humulus lupulus* L.) are weight loss-related and glucose tolerance control. Therefore, the current study aimed to confirm the biological effects of ESL elaborated using supercritical carbon dioxide extraction (SFE). Thus, seventy-eight male mice of the C57/JB6 strain were fed with control diet AIN-93M and AIN-93M high fat with 0.35% g/kg and 3.5% g/kg of concentration in alpha acids from ESL (dry hop extract). After analyses applying glycaemic and insulin tolerance tests, were verified a better control and stabilization of glycemic blood levels among the animals fed in both dosages (HP and HP2), also a better response to weight gain (HP1) ($p < 0,05$). The reduction of oxidative stress was observed by checking the enzymatic profile of the superoxide dismutase enzyme (SOD), which can infer positive protein expression associated with brain degeneration by GSK3 β and p-IRS1 ($p < 0.05$). However, the cognitive test of y-maze did not indicate a statistical difference in groups fed with ESL. Overall, bioactive compounds in ESL have been shown to confer a glycemic effect by controlling insulin response even though the dietary consumption was different between obese (HP) ($42,3 \pm 5,88$, $p < 0,05$) and lean group (HP2) ($33,32 \pm 4,11$, $p < 0,05$). In conclusion, the ESL improved the biological responses of some obese markers highly associated with cognitive decline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. COMPOSTOS BIOATIVOS DO LÚPULO (*HUMULUS LUPULUS* L) (19)

FIGURA 2. SENSIBILIZAÇÃO HIPOTALÂMICA POR CONSUMO DE RICA EM GORDURA (22)

FIGURA 3. VIAS DE DEGENERAÇÃO HIPOCAMPAL (24)

FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO LABIRINTO EM Y (30)

FIGURA 5. CONSUMO DIETÉTICO (34)

FIGURA 6. CONTROLE DE PESO SEMANAL (35)

FIGURA 7. ACÚMULO DE TECIDO ADIPOSEO TOTAL (36-37)

FIGURA 8. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO (38)

FIGURA 9. HISTOLOGIA DO FÍGADO (39-40)

FIGURA 10. ANÁLISE DE PERFIL LIPÍDICO (41)

FIGURA 11. ANÁLISE DE PERFIL GLICÊMICO (42)

FIGURA 12. NÍVEL DE RESISTINA DO SORO (43)

FIGURA 13. PERFIL ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO NO HIPOCAMPO (44)

FIGURA 14. NÍVEL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO HIPOCAMPO (45)

FIGURA 15. ANÁLISE DO TESTE COGNITIVO (45-46)

FIGURA 16. MARCADORES PROTEICOS PARA DEGENERAÇÃO CEREBRAL NO HIPOCAMPO (47-49)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. FORMULAÇÃO DAS DIETAS NORMO LIPÍDICAS E HIPERLIPÍDICAS (27)

TABELA 2. PERFIL COMPOSICIONAL DO EXTRATO SECO DE LÚPULO (32)

**TABELA 3. PARÂMETROS DE CRESCIMENTO, INGESTÃO ALIMENTAR E PESO
CEREBRAL DOS CAMUNDONGOS APÓS DOZE SEMANAS DE
EXPERIMENTO (34)**

TABELA 4. PONTUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA NAS (39)

TABELA 5. MARCADORES BIOLÓGICOS AVALIADOS (53)

LISTA DE ABREVIATURAS

Supercritical fluid extraction (SFE);

Fator de Necrose Tumoral (*TNF- α*);

Proteína Ativadora 1 (AP-1);

Cicloxygenase 2 (COX2);

Response Element-binding Protein (CREB);

Citocromo P450 (CYP450);

Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2);

Extrato seco de lúpulo (ESL);

Glutathione Peroxidase (GSH);

Teste de tolerância à glucose (GTT);

Interleucina 1 beta (IL-1 β);

Interleucina 6 (IL-6);

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1);

Teste de tolerância à insulina (ITT);

Lipopolissacarídeo (LPS);

Factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$);

Óxido nítrico (NO);

Peptídeo amiloide beta (A β);

Prostaglandina E2 (PGE2);

Sistema Nervoso Central (SNC);

Proteína Precursora Amiloide (APP);

Receptor do tipo Toll 4 (TLR4)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO (15-16)
 2. OBJETIVOS (17)
 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA (18-25)
 - 3.1. CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E CONSUMO DA PLANTA DE LÚPULO (*HUMULUS LUPULUS* L.) (18)
 - 3.2. COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO LÚPULO (18-20)
 - 3.3. MECANISMO DA OBESIDADE E NEURODEGENERAÇÃO (21-25)
 4. MATERIAL E MÉTODOS (25-32)
 - 4.1. IDENTIFICAÇÃO DO EXTRATO SECO DE LÚPULO (ESL) (25)
 - 4.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ESL (25-26)
 - 4.3. COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ESL (26)
 - 4.4. ENSAIO ANIMAL (26-28)
 - 4.5. CONTROLE DO CONSUMO DIETÉTICO E GANHO DE PESO (28)
 - 4.6. PARÂMETROS DOS TESTES BIOQUÍMICOS (28-29)
 - 4.7. PARÂMETRO DOS TESTES ANTIOXIDANTES (29)
 - 4.8. PARÂMETROS DOS TESTES DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS (29)
 - 4.9. PARÂMETROS DO TESTE COGNITIVO (29-30)
 - 4.10. PREPARO DO HIPOCAMPO (30)
 - 4.11. TESTE DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA E FORMAÇÃO DE PLACAS SENIS (30-31)
 - 4.12. PREPARO HISTOLÓGICO DO FÍGADO (31)
 - 4.13. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO (31-32)
 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA (32)
 6. RESULTADOS (32-49)
 - 6.1. ANÁLISES DO EXTRATO (32-33)
 - 6.2. ANÁLISES DE PESO E CONSUMO DA DIETA (33-37)
 - 6.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO (37-40)
- ANÁLISES DE PERFIL BIOQUÍMICO
- 6.4. PERFIL LIPÍDICO (40-41)
 - 6.5. GTT E ITT (41-42)
 - 6.6. ADIPONECTINA (43)
- ANÁLISES DE PERFIL ANTIOXIDANTE
- 6.7. GSH E SOD (43-44)
- ANÁLISES DE PERFIL INFLAMATÓRIO
- 6.8. IL-1 β E TNF- α (44-45)

ANÁLISES DE PERFIL COGNITIVO

6.9. TESTE Y- MAZE (45-46)

6.10. ANÁLISE DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA E FORMAÇÃO DE PLACAS SENIS (46-49)

7. DISCUSSÃO (49-54)

8. CONCLUSÃO (54)

9. REFERÊNCIAS (55-60)

1. INTRODUÇÃO

A incidência da obesidade tem aumentado em todo o mundo há décadas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016), a população obesa mundial quase triplicou desde 1975. Sendo que, pelo grau de IMC (Índice de Massa Corporal) cerca de 39% dos adultos com 18 anos ou mais no mundo têm sobrepeso e 13% destes já são obesos. No Brasil, as prevalências de sobrepeso e obesidade acompanharam as taxas globais; entre os anos de 1989 a 2003 a taxa quadruplicou na população masculina, saltando de 0,08% para 0,32%. O aumento entre o público feminino foi ainda mais significativo, de 0,66% para 0,95% durante o mesmo período (Guariglia et al. 2021). Segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (POF - 2018), o custo financeiro incluindo hospitalizações e assistências ambulatoriais em obesidade no Brasil, foi de aproximadamente R\$ 669 milhões, representando um aumento de 37% desde a última pesquisa realizada.

Embora o acúmulo de gordura no organismo tenha caráter multifatorial, o estilo de vida sedentário é um dos fatores que mais contribui para o desenvolvimento da obesidade (WHO, 2016). O excesso de tecido adiposo pode indicar mudanças metabólicas importantes para o balanço entre a capacidade antioxidante e oxidante a nível celular (Guariglia et al. 2021; Rothe et al. 2023). Ao se tornar um quadro clínico crônico, o estresse oxidativo e a inflamação causados pelo estado obeso, favorecem o surgimento de resistência à insulina e dislipidemias, que por sua vez estão associados ao desenvolvimento de outras patologias mais graves (Heneka et al. 2018; Van Dyken and Lacoste 2018), como o diabetes Mellitus tipo 2 (T2DM) que já afeta cerca de 400 milhões de pessoas ao redor do mundo (Kothari et al. 2017), e quadros de demência, com preocupantes projeções de incidência de atingir 153 milhões de pessoas até 2050 no mundo (Gomes Gonçalves et al. 2023).

Além das complicações relacionadas ao descontrole glicêmico, o envelhecimento da população tem amplificado casos de doenças de ordem neurocognitiva. Sabe-se que lesões ou danos metabólicos desencadeados pelo aumento do estresse oxidativo na obesidade e, a redução da capacidade metabólica no envelhecimento estão intimamente relacionados à morte celular a nível cerebral (Hidalgo-Lanussa et al. 2020). Comumente, os sinais e sintomas das doenças neurológicas surgem tardiamente, e sendo o envelhecimento o maior fator de risco a elas associadas, à medida que a expectativa de vida das populações cresce, a manutenção deste cenário tende a piorar (Grodzicki and Dziendzikowska 2020; Sureda et al. 2020). Contudo, tanto o surgimento da resistência insulínica pré-diabética quanto o diabetes Mellitus tipo 2, intimamente relacionados às alterações cognitivas, podem ser diagnosticados em qualquer faixa etária (Biessels & Reagan 2015).

Neste contexto, diversos compostos vegetais têm despontado na literatura científica por conterem princípios ativos potentes contra estas e outras doenças de abrangência global. A partir da caracterização de compostos do lúpulo (*Humulus lupulus spp.*), por exemplo, descobriu-se o

potencial medicinal no uso dos ácidos amargos presentes na planta para o tratamento do declínio cognitivo (Li et al. 2017).

Os cones de lúpulo são capazes de secretar substâncias como compostos fenólicos e acilfloroglucidas, que potencialmente conferem propriedades funcionais importantes (Zanoli & Zavatti 2008; Easterling et al. 2020). Entre os componentes mais elucidados do lúpulo estão alfa ácidos (humulonas) e derivados (co-humulona e ad humulona), e os análogos tri estirenados, os beta ácidos (lupulona) e seus derivados (ad lupulona, colupulona, prelupulona, postlupulona, e adprelupulona). Tanto os compostos alfa como os beta ácidos parecem oferecer ação reguladora no metabolismo de gorduras e açúcar demonstrados em modelos *in vivo* (Zhang et al. 2021).

Assim, o atual trabalho de mestrado buscará do ponto de vista científico, explorar bases moleculares de indução ao declínio cognitivo em camundongos C57/JB6 submetidos à dieta hiperlipídica atenuando os efeitos metabólicos da obesidade utilizando o extrato de lúpulo rico em alfa e beta ácidos obtidos por meio da tecnologia de extração Supercritical fluid extraction (SFE).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar o efeito de extrato de lúpulo contendo alfa e beta-ácidos sobre a capacidade cognitiva de animais magros e obesos e investigar seus possíveis mecanismos de ação.

Específicos:

- Analisar o extrato seco de lúpulo;
- Analisar o efeito anti-obesogênico do extrato seco de lúpulo em modelo “*in vivo*” de obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Avaliar os efeitos e mecanismos de ação do extrato seco de lúpulo sobre a prevenção de déficits cognitivos por meio da determinação de marcadores de estresse oxidativo, inflamação e perda cognitiva no desempenho comportamental de memória e aprendizagem.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA E CONSUMO DA PLANTA DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.)

O gênero *Humulus* pertence à família botânica *Cannabaceae*, da ordem das rosálias, e inclui as espécies *Humulus japonicus* Siebold e Zucc., *Humulus yunnanensis* Hu e *Humulus lupulus* L. (Van Cleemput et al. 2009), sendo esta última a principal espécie de interesse econômico. O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta do tipo trepadeira, de ciclo biológico perene, entrelaçada, dioica, muito comumente encontrada no hemisfério norte em zonas temperadas (Castro et al. 2008; Easterling et al. 2020). O ecossistema nestes locais é propício ao crescimento das plantas, onde os solos argilosos ou arenosos são facilitadores da drenagem, dado que as raízes podem alcançar em média 2 m de profundidade. Além disso, há maior incidência de luz variando entre 15h a 18h por dia e um clima frio nestas regiões, características que propiciam o cultivo (Durello et al. 2019). As plantas femininas são as mais cultivadas, sendo os países Alemanha, República Tcheca, Áustria, França, Bélgica, Portugal, Inglaterra, EUA e Austrália os maiores produtores (Praxis D. P, 1993). Entre os exportadores, destaca-se o papel da Alemanha e dos Estados Unidos no mercado mundial (Astray et al. 2020).

O período de crescimento da planta se inicia na estação da primavera até alcançar a altura de 6 a 8 m em média. Durante o verão, as inflorescências da planta feminina dão origem aos “cones” (estróbilo) na qual secretam a lupulina (resina) de suas glândulas (Figura 1). Os finais do verão e início do outono marcam a produção mais acentuada de lupulina (Van Cleemput et al. 2009). Nos cones de lúpulo são secretadas substâncias, como polifenóis e acilfloroglucidas, com propriedades funcionais, conservativas e aromáticas (Zanoli & Zavatti 2008). Desta forma, a planta tem sido histórica e culturalmente cultivada principalmente devido às suas aplicações em práticas medicinais, como suprimento alimentar animal e mais recentemente como agente aromatizante pela indústria da cerveja (Easterling et al. 2020).

O registro mais antigo sobre o cultivo de lúpulo é datado de 859 d.c na Baviera na Alemanha (Zhang et al. 2021). Desde a idade média a espécie Lúpulo tem sido quase exclusivamente empregada para fabricação cerveja (Van Cleemput et al. 2009; Easterling et al. 2020). Estima-se atualmente que a produção de lúpulo gire em torno de 100.000 toneladas anuais, sendo que cerca de 95 % da produção mundial é destinada à produção da bebida (Van Cleemput et al. 2009; Zhang et al. 2021).

3.2. COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO LÚPULO (*Humulus lupulus* L.)

Diversos estudos com lúpulo demonstram o papel protetivo que a planta pode desempenhar no organismo. Entre os efeitos benéficos, os mais elucidados são a ação biológica anticarcinogênica, anti-inflamatória e moduladora do metabolismo energético (Hrnčíč et al. 2019)

(Figura 1). Todavia, em relação ao uso de compostos amargos encontrados no lúpulo contra a inflamação e modulação do metabolismo energético pouco tem sido investigado, principalmente entre animais não geneticamente modificados (Li et al. 2017; Ayabe et al. 2018a; Fukuda et al. 2020).

Os principais constituintes percentuais da planta são: umidade (10%), resinas totais (15 – 30 % m/m), óleos essenciais 0,5 - 3 (% m/m), proteínas (15 % m/m), monossacarídeos (2 % m/m), polifenóis (4% m/m), pectinas (2 % m/m), aminoácidos (0,1 % m/m), ceras e esteroides (traços-25), cinzas (8 % m/m) e celulose/lignina (43 % m/m). As glândulas de lupulina das flores do lúpulo secretam o pó rico em metabólitos que podem ser classificados em ácidos amargos (resinosos), óleos essenciais e polifenóis (Vazquez-Cervantes et al. 2021). Além destes, é possível extrair proteínas, ceras, esteróides e outros nutrientes (Van Cleemput et al. 2009; Durello et al. 2019). Do óleo se retiram substâncias como terpenoides, compostos polifenóis bem representados pelas “chalconas preniladas” como o xanto-humol e desmetil xanto-humol, ambos precursores das flavonas. Nas folhas é possível obter ácidos fenólicos como os taninos e compostos glicosídicos além de flavonoides. Também é possível encontrar ácidos amargos nesta estrutura, pois existem glândulas de lupulina em menores quantidades (Van Cleemput et al. 2009). Contudo, alguns fatores como local, método de cultivo, grau de maturação além do manejo pós-colheita podem interferir na qualidade composicional de seus nutrientes (Durello et al. 2019).

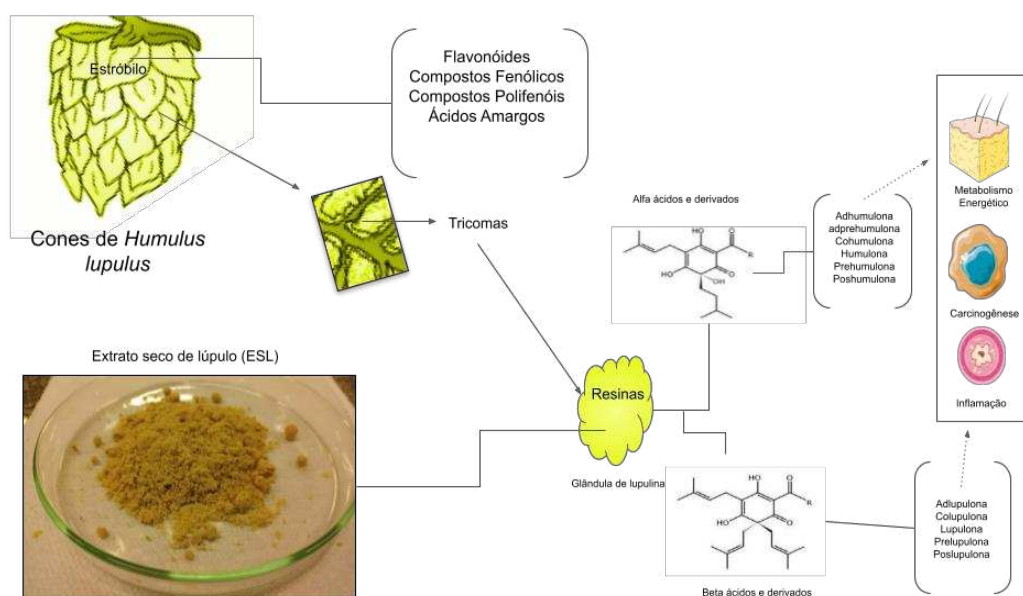


Figura 1. Compostos bioativos do lúpulo (*Humulus lupulus* L). Representação esquemática de estruturas encontradas na planta de lúpulo responsáveis pela produção de compostos amargos e seus derivados com finalidades biológicas (Hrnčič et al. 2019). Design da figura por Smart Medical Art platform (<https://smart.servier.com/>).

Dentre os compostos bioativos oriundos do cone de lúpulo, os mais estudados desde a segunda metade do século XX para fins farmacológicos tem sido as flavononas, chalconas e

derivados de floroglucinol (Zanoli & Zavatti 2008). Nos cones maduros, além dos compostos glicosídicos de flavonoides (kaempferol, quercetina, quercitrina e rutina), outras classes de fitoquímicos já identificados são: os terpenos, chalconas e ácidos amargos (Zanoli & Zavatti 2008; Zhang et al. 2021). Os metabólitos produzidos pelos cones podem ser classificados em óleos essenciais, como os compostos oxigenados e sulfurados, polifenóis como catequinas e flavonoides, e ácidos amargos ou resinosos, como alfa e beta ácidos e seus derivados (Van Cleemput et al. 2009; Hrnčič et al. 2019). Sendo estes últimos os de maior interesse para a indústria de transformação.

Os alfa ácidos são os componentes de maior interesse comercial em relação ao lúpulo, já que o conteúdo total de β -ácido é cerca de 2–10% e não afeta a qualidade e o preço final do produto para a indústria (Zhang et al. 2021). Já foi demonstrado que a enzima monooxigenase tem uma função primordial na conversão dos ácidos amargos alfa para beta ácidos pela técnica de radio marcação (Zhang et al. 2021). Ademais, ambos compostos mostraram por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* conterem potencialidades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antivirais, sedativos e anticarcinogênicos (Li et al. 2017; Hrnčič et al. 2019) (Figura 1). No entanto, as formulações para obtenção desses compostos dependem tanto da natureza dos solventes utilizados como também do método de extração e isolamento aplicados (Hrnčič et al. 2019), já que os ácidos amargos, derivados prenilados de floroglucinol, são substâncias altamente termolábeis e oxidativas (Khaw et al. 2017). O emprego do dióxido de carbono neste sentido, mostra-se vantajoso por conseguir dissolver o óleo e a resina macia presentes no lúpulo, onde se encontra a maior parte dos ácidos amargos alfa e beta. Como se trata de um solvente apolar, os componentes polares ou apenas traços deles são extraídos facilmente durante sua aplicação, reduzindo assim, possíveis perdas composicionais (Zhang et al. 2021). Assim, a atribuição da técnica poderia potencializar resultados biológicos outrora testados por outros meios de extração.

Para a aplicação anticarcinogênica foi observado que a partir de ensaios *in vitro* e *in vivo*, os ácidos amargos alfa e beta obtiveram potenciais de indução à apoptose, inibição da proliferação celular, inibição da angiogênese e indução da enzima do citocromo P450 (CYP450). Na inflamação, tanto alfa como beta ácidos e seus derivados (iso-alfa-ácido, di-hidro-alfa ácidos, tetra hidro-alfa ácidos e hexahydro alfa ácidos) mostraram ser eficazes, principalmente no que se refere a inibição da ciclooxigenase 2 (COX2) e produção de prostaglandina 2 (PGE2), inibição de factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$), proteína Ativadora (AP-1), Response Element-binding Protein (CREB) além de outros sinalizadores inflamatórios envolvidos com as enzimas quinases (Vazquez-Cervantes et al. 2021). Por fim, os compostos iso-alfa-ácidos, dihidro-iso-alfa-ácidos, tetrahidro-iso-alfa-ácidos e hexahidro-alfa-ácidos também mostraram conferir efeitos sobre o metabolismo de lipídeos e carboidratos. Agindo, por exemplo, na regulação dos níveis de COX2 e PGE2 sobre o consumo de dietas ricas em gorduras na perda de peso e na tolerância à glicose em animais (Hrnčič et al. 2019)

3.3. MECANISMO DA OBESIDADE E NEURODEGENERAÇÃO

Além da predisposição genética, o estilo de vida sedentário, condições ambientais e os hábitos alimentares inadequados estão diretamente associados à manutenção da obesidade (Crispino et al. 2020). Proporcionalmente, altos valores de IMC podem, por exemplo, aumentar riscos em até 8% de desenvolvimento do câncer de mama pós-menopausa, 12% câncer de cólon, 13% osteoartrite, 21% doenças isquêmicas do coração, 23% acidente vascular cerebral, 32 % câncer de endométrio, 39% hipertensão e 58% de diabetes tipo 2 (Guariglia et al. 2021). Além disso, o acúmulo de tecido adiposo subcutâneo, também está associado às taxas de morbimortalidade (Spinelli et al. 2020).

A condição metabólica da obesidade é caracterizada por inflamação crônica de baixo grau, pois aumenta os níveis de estresse oxidativo celular reprogramando vias estruturais, imunes e metabólicas (Rothe et al. 2023). Fato que explica, por exemplo, a diferença dos níveis de diversos biomarcadores para danos oxidativos entre os indivíduos obesos em relação aos eutróficos (Sánchez-Sarasúa et al. 2020).

Sabe-se que a gordura depositada nas células e tecidos dificulta o equilíbrio antioxidante natural do organismo (Alexaki 2021). Particularmente, devido aos processos de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e redução da proteção antioxidante feitas especialmente por glutathione (GSH) e a superóxido dismutase (SOD) (Sánchez-Sarasúa et al. 2020; Acero et al. 2023).

Quando existe um desequilíbrio energético, alguns mecanismos de controle glicêmico são ativados. As células enteroendócrinas e em escova, células gliais entéricas e neurônios que compõem o eixo intestino-cérebro (GBA), são as primeiras estruturas capazes de detectarem a alteração de glicose sanguínea por meio da liberação de hormônios intestinais, neurotransmissores e outros metabólitos (Bessac et al. 2018). A modificação na homeostase de glicose e insulina durante o estágio pré diabético está associada à patogênese da inflamação, mesmo antes do surgimento do quadro de hiperglicemia (Bakkar et al. 2020). É bem comum neste cenário, surgir a disbiose (desequilíbrio microbiológico intestinal), fator que contribui para manutenção do estado inflamatório, aumento da permeabilidade no órgão e maior sensibilização da barreira hematoencefálica (BHE) (Bakkar et al. 2020) (Figura 2).

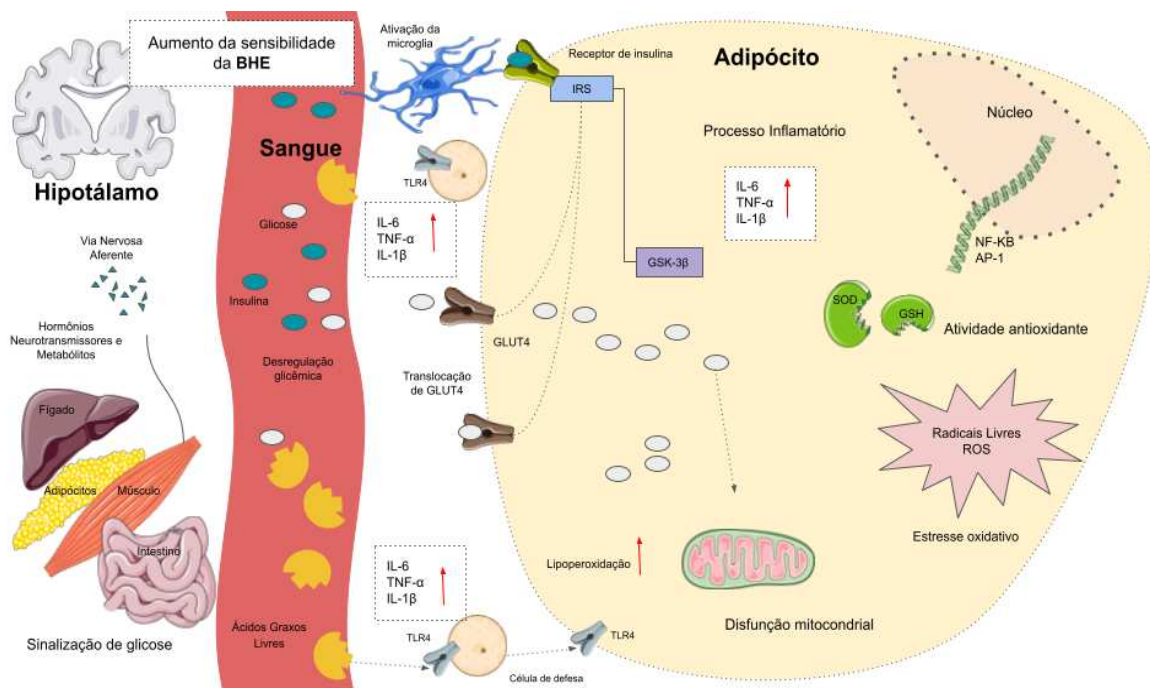


Figura 2. Sensibilização hipotalâmica por consumo de rica em gordura. Mecanismo de ação da barreira hemato-encefálica aos ácidos graxos livres circulantes e a desregulação glicêmica em resposta ao consumo de dieta rica em gordura. Abreviação: Barreira hematoencefálica (BHE) (Gregor & Hotamisligil 2011; Kothari et al. 2017). Design da figura por Smart Medical Art platform (<https://smart.servier.com/>).

Na obesidade, há uma compensação hepática de glicose para controlar alterações dos níveis glicêmicos. Assim, o sistema nervoso entérico (SNE) atua ativamente para que haja modificação nos sinais de fome, na imunomodulação inflamatória e antioxidante desencadeadas pela maior demanda metabólica (Rius-Pérez et al. 2020). A oxidação de ácidos graxos na mitocôndria e no peroxissoma liberam radicais livres (elétrons desemparelhados), que a nível celular podem alterar a expressão genética e a produção de ATP (McMurray et al. 2016). Além disso, tanto as espécies reativas de oxigênio (ROS) quanto os radicais livres, ao possuírem alta reatividade química, conseguem também lesar biomoléculas como proteínas de células, lipídios e ácidos nucleicos (Rani et al. 2016). Vale destacar que anormalidades preexistentes também podem contribuir para o sinergismo deste cenário (Fernández-Sánchez et al. 2011).

Alguns sensores intestinais como SGLT1, GLUT2, TASR1/2, conseguem detectar o aumento de glicose intestinal gerando uma mensagem via nervosa aferente provocando um aumento da liberação hipotalâmica de $\text{NO}^\bullet$ (Bessac et al. 2018) (Figura 2). Tanto a hipertrofia (aumento do tamanho celular) quanto a hiperplasia (multiplicação celular) de adipócitos favorecem o quadro de hipóxia (falta de O_2). O $\text{NO}^\bullet$ é uma molécula intracelular envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos. No entanto, seu excesso tem caráter citotóxico, e pode reagir diretamente com biomoléculas ou combinar-se com outras (como O_2 formando peroxinitrito - ONOO^-), substâncias nocivas ao cérebro (Gulcin et al., 2020). Alguns componentes celulares,

como a astroglia ou microglia (células imunes residentes do Sistema Nervoso Central) são capazes de expressarem o receptor do tipo Toll 4 (TLR4) podendo mitigar os efeitos nocivos modulando processos inflamatórios no cérebro (Hidalgo-Lanussa et al., 2020). No entanto, a neuroinflamação em estágios crônicos causa uma super ativação da microglia e o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo, como por exemplo o TNF- α , IL-6, IL-1, IL-8, IL-1 β por ativação celular iniciadas com a proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1), tornando o sistema de defesa sensível aos ataques contra radicais livres, também responsáveis pelo processo de neurodegeneração (Hidalgo-Lanussa et al. 2020) (Figura 2).

Os ácidos graxos circulantes no sangue estimulam os receptores de lipopolissacarídeo (LPS) e os receptores TLR4 das células de defesa. Como consequência, uma cascata inflamatória é iniciada. Os macrófagos, que são as células fagocíticas, conseguem infiltrar no tecido adiposo proliferando os níveis de citocinas pró-inflamatórias, TLR4 e outros receptores inflamatórios presentes nos adipócitos (Lv et al. 2017; Zevallos et al. 2017). O TNF- α é uma das primeiras citocinas de resposta inflamatória derivadas das células de defesa (monócitos e linfócitos), tecido adiposo e músculo, especialmente. Este marcador está associado ao desenvolvimento da resistência insulínica, pois atua na liberação de ácido graxo, bloqueia a síntese de adiponectinas e interfere na fosforilação dos receptores de insulina, comprometendo a sinalização intracelular do hormônio (Acero et al. 2023). Além disso, o TNF- α é também capaz de induzir a produção de oxigênio reativo após o processo de peroxidação lipídica, danificando a membrana celular e contribuindo para a neurodegeneração (Hidalgo-Lanussa et al. 2020)

A sinalização de insulina pode induzir tanto a expressão quanto a translocação de transportadores de glicose para a membrana plasmática (Kothari et al. 2017). No estresse metabólico prolongado por conta da inflamação dificulta, por exemplo, a sinalização da insulina, diminuindo a responsividade do hormônio via proteína IRS-1 no cérebro (Kothari et al. 2017). De forma semelhante, a proteína GSK-3 β também pode indicar falhas na ativação insulínica no hipocampo, pois a GSK3 β é responsável pela hiperfosforilação da proteína TAU e consequente formação de emaranhados neurofibrilares, considerados marcadores de alteração neural e declínio cognitivo (Medina dos Santos et al. 2023). O excesso de ROS no cérebro, aumentam a expressão das proteínas TAU e p-TAU que induzem aos processos de apoptose, acúmulo de peptídeo amiloide beta (A β) e, o progresso neurodegenerativo (Sánchez-Muniz et al. 2019) (Figura 3).

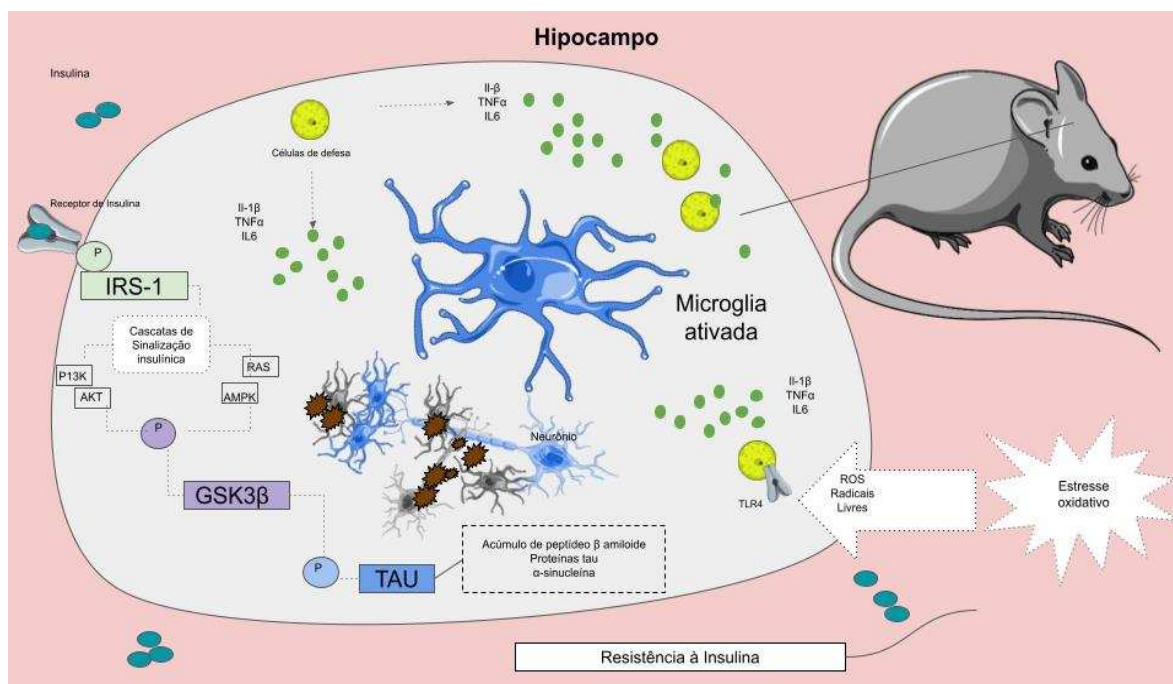


Figura 3: Vias de degeneração hipocampal. Esquema de vias ligadas ao mecanismo inflamatório por perda neuronal ocasionadas pela super ativação da microglia, acúmulo de peptídeo amiloide beta ($A\beta$) e aumento do estresse oxidativo. A insulina circulante no cérebro se liga ao receptor tirosina quinase (IR), que se autofosforila ativando cascatas sinalizatórias intracelulares, principalmente pelas vias P13K/AKT e RAS/MAPK. A AKT (Serine/threonine protein kinase) pode atuar inativando a enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) através da fosforilação. A regulação desta ativação é feita por resposta intracelular do hormônio insulina. A GSK3 não fosforilada (forma ativa), pode por sua vez, fosforilar a proteína TAU que está diretamente relacionada a apoptose celular e ao declínio cognitivo. A regulação das proteínas AKT, GSK3β, mTOR (Mammalian target of rapamycin) e MAPK (Mitogen-activated protein kinase) ocorre por fosforilação do substrato de serina específico para o receptor de insulina IRS1 e IRS2 (Kothari et al. 2017; Stanley et al. 2016; Arnold et al. 2018; Barone et al. 2019; Fiory et al. 2019). Design da figura por Smart Medical Art platform (<https://smart.servier.com/>).

Já foi reportado anteriormente na literatura que existe uma relação direta entre volume do hipocampo com a obesidade (Ayabe et al. 2018a). Isto parece relacionar-se com a neuroinflamação em áreas do cérebro envolvidas com a memória (Agustí et al. 2018). Ensaio em modelo animal de obesidade e hipercolesterolemia apontou semelhanças entre os cérebros sob declínio neurodegenerativo e obesos quando observados o acúmulo de peptídeo ($A\beta$), proteínas tau e α -sinucleína no órgão (de Bem et al. 2021). Entretanto, o depósito de $A\beta$ em camundongos só inicia por volta da sexta semana de vida progredindo de acordo com as condições do ambiente. Por esta razão, para efeito de avaliação do comprometimento cognitivo, os testes cognitivos devem ser aplicados somente após este período (de Bem et al. 2021).

A inflamação cerebral, portanto, ocorre em decorrência do aumento de estresse oxidativo, nível de endotoxinas, secreção de citocinas, lesão mecânica e patologias neurodegenerativas crônicas associadas ao acúmulo de $A\beta$ (Ayabe et al. 2018a). Os agregados proteicos, também conhecidos como placas senis, são produzidos a partir da proteína precursora amiloide de

ocorrência natural (APP) (Grodzicki & Dziendzikowska 2020). Contudo, vários aspectos das vias inflamatórias no cérebro ainda não estão totalmente esclarecidos, necessitando de mais estudos nesta área (Ayabe et al. 2020). E, a busca por uma maior compreensão do processo de envelhecimento a nível de biologia molecular visa minimizar os efeitos deletérios sobre a qualidade de vida da população adulta e idosa (Vazquez-Cervantes et al. 2021).

Neste contexto, alguns derivados do lúpulo se mostram promissores para aplicação protetora neuro inflamatória. Os ácidos amargos como iso-alfa-ácidos, dihidro-iso-alfa-ácidos, tetrahidro-iso-alfa-ácidos e hexahidro-alfa-ácidos já foram testados para efeitos de controle sobre o metabolismo de lipídeos e açúcares, e pareceram auxiliarem tanto na perda de peso quanto nos quadros de tolerância à glicose em animais (Hrnčič et al. 2019). Além disso, a suplementação de ácidos amargos na dieta demonstrou reduzir a ansiedade, por ação regulatória de dopamina no cérebro de animais com amnésia, atenuando a produção de alguns marcadores de estresse cerebral (Li et al. 2017; Ano et al. 2020), e ainda, suprimindo a ativação microglial e a inflamação cerebral em animais portadores da doença de Alzheimer (Miller & Spencer 2014; Ayabe et al. 2020; Alexaki 2021). De forma semelhante, o uso de lúpulo parece também regular a liberação de marcadores inflamatórios $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$ contra a atrofia hipocampal (Ayabe et al. 2018b).

Desta forma, a eficiência de obtenção tanto de alfa como beta ácidos do lúpulo por meio da técnica SFE, e os potenciais benefícios à saúde já evidenciados, surgem como alternativa promissora e para fins de investigação no que se refere ao papel protetivo que o extrato poderia exercer frente ao declínio cognitivo induzido pela obesidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DO EXTRATO SECO DE LÚPULO (ESL)

Origem do Lúpulo: Estados Unidos da América; Variedade: Citra® Brand 349 cv; Data da Safra: 2018; Produtor: Yakima Chief Hops; Fornecedor: Agraria Malte Brasil; Processo de Extração: Extração com Dióxido de Carbono (CO_2) Supercrítico; Processo de Secagem: Confidencial; Data de Produção: 08/2021; Lote: 01/2021.

4.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ESL

Para determinação dos compostos químicos presentes no extrato seco de lúpulo (ESL) a Rubian Extracts, empresa parceira deste projeto de pesquisa, utilizou as seguintes análises especificadas: Umidade e voláteis - AOAC (2012), Official Method 934.06. Cinzas - AOAC (2012), Official Method 940.26. Gorduras totais - IAL (2005), método 034B. Proteína - AOAC (2012), Official Method 920.152. Demais especificações como sódio e cálcio foram calculados com base nas informações provenientes dos fornecedores do material de parede; Quantificação de alfa-ácidos: ASBC – HOPS 6.B – Conductometric Titration Quantificação de beta-ácidos: ASBC –

Hops 8. Non-Isomerized Hop Extracts.

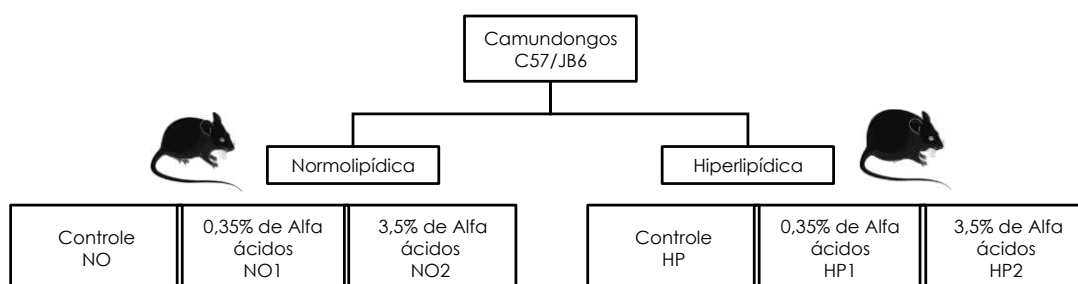
4.3. COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ESL

Para análises de compostos bioativos do ESL foram aplicados testes de capacidade redutora total por método Folin-Ciocalteu (Swain & Hillis 1959), flavonoides totais por (Zhishen et al. 1999), capacidade antioxidante por ferric-reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie & Strain 1996) e por oxygen radical absorbance capacity (ORAC) (Dávalos et al. 2004). Todas as análises foram realizadas em triplicata e as amostras foram analisadas por um espectrofotômetro de microplaca (Synergy HT, Biotek, Winooski, EUA) acoplado ao software de análise de dados Gen 5™ 2.0. Para as análises de polifenóis e antioxidantes, o ESL foi previamente diluído em etanol absoluto na proporção de 1:10 amostra:solvente sendo posteriormente submetido à filtração simples. A extração foi realizada quatro vezes para cada amostra usando um banho de ultrassom (10 min, 30 °C).

4.4. ENSAIO ANIMAL

O experimento animal foi submetido à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP), e aprovado com o número de protocolo 5822-1/2021, seguindo todos os requisitos éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Setenta e oito camundongos machos da linhagem C57/JB6 com 5 semanas de vida foram utilizados por serem menos suscetíveis à mudança de sabor amargo (Whitney & Harder 1994), além de também serem utilizados em diversos outros estudos de obesidade e cognição (West et al. 1992; de Bem et al. 2021). Os animais foram adquiridos no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Todos animais foram mantidos em duplas e/ou trios em caixas com água e alimentação sob livre acesso (*ad libitum*). O ambiente de instalação foi mantido a temperatura de 22+/-1°C e umidade relativa do ar entre 60% e 70% controladas, com ciclo claro/escuro de 12h. Todos os animais receberam ração comercial *Nuvilab* até completarem 6 semanas de vida durante o período de aclimação. Após, os camundongos foram pesados e distribuídos ao acaso em seis grupos de acordo com a dieta a ser oferecida:



Design por Smart Medical Art platform (<https://smart.servier.com/>).

As concentrações em alfa ácidos do ESL adicionadas nas dietas foram calculadas com base em estudos anteriores (Mahli et al. 2018; Ano et al. 2019b; Vazquez-Cervantes et al. 2021). Ademais, as dietas foram formuladas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (Reeves et al. 1993; White et al. 2013). A dieta hiperlipídica foi ajustada com AIN-93M adicionada de 31% de gordura de porco totalizando 35% de lipídios no peso total de dieta (60% do total de calorias) (Tabela 1).

Durante o período experimental, o consumo de dieta e peso corporal foram verificados a cada dois dias e uma vez por semana, respectivamente. As dietas foram substituídas três vezes por semana para minimizar a oxidação lipídica e a deterioração de compostos sensíveis. Ao final do experimento, para a eutanásia foi aplicado nos animais a combinação de quetamina (300 mg/kg) e xilazina (30mg/kg) por punção cardíaca, após seis horas de jejum. O sangue dos animais foi coletado em tubos sem anticoagulante. O material foi centrifugado (10.000 rpm, 4°C, 15 minutos), o soro foi separado e congelado em nitrogênio líquido a -80 °C até o momento das análises. Também foram coletados, pesados e congelados em nitrogênio líquido a -80 °C em biofreezer o fígado, cérebro, tecido adiposo epididimal e tecido adiposo retroperitoneal para as análises posteriores.

Tabela 1. Formulação das dietas normo lipídicas e hiperlipídicas.

Dietas	NO1 (%)	NO2 (%)	NO (%)	HP1 (%)	HP2 (%)	HP (%)
Proteína	14,2	14,2	14,2	14,2	14,2	14,2
Carboidrato	72,1	72,1	72,1	40,0	40,0	40,0
Gordura	4,0	4,0	4,0	36,1	36,1	36,1
Total (Kcal)	381	381	381	541,5	541,5	541,5
Total (Kcal/g)	3,81	3,81	3,81	5,41	5,41	5,41
Ingredientes AIN-93M (g/kg)	Peso (g)			Peso (g)		
Amido de Milho	46,6	46,6	5339,6	14,5	14,5	1659,0
Caseína (>85% proteína)	14,0	14,0	1605,2	14,0	14,0	1605,2
Amido de Milho Dextrinizado (90-94% tetrassacarídeo)	15,5	15,5	1777,2	15,5	15,5	1777,2
Sacarose	10,0	10,0	1146,6	10,0	10,0	1146,6
Óleo de Soja (sem aditivos)	4,0	4,0	458,6	4,0	4,0	458,6
Fibra	5,0	5,0	573,3	5,0	5,0	573,3
Mineral mix (AIN-93M- MX)	3,5	3,5	401,3	3,5	3,5	401,3

Vitamina mix (AIN-93.VX)	1,0	1,0	114,7	1,0	1,0	114,7
L-cistina	0,18	0,18	20,6	0,18	0,18	20,6
Bitartarato de Colina (41% colina)	0,25	0,25	28,7	0,25	0,25	28,7
Tert-butil hidroquinona	0,0008	0,0008	0,09	0,0008	0,0008	0,09
Banha de Porco	0	0	0	32,1	32,1	3680,6
ESL	0	14,06	140,6	0	14,06	140,6

Cálculo de formulação da dieta pela *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) (Reeves et al. 1993; White et al. 2013).

4.5. CONTROLE DO CONSUMO DIETÉTICO E GANHO DE PESO

Para análise do ganho de peso corporal relativo foi utilizada a fórmula: Ganho Relativo de Peso Corporal (%) = $(WG \times 100)/IW$, sendo: WG (peso final – peso inicial) e IW (peso inicial). Além disso, o consumo alimentar foi determinado considerando a quantidade de ração (em gramas) dada aos animais no início de uma semana, subtraído da quantidade de comida medida no final de uma semana. A ingestão energética foi calculada multiplicando-se a ingestão alimentar pela quantidade de energia de cada dieta (dieta normolipídica: 3,81 kcal/g e dieta hiperlipídica: 5,41 kcal/g).

4.6. PARÂMETROS DOS TESTES BIOQUÍMICOS

Durante e após o ensaio animal, foram realizadas as seguintes análises bioquímicas: glicose, perfil lipídico e adipocina resistina séricas. Para determinar o grau de resistência à insulina os animais foram submetidos aos testes de Tolerância à Glicose (GTT) e o Teste de Tolerância à Insulina (ITT) e glicose sérica (Nagy & Einwallner 2018). O teste de tolerância indireto (GTT) foi aplicado na 9ª semana. Após um jejum de 6 horas, a glicose sérica foi verificada por meio de amostras de sangue da veia caudal dos animais através de tiras para glicosímetro Free Style Lite (Abbott Diabetes Care, Alameda, CA, EUA) sendo os resultados expressos em dl^{-1} . A aplicação de D-glicose 20% via intraperitoneal (i.p.) foi realizada na concentração de $2g \cdot kg^{-1}$ de peso corporal. Posteriormente, foram coletadas por glicosímetro os teores de glicemia nos tempos: 0, 15, 30, e 60, 90 e 120 min. Na 10ª semana, para o teste de ITT a verificação de glicemia foi realizada nos animais após 6 horas de jejum. As amostras de sangue foram coletadas via veia caudal e medidos por tiras do glicosímetro nos tempos 0, 5, 15, 30 e 45 min. após a administração (i.p) de solução salina a 0,9% e insulina R humana à $0,75 U \cdot kg^{-1}$ de peso corporal (Novolin R, Novo Nordisk Bagsvaerd, DK). Kits ELISA comerciais (Peprotech, Ribeirão Preto-SP, Brasil) foram utilizados para determinação do colesterol total, triglicerídeos totais, LDL-colesterol, HDL-colesterol no soro dos animais, seguindo as orientações do fabricante. Para a análise da adipocina sérica resistina no

soro, foi aplicado o kit ELISA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), seguindo orientações do fabricante.

4.7. PARÂMETROS DOS TESTES ANTIOXIDANTES

As defesas antioxidantes de natureza endógena foram avaliadas através da determinação da atividade das GSH e superóxido dismutase (SOD) no homogenato do hipocampo. O preparo do hipocampo foi realizado conforme descrito por Batista et al. (2017) e Paxinos & Franklin (2004). Os homogenatos do hipocampo foram preparados em tampão fosfato (pH 7,4) usando um homogeneizador Polytron (MA102/Mini; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Para determinação das atividades foram aplicados os protocolos padronizados descritos por Faure & Lafond (1995) e Winterbourn & Hawkins et al. (1975). Os níveis reduzidos de glutathione (GSH) foram determinados no homogenato do cérebro e córtex dos animais diluídos em tampão fosfato 0.1M pH 7.4, v/v 1:10. A solução de GSH L-Glutathione reduzida (99%) ($0,5\mu\text{mol/ml}^{-1}$) foi usada como padrão e a absorbância foi lida a 412 nm. Os teores reduzidos de tiol foram expressos em nmol de proteína GSH mg^{-1} . A concentração de proteína de homogenatos de tecido foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em 1 μL de tampão fosfato adequadamente diluído. Os homogenatos foram adicionados na microplaca juntamente com a solução de hipoxantina (0,1 mmol), de xantina oxidase (0,07 U) e de azul de tetranitrotetrazólio (NTB) (0,6 mmol) em tampão fosfato nas proporções de 1:1:1. A reação cinética foi monitorada a 560 nm por 10 min (Winterbourn, Hawkins, Brian, & Carrell, 1975). A atividade da SOD foi expressa como proteína U mg^{-1} .

4.8. PARÂMETROS DOS TESTES DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

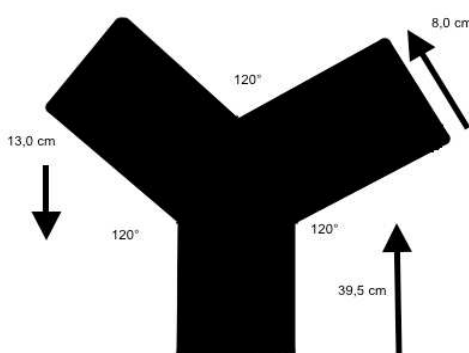
O preparo do hipocampo foi realizado conforme descrito por Batista et al. (2017) e Paxinos & Franklin (2004). Os homogenatos do hipocampo foram preparados em tampão fosfato (pH 7,4) usando um homogeneizador Polytron (MA102/Mini; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). O sobrenadante foi mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises de citocinas IL-1 β e TNF- α , ambas realizadas por kits ELISA comerciais (Peprotech, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

4.9. PARÂMETROS DO TESTE COGNITIVO

O desempenho comportamental de memória e aprendizagem foi avaliado através do teste do labirinto y-maze na 11ª semana de experimento. De acordo com o método proposto por (Hölter et al. 2015). A aplicação do teste do labirinto Y- maze consistiu em avaliar a memória espacial de camundongos em relação a entrada e saída dos braços dentro do labirinto no tempo de 8 minutos (Figura 4). O comportamento de alternância espontânea é definido como entrada sucessiva em cada um dos três braços (Fruchart et al, 1999). Espera-se que o animal tente explorar o novo ambiente, não repetindo o braço visitado recentemente. Ao menos 30 minutos antes do teste, cada animal

permaneceu em ambiente calmo e separado dos demais. Todas as imagens coletadas foram avaliadas em duplicata. A seguinte fórmula de pontuação final foi aplicada: pontuação de alternância (%) = $[(\text{número de alternâncias}) / (\text{entradas totais do braço} - 2)] \times 100$. Após, foi feita análise estatística one way ANOVA seguido por Tukey. O $p < 0,05$ foi utilizado como critério de significância estatística.

Figura 4. Representação gráfica do labirinto em Y.



Dimensões do aparato para realização do teste: altura de 13 cm x 39,5 cm de comprimento x 8 cm de largura. Cada braço do labirinto é idêntico e interligado por um triângulo de 120°.

4.10. PREPARO DO HIPOCAMPO

O preparo do hipocampo foi realizado conforme descrito em estudo anterior (Batista et al. 2017). A dissecação do hipocampo foi realizada colocando o cérebro congelado em uma placa de Petri limpa em gelo e coberta com tampão fosfato (pH 7,4). Com um bisturi, foram retirados o rombencéfalo e o bulbo olfatório. Cuidadosamente, em seguida o córtex cerebral foi separado do hipocampo com o uso de uma pinça. Devido à presença de ventrículos entre o mesencéfalo e o neocórtex, o hipocampo pôde ser isolado. Os hipocampos foram imediatamente extraídos em tampão de lise (10 mmol/L EDTA, 2 mmol/L PMSF, 100 mmol/L NaF, 10 mmol/L pirofosfato de sódio, 10 mmol/L NaVO₄, 10 µg /mL de aprotinina e 100 mmol/L de Tris, pH 7,4), homogeneizados usando o equipamento Polytron (MA102/Mini; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), e o sobrenadante foi mantido a -80 °C até a análise. A concentração de proteína foi avaliada com o ensaio de Bradford. Os homogenatos obtidos foram utilizados para análises de Western blot, análise de perfil inflamatório e defesa antioxidante.

4.11. TESTE DE SINALIZAÇÃO DE INSULINA E FORMAÇÃO DE PLACAS SENIS

O preparo do hipocampo foi realizado conforme descrito por Batista et al. (2017) e Paxinos & Franklin (2004). Os homogenatos do hipocampo foram preparados em tampão fosfato (pH 7,4) usando um homogeneizador Polytron (MA102/Mini; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil). Uma alíquota de proteína (40µg) foi carregada e separada via SDS-PAGE. Os hipocampos dissecados

foram homogeneizados em um coquetel de extração de proteínas (10 mmol L⁻¹ etilenodiamina, ácido tetraacético, 2 mmol L⁻¹ fenilmetano sulfonil-fluoreto, 100 mmol L⁻¹ NaF, 10 mmol L⁻¹ pirofosfato de sódio, 10 mmol L⁻¹ NaVO₄, 10 µg mL⁻¹ aprotinina e 100 mmol L⁻¹ Tris, pH 7,4). Após, os lisados foram preparados em gel 8% (p-IRS-1, IRS, p-GSK3-β e GSK3-β) e 12% (p-TAU e TAU) SDS-PAGE, e eletro transferidos para membrana de nitrocelulose (BioRad). Após a eletrotransferência, as membranas foram previamente incubadas com BSA a 5% para bloquear sítios antigênicos inespecíficos, seguidas de lavagem com TBS-T (0,1% Tris-tampão salino com 0,05% Tween 20, pH 7,4). Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários Cell Signaling Technology (Danvers, MA), na concentração 1:1000, durante a noite para avaliar o nível das proteínas: p-GSK-3β(Ser 9), p-tau (Thr 205), p-IRS-1 (34C7), GSK-3β (H-76), IRS-1(59G8), tau (TAU-5). Um padrão de peso molecular foi usado e executado simultaneamente em cada gel para determinação precisa do peso molecular adequado para cada anticorpo (BioRad #1610374). Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário IgG (Promega) 1:10000. O anticorpo β-Actin (13E5) (Cell Signaling) foi usado como controle interno e os resultados foram expressos como uma razão de proteínas-p/proteínas totais. As membranas foram expostas à solução de quimiluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) por 5 min para detectar bandas reativas, e capturadas usando o equipamento Gene Gnome e o software de aquisição de imagem GeneSys (Syngene Bio Imaging, Cambridge, Reino Unido). A densitometria de blot band foi adquirida usando o software NIH Image J 1.45s (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.12. PREPARO HISTOLÓGICO DO FÍGADO

Para a análise da doença hepática por indução de dieta hiperlipídica, foi utilizado o protocolo descrito por (Lenquist et al. 2019). Três fragmentos do órgão localizados no mesmo lobo foram coletados logo após a eutanásia, fixados em solução de formaldeído (10%), lavados em etanol 70%, desidratados em série alcoólica crescente, diafenizado em xileno e embebido em polímeros plásticos (Paraplast Plus, St. Louis, EUA). Os fragmentos foram seccionados em 5 µm de espessura em micrótomo Hyrax M60 (Zeiss, Munique, Alemanha) e submetidos à coloração de Hematoxilina-eosina para o preparo das lâminas (Nascimento et al. 2021).

4.13. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO

A análise das lâminas foi feita a partir dos softwares NIS-Elements/Image e Image Pro-Plus em imagens microscópicas digitais obtidas com o microscópio Nikon Eclipse E-400 (Nikon, Tóquio, Japão). Uma grade contendo 200 intersecções foi sobreposta em 3 imagens obtidas aleatoriamente (Aumento 400x) e 1 (Aumento de 100x) por animal. Os seguintes parâmetros foram quantificados: hepatócito mononucleado, hepatócito binucleado, citoplasma total, conteúdo lipídico, vasos sanguíneos e no infiltrado inflamatório (Jiang et al. 2011; Takahashi & Fukusato

2014; Lamas et al. 2018). Posteriormente, para determinar o grau de nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) foi aplicado o score descrito por (Takahashi & Fukusato 2014); as pontuações para os seguintes parâmetros avaliados foram: esteatose (0-3), inflamação (0-3) e balonismo hepatocelular (0-2). O somatório das pontuações refletiu no score final de atividade NAS, variando entre 0 e 8 (Kleiner et al. 2005; Roth et al. 2012).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Todas as análises de dados foram submetidas a retirada de outliers por Grubs 5%, seguido de um teste de normalidade considerando valores de curtose e assimetria entre -2 e 2 (George & Mallery, 2003). O teste *t-student* com correção de Welch foi aplicado se duas amostras distintas e após aplicação de one-way ANOVA e Tukey. Todos os grupos foram analisados por One-way ou Two-way ANOVA (se o tempo fosse uma variável envolvida) seguido de Tukey. O $p < 0,05$ foi considerado para determinar diferença estatística.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISES DO EXTRATO

O método de extração com dióxido de carbono supercrítico mostrou, em termos quantitativos, influenciar no perfil de pureza dos ácidos amargos alfa, beta e no perfil antioxidante indicados pelos valores da análise de ORAC e FRAP (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil composicional do extrato seco de lúpulo.

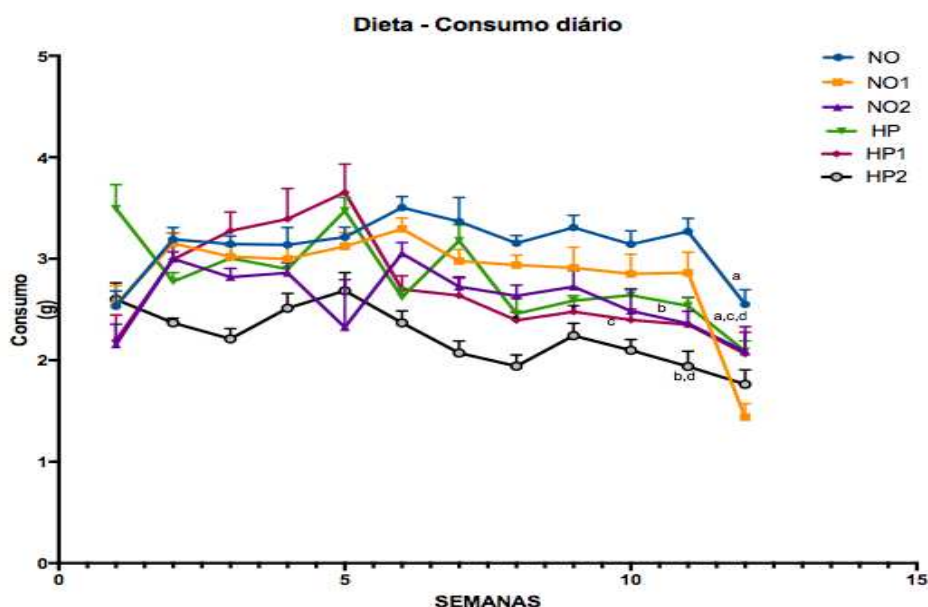
Análise	Extrato de Lúpulo. (mg/g de peso seco)	Média na literatura (% p/p)	Referências
Umidade (%)	4,1	10,0 *	(Zhang et al. 2021; Carbone & Gervasi 2022)
Lipídeos (%)	17,68	3,0 *	(Zhang et al. 2021; Carbone & Gervasi 2022)
Proteína (%)	0,13	15,0 *	(Zhang et al. 2021; Carbone & Gervasi 2022)
Cálcio (%)	0,01	-	-
Sódio (%)	0,04	-	-
Cinzas (%)	0,07	8,0 *	(Zhang et al. 2021; Carbone & Gervasi 2022)

Carboidratos (%)	64,71	-	-
Valor energético total (Kcal)	3,91	-	-
FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)	$73,63 \pm 2,10$	7.44 ± 0.04^a	(Muzykiewicz et al. 2019)
ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$)	$22,68 \pm 5,80$	$14,85^b$	(Yamaguchi et al. 2009)
TPC (mg GAE/g)	24.46 ± 1.52	$28,51 \pm 1,26^{a,c,d}$	(Mikyška & Jurková 2019; Almeida et al. 2020; Arruda et al. 2021)
Flavonoides totais (mg QE/g)	2.61 ± 0.15	$5,15 \pm 0,58^{d,e}$	(Mikyška & Jurková 2019; Arruda et al. 2021)
Humulona (g)	14,22	2-15	(Zhang et al. 2021; Carbone & Gervasi 2022)
Lupulona (g)	3,84	2-10	(Zhang et al. 2021; Carbone & Gervasi 2022)

Abreviações: (a) Utilização dos solventes Álcool metílico, etílico e isopropílico em diferentes concentrações em folhas frescas de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) (Muzykiewicz et al., 2019); (b) A fração rica em humulonas de (*Humulus lupulus* L.) foi produzida por fracionamento de um extrato de CO₂ seguido de purificação com água alcalina usada como eluente aquoso em pH 10. A fração rica em lupulonas foi produzida por fracionamento do extrato de CO₂, seguido de purificação por meio de tratamento com carvão ativo em uma solução aquosa a pH 10 (Yamaguchi et al., 2009); (c) Compostos bioativos extraídos através de solução de etanol 49% a 52 °C (Almeida et al., 2020); (d) Cones de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) foram maceradas e homogeneizadas com 25 ml de etanol 96% (v/v) (Arruda et al., 2021); (e) O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) moído foi extraído com água fervente sob refluxo. Após o resfriamento, o material foi centrifugado (Mikyška & Jurková, 2019); * Médias descritas por artigos de revisão de literatura; GAE: equivalente de ácido gálico, QE: equivalente de quercetina, TE: equivalente Trolox e TPC: conteúdo fenólico total.

6.2. ANÁLISES DE PESO E CONSUMO DA DIETA

Semanalmente o consumo da dieta foi de aproximadamente 5g/animal/dia. Os animais dos grupos normo e hiperlipídico nas doses máximas tiveram maior instabilidade na aceitação da dieta em relação aos grupos controles (Figura 5) ($p < 0,05$) ($n=73$, retirada de 1 outlier do grupo NO1, 2 NO2 e 2 HP2).

Figura 5. Consumo dietético.

Dados avaliados por ANOVA two-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: (a) NO versus HP, (b) NO2 versus HP2, (c) HP versus HP1 e (d) HP versus HP2. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

O grupo hiperlipídico dose mínima obteve melhor aceitação da dieta em relação ao controle e, entre o grupo dose máxima durante todo período do experimento, sendo o consumo diário em gramas e calorias equiparável (Tabela 3). Houve diferença estatística entre NO versus HP (a), NO2 versus HP2 (b), HP versus HP1 (c) e HP versus HP2 (d) ($p < 0,05$). Na última semana, o grupo NO1 sofreu baixa de um animal.

Tabela 3. Parâmetros de crescimento, ingestão alimentar e peso cerebral dos camundongos após doze semanas de experimento.

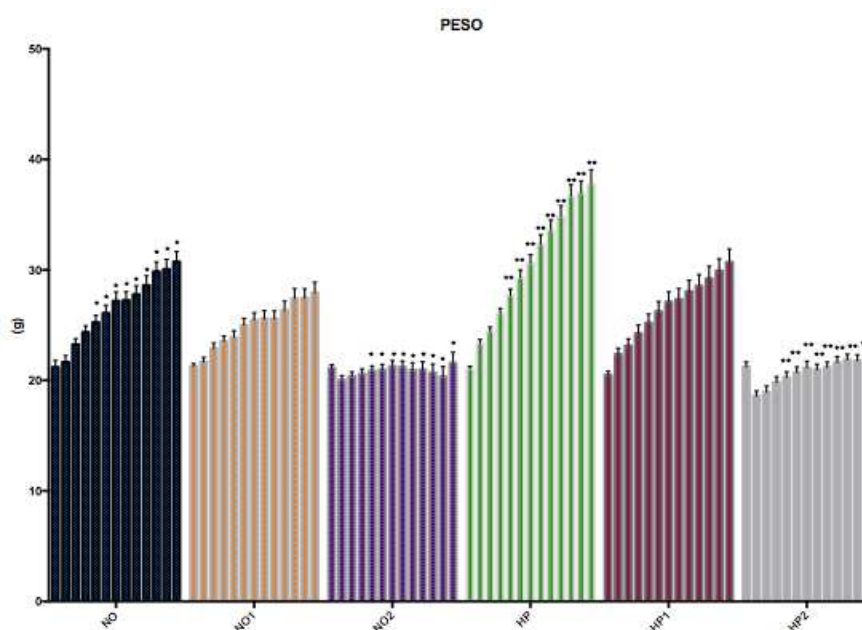
Parâmetros	Grupo experimental					
	NO	NO1	NO2	HP	HP1	HP2
Consumo						
semanal	47,6 $\pm$ 4,4 ^d	43,8 $\pm$ 4,32	39,7 $\pm$ 4,61 ^d	42,3 $\pm$ 5,88 ^b	40,8 $\pm$ 7,27	33,3 $\pm$ 4,11 ^b
(g)						
Ingestão						
calórica total	1859,0 $\pm$ 6,17 ^a	1711,0 $\pm$ 4,73	1550,56 $\pm$ 6,30	2353,8 $\pm$ 6,34 ^{a #b}	2268,5 $\pm$ 8,25 ^{#c}	1854,2 $\pm$ 4,15 ^{b,c}
(Kcal)						

Consumo de alfa e beta ácidos (g/dia)	0	0,16	1,38	0	0,14	1,16
Peso final (g)	26,4±3,92 ^d	24,84±3,02	20,85±2,07 ^d	30,4±6,01 ^b	26,4±4,27	20,8±1,97 ^b
Ganho de peso final (g)	9,5±0,47 ^d	6,66±1,06	0,46±1,0 ^d	16,7±1,85 ^b	10,2±1,44	0,8±0,08 ^b
Peso do cérebro (g 100 g ⁻¹ do peso corporal total)	0,32±0,01	0,32±0,11	0,32±0,11	0,32±0,01	0,31±0,08	0,32±0,08

Dados avaliados por ANOVA one-way, two-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: (a) NO versus HP; (#) HP versus HP1; (b) HP versus HP2; (c) HP1 versus HP2; (d) NO versus NO2.

Com o aumento crescente de consumo da dieta nas primeiras semanas após o período de aclimação, a obesidade induzida foi atingida a partir da quinta semana de experimento em relação aos grupos submetidos a dieta normolipídica (NO) ($p < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Controle de peso semanal.



Dados avaliados por ANOVA two-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: (*) NO versus N2 (**) HP versus HP2. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta

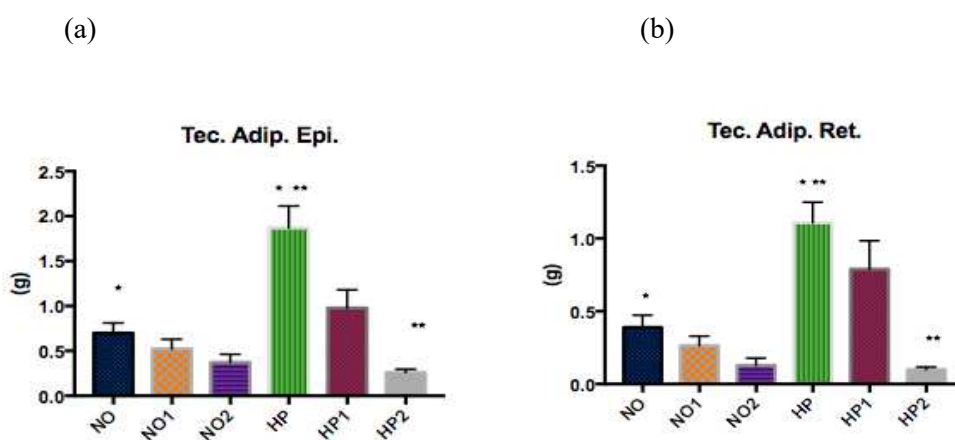
Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

Os animais dos grupos tratados na dose máxima, NO2 e HP2 mantiveram seus pesos menores durante maior parte das semanas em relação a seus respectivos grupos controles NO e HP (Figura 6) (Tabela 3). Até a quarta semana, os grupos hiperlipídicos mantiveram o ganho de peso semelhante ($p < 0,05$) ($n=73$, retirada de 1 outlier do grupo NO1, 2 NO2 e 2 HP2).

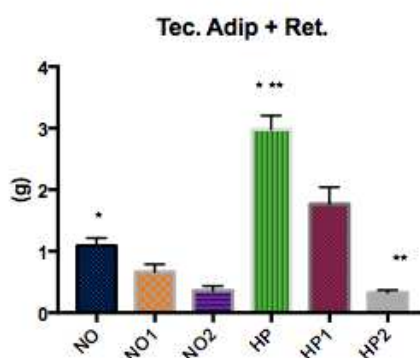
Através da análise tecidual *pós mortem*, os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal bem como seu somatório, indicaram que os grupos HP e HP1 apresentaram depósitos de gordura epididimal ($n=72$, retirada de 2 outliers NO1, 3 NO2, 1 HP2), retroperitoneal ($n=68$, retirada de 2 outliers do grupo NO1, 6 NO2, 2 HP2) e total (epididimal mais retroperitoneal) maiores em comparação com os grupos magros e o grupo HP2 ($p < 0,05$) devido a limitada indução da obesidade e consequente acúmulo de tecido adiposo subcutâneo (Figura 7). Contudo, não houve diferença estatística de deposição entre HP e HP1, o gráfico mostra uma tendência para sua diminuição a partir do uso do ESL, indicando que ocorreu uma melhor mobilização de gordura entre animais tratados (Figura 7-C).

Diferente do grupo HP2, a ingestão calórica entre os animais sob dieta hiperlipídica na concentração menor HP1 foi semelhante grupo controle HP, o que explica não ter havido diferença estatística no ganho de peso total (Tabela 3) ($p < 0,05$). Assim, os resultados do presente estudo indicam que a capacidade de indução da obesidade no grupo HP2 foi limitada. Além disso, o uso de ESL também reduziu a deposição de gordura (tecido adiposo epididimal mais retroperitoneal) no grupo HP1 em relação ao controle HP (Tabela 3).

Figura 7. Acúmulo de tecido adiposo total.



(c)



Dados avaliados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: Pesos em gramas dos tecidos adiposo epididimal (a), retroperitoneal (b) e total (c). (*) NO versus HP (**) HP versus HP2. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

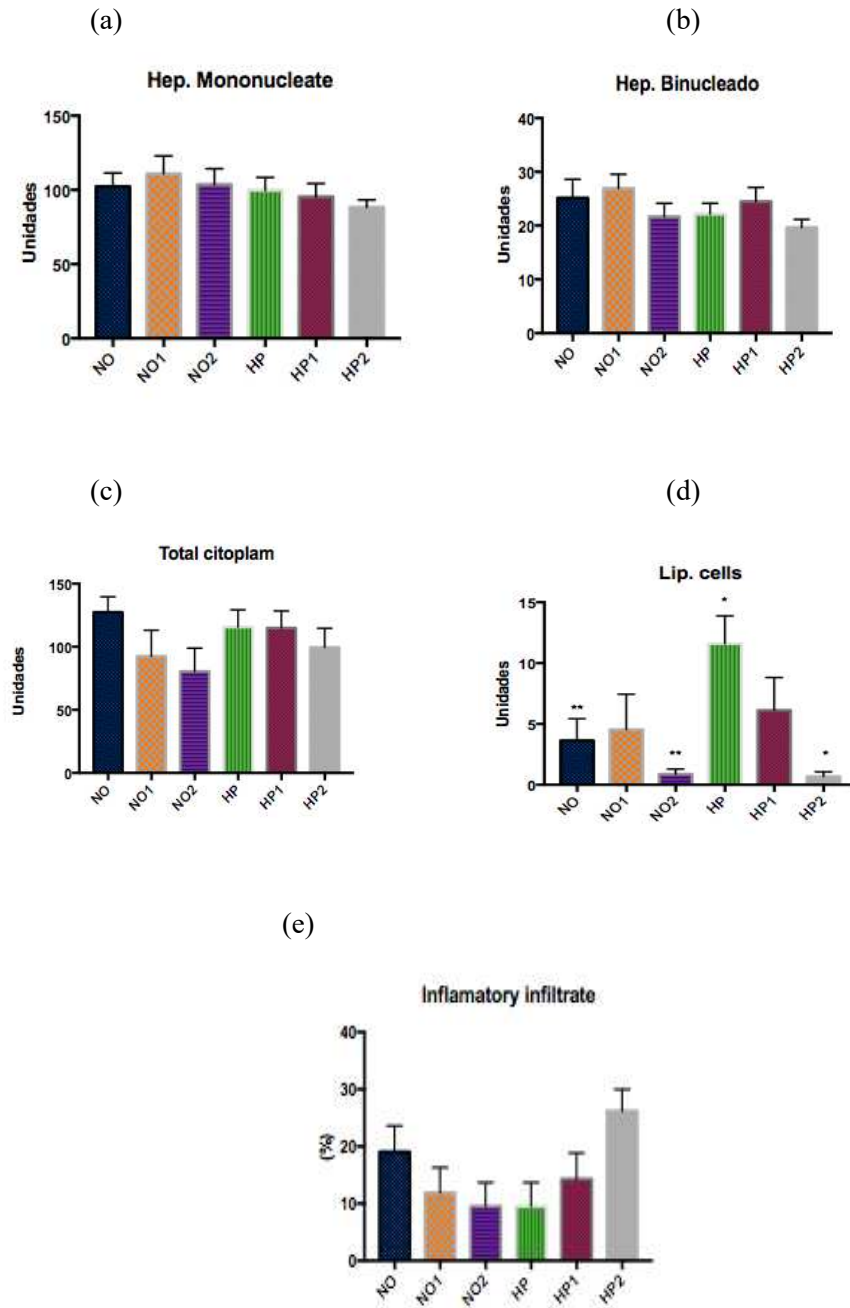
6.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO

O nível de estresse oxidativo no fígado em decorrência da indução de obesidade foi avaliado por meio de análise histológica. O escore de atividade para Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) (NAS) (esteatose/inflamação/degeneração baloniforme) e o estágio de fibrose foram realizados usando os critérios clínicos descritos por Kleiner et al. (2005), Roth et al. (2012), Takahashi & Fukusato (2014) (Figuras 8 e 9). A relação do NAS com o diagnóstico de esteato-hepatite é mostrada na tabela 4; Pontuação entre 0 a 5 foi considerado não diagnóstico de esteato-hepatite, casos com pontuação > 5 é diagnosticado presença de esteato-hepatite.

De acordo com os dados coletados não foram encontradas evidências de esteatose, inflamação e degeneração balonística nos grupos submetidos à dieta normolipídica (score 3). Já entre os animais tratados com dieta hiperlipídica, em especial HP e HP1, houve maior concentração de glóbulos de gordura e hipertrofia que nas células hepáticas que no grupo controle NO (score 4 e 3 para NAS, respectivamente) (Tabela 4, $p < 0,05$).

A tendência de esteatose micro e macrovesicular, com presença de focos de inflamação e degeneração balonística foram mais observadas nos grupos obesos HP, HP1 e HP2 (Figura 9 G-L). De acordo com o score NAFLD usado, o extrato pareceu interferir positivamente na mitigação do estresse oxidativo ocasionado pela obesidade, embora não tenha sido demonstrada diferença estatística entre os grupos tratados e não tratados com ESL ($p < 0,05$) ($n=69$, retirada de 4 outliers do NO1, 2 NO2, 1 HP1 e 2 HP2).

Figura 8. Análise Histológica do fígado. Determinação do grau de doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD).

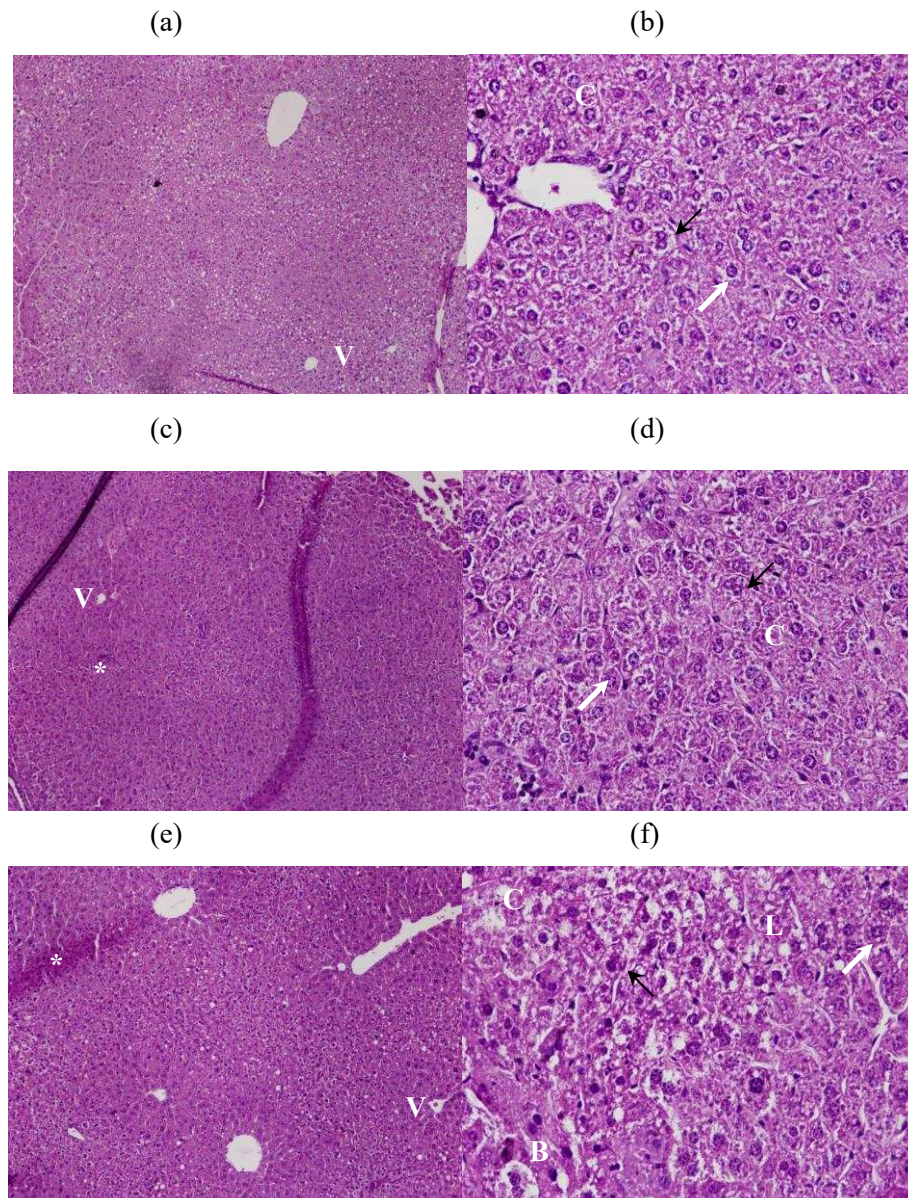


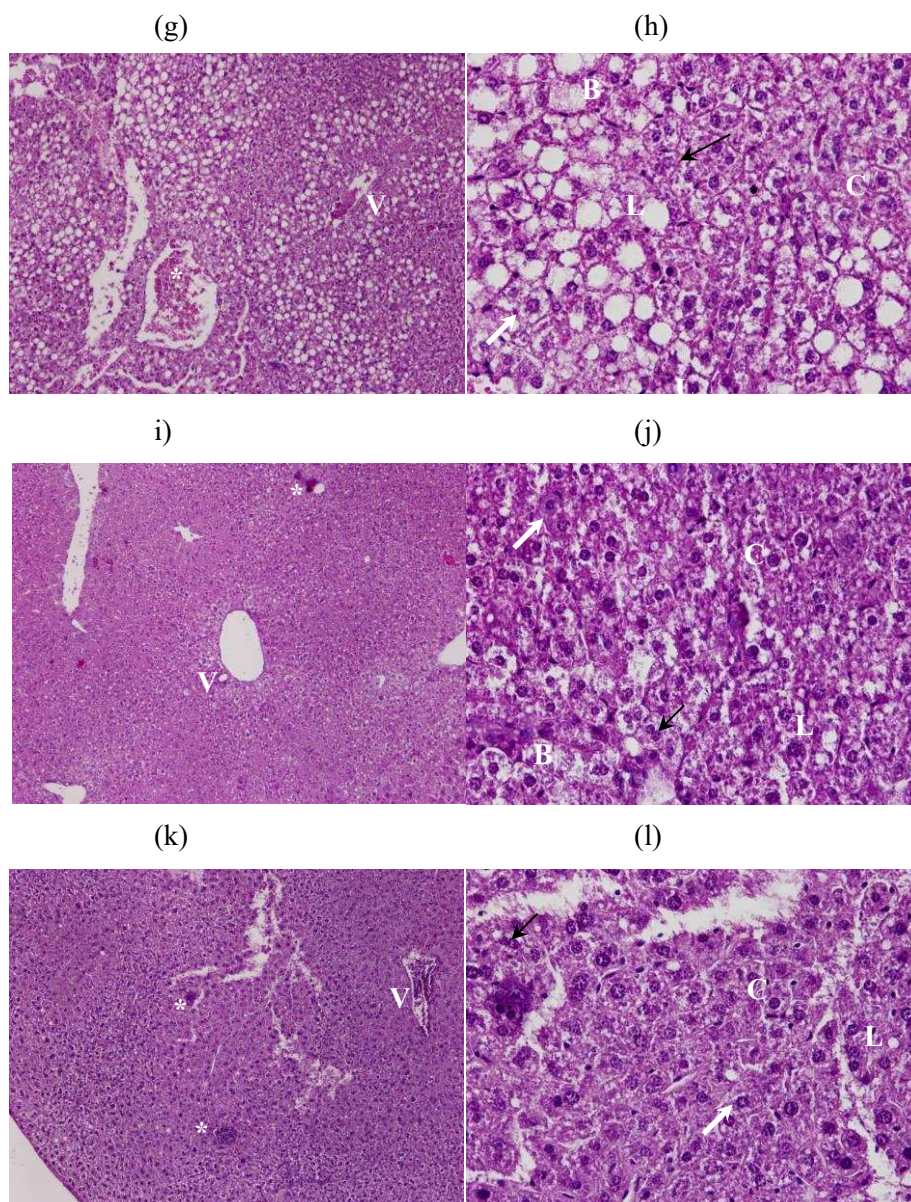
Dados avaliados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: Hepatócito mononucleado (a), Hepatócito binucleado (b), citoplasma total (c), células lipídicas (d), infiltrados inflamatórios (e). (*) Grupo NO versus NO2 (**) NO2 versus HP2. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

Tabela 4. Pontuação histopatológica NAS.

Grupo	Esteatose (0-3)	Balonismo Celular (0-2)	Inflamação (0-3)	Score NAS* (0-8)
NO	0.1 ± 0,5	1.9 ± 0,4	0.9 ± 0,7	3
NO1	0.0 ± 0,0	2.0 ± 0,0	1.3 ± 1,0	3
NO2	0.0 ± 0,0	2.0 ± 0,0	0.8 ± 0,7	3
HP	0,7 ± 0,8	2.0 ± 0,0	1.2 ± 0,6	4
HP1	0.3 ± 0,5	2.0 ± 0,0	1.2 ± 0,4	3
HP2	0.0 ± 0,0	2.0 ± 0,0	1.2 ± 0,7	3

Abreviação: (*) Sistema de Pontuação para presença de esteato-hepatite não alcoólica (NAS). O somatório das pontuações refletiu no score final de atividade NAS, variando entre 0 e 8 (Kleiner et al. 2005; Roth et al. 2012). Aplicação do score seguindo os parâmetros; esteatose (0-3), inflamação (0-3) e balonismo hepatocelular (0-2) (Takahashi & Fukusato 2014).

Figura 9. Histologia do fígado



Fotomicrografias de fígado coradas com hematoxilina e eosina. Abreviação: (A-B) Grupo NO (C-D) Grupo NO1 (E-F) Grupo NO2 (G-H) Grupo HP (I-J) Grupo HP1 (K-L) Grupo HP2. Seta branca (hepatócito mononucleado); Seta preta (hepatócito binucleado); asterisco (infiltrado inflamatório); C (citoplasma); L (lipídio); B (Balonismo celular) e V (vasos sanguíneos) (Lamas et al. 2020). Barra = 200 μm^2 .

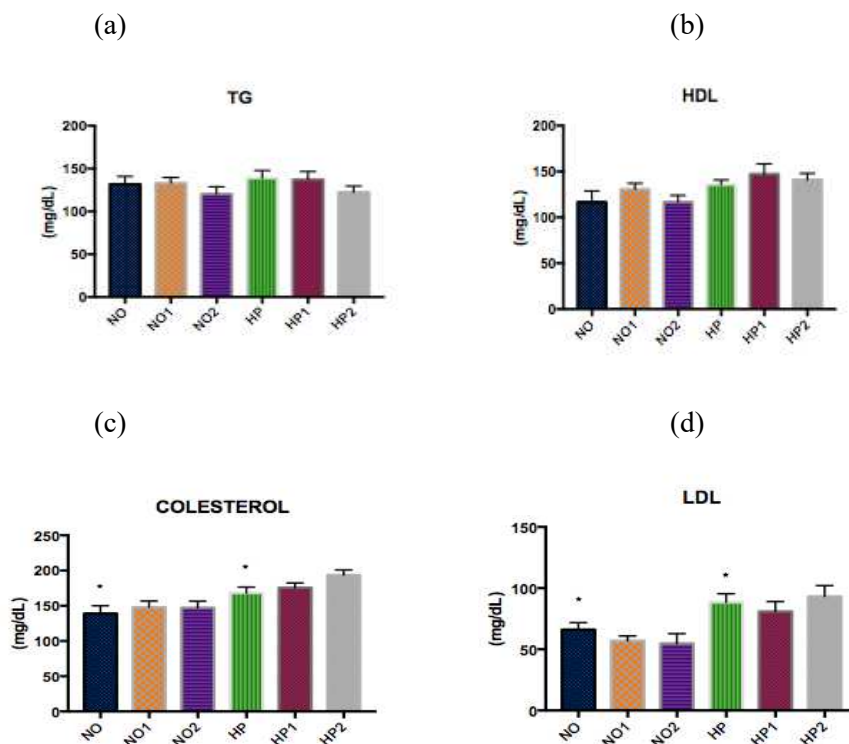
ANÁLISES DE PERFIL BIOQUÍMICO

6.4. PERFIL LIPÍDICO

O perfil lipídico dos animais submetidos ao consumo do extrato de lúpulo não exibiu diferenças estatísticas em relação aos grupos controles para os parâmetros de TG e HDL ($p < 0,05$) ($n=73$, retirada de 2 outliers do grupo NO1, 2 NO2 e 1 HP2). Através da análise de Colesterol e LDL, embora não tenha havido diferença estatística, foi observado que o consumo de ESL na maior dosagem não protegeu contra a desregulação destes fatores na presença da obesidade (NO2

versus HP2) ($p < 0,05$) ($n=73$, retirada de 1 outlier do grupo NO, 2 NO1, 1 HP1 e 1 HP2) (Figura 10).

Figura 10. Análise de perfil lipídico.



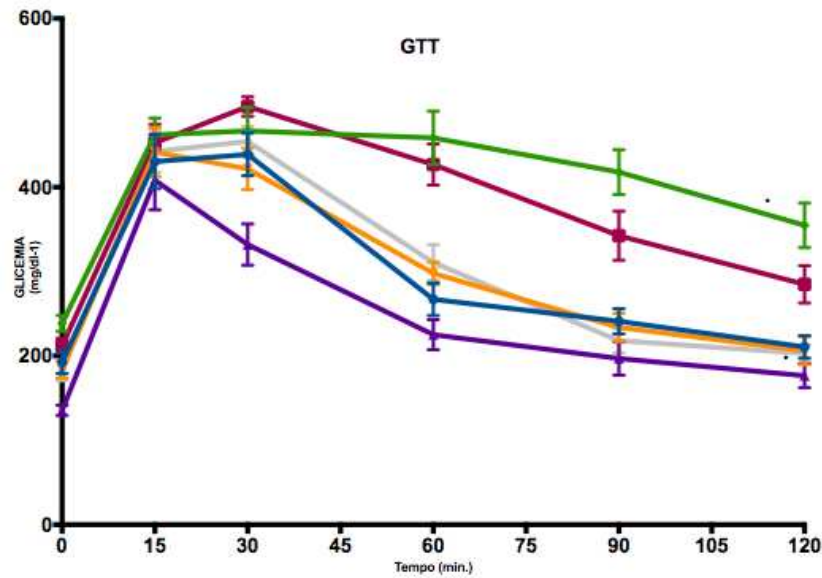
Dados avaliados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: Nível dos parâmetros TG (a), HDL (b), Colesterol total (c), LDL (d) do soro. (*) NO versus HP. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

6.5. GTT E ITT

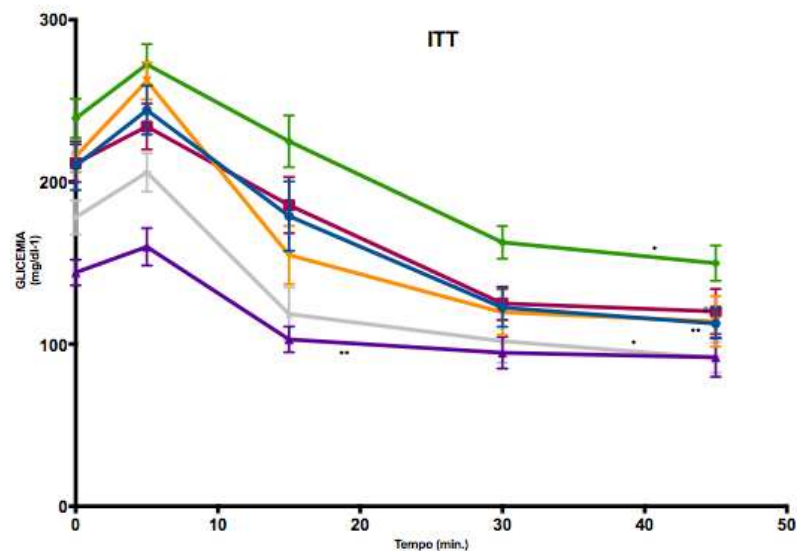
Em relação ao teste de glicose sanguínea o grupo hiperlipidêmico controle apresentou maior resistência à normalização das taxas de GTT em comparação com a maior dose de extrato HP2 em resposta à injeção de glicose (tempo 120', $p < 0,05$) ($n=76$, retirada de 1 outlier do grupo NO1 e 1 HP2) (Figura 11-A). Da mesma forma, os grupos normolipidico e hiperlipídico tratados com dose maior (NO2 e HP2) também apresentaram níveis reduzidos de glicose no teste ITT (tempo 15' e 45', respectivamente $p < 0,05$) ($n=75$, retirada de 1 outlier do grupo NO1, 1 NO2 e 1 grupo HP2) após a injeção de insulina em relação aos seus grupos controles (HP e NO). Com o resultado, foi observado que o uso de ESL foi protetivo ao controle glicêmico dos animais (Figura 11-B).

Figura 11. Análise de perfil glicêmico.

(a)



(b)

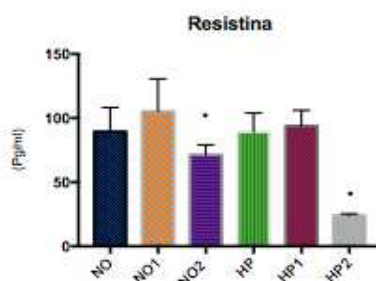


Dados avaliados por ANOVA two-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: (a) Níveis de glicemia aferidos pelos testes de tolerância à glicose (GTT) (b) Níveis de glicemia aferidos pelos testes de tolerância à insulina (ITT) (*) HP versus HP2 (**) NO versus NO2. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

6.6. ADIPONECTINA

A partir do teste da adiponectina resistina, considerado um possível indicador de resistência à insulina, não foi detectado diferença entre os grupos tratados e controle ($p < 0,05$) ($n=21$, retirada de 1 NO1, 1 HP1, 1HP2) (Figura 12). Aplicando o teste t student com correção de Welch, houve diferença estatística entre os grupos NO2 versus HP2. Vale ressaltar, entretanto, que o t test não detectou estatística para os grupos NO versus HP ($p < 0,05$). (*) NO2 versus HP2. Dados avaliados por ANOVA two-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM.

Figura 12. Nível de resistina do soro.



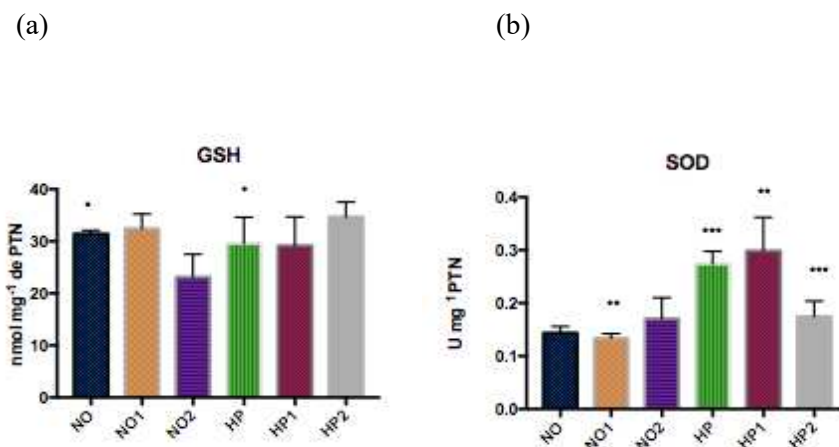
Dados avaliados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$), e t -student com correção de Welch. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: (*) Grupos NO2 versus HP2. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

ANÁLISES DE PERFIL ANTIOXIDANTE

6.7. GSH e SOD

A resposta enzimática ao estímulo de espécies reativas de oxigênio oriundas do quadro de obesidade também foi mensurado. Os níveis de GSH não modificaram com o uso do ESL pelo teste estatístico de one way ANOVA ($p < 0,05$) ($n=26$, retirada de 3 outliers do grupo NO, 3 NO1, 2 HP e 2 HP2) (Figura 13-A).

Figura 13. Perfil antioxidante enzimático no hipocampo.



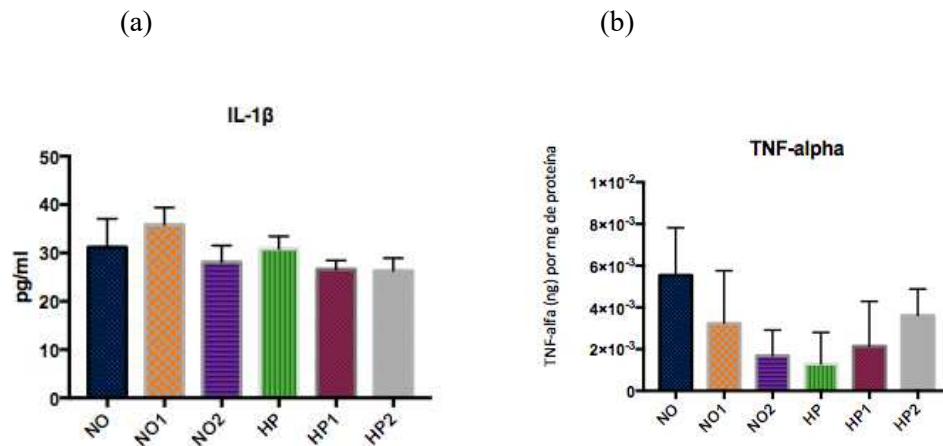
Dados avaliados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$) e *t*-student com correção de Welch. Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: Aferição sobre a capacidade de resposta ao estresse oxidativo aumentado por meio das enzimas GSH (a) e SOD (b). (*) Grupo NO versus HP (**) Grupos NO1 versus HP1. (***) Grupos HP versus HP2. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

Adicionalmente, é esperado que a obesidade esgote fontes de antioxidantes por se tratar de quadro crônico inflamatório. Neste cenário, a atividade de enzimas como superóxido dismutase (SOD) tendem a diminuir sua atividade (Fernández-Sánchez et al. 2011; Ge et al. 2019). Fato observado aplicando o teste *t* student para os grupos HP versus HP2 (Vale ressaltar que o *t* test não detectou diferença estatística para os grupos NO versus HP ($p < 0,05$). Curiosamente, através da aplicação da análise para a enzima, foi percebido que o ESL aumentou a atividade na dose menor de ESL para animais obesos (NO 1 versus HP1, $p < 0,05$) ($n=35$, retirada de 1 outlier do grupo NO1) (Figura 13-B).

ANÁLISES DE PERFIL INFLAMATÓRIO

6.8. IL-1 β e TNF- α

Para avaliar possível efeito protetor anti inflamatório do ESL nos animais, foram medidos os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α presentes no hipocampo. Posteriormente, os resultados obtidos foram comparados com grupos controles do experimento (Figura 14). De acordo com os dados obtidos, não houve diferenças estatísticas entre os grupos controle hiperlipídico e/ou normolipidêmicos com e sem suplementação do extrato ($p < 0,05$) ($n=36$).

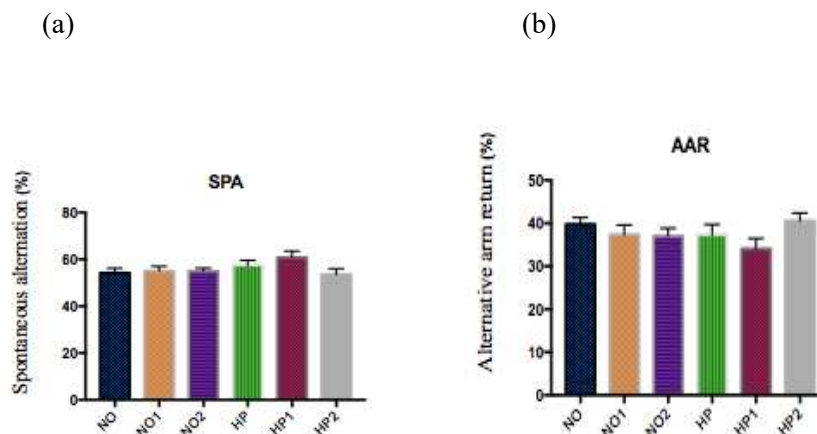
Figura 14. Nível de citocinas inflamatórias no hipocampo.

Dados avaliados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

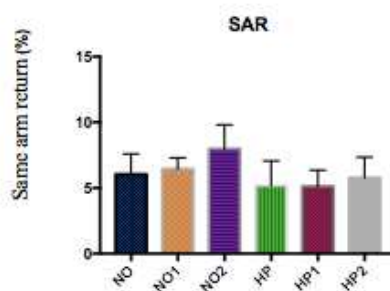
ANÁLISES DE PERFIL COGNITIVO

6.9. TESTE Y-MAZE

Para avaliar a memória de trabalho e memória espacial de curto prazo, os animais foram submetidos a análises do labirinto em Y. De acordo com os dados colhidos, foi observado que não houve diferença estatística entre os grupos tratados e controle para os parâmetros spontaneous alternation (SPA), alternative arm return (AAR) e same arm return (SAR) ($p < 0,05$) ($n=76$, retirada de 1 outlier do grupo NO1 e 1 HP2) (Figura 15).

Figura 15. Análise do teste cognitivo.

(c)



Dados avaliados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: (a) Percentual do comportamento para Spontaneous alternation (SPA), (b) alternative arm return (AAR) e (c) same arm return (SAR). Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

6.10. TESTES DE SINALIZAÇÃO INSULÍNICA E FORMAÇÃO DE PLACAS SENIS

Para complementar os dados coletados pelo teste cognitivo, foi aplicado a análise por Western blot das proteínas cerebrais indicadoras de neurodegeneração p-TAU, TAU, p-GSK3 β , GSK-3 β , e p-IRS-1, IRS-1 e, a beta actina como controle em cada teste aplicado.

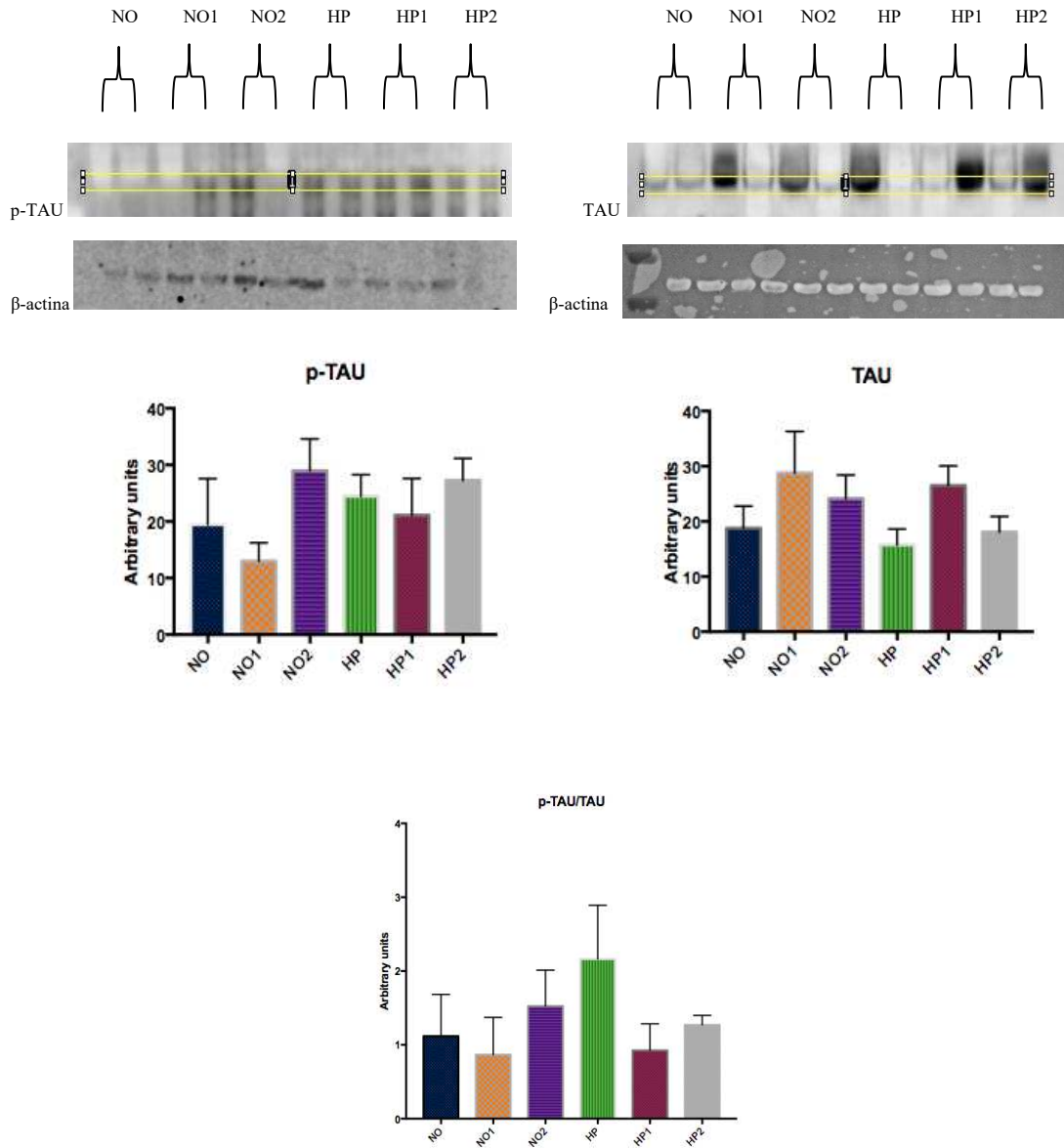
A proteína p-GSK-3 β apresentou diferença estatística entre os grupos NO versus HP ($p < 0,05$), como já esperado pois o grupo (HP) apresentaria marcadores inflamatórios em desequilíbrio (Figura 16-B). Entretanto, a relação entre p-GSK3 β /GSK3 β nos grupos NO2 versus HP2 e, a diferença estatística detectada entre NO1 e NO2, mostra que o ESL interferiu positivamente ($p < 0,05$). Todavia, a diferença detectada entre estes últimos, não contou com a interferência da dieta hiperlipídica.

A partir da análise de p-IRS-1 verificou-se que o grupo HP2 foi beneficiado com a diminuição da expressão da proteína por uso do ESL (HP versus HP2, $p < 0,05$). Já os dados coletados da proteína IRS-1 mostra que além de NO versus HP, também houve diferenças estatísticas entre NO versus NO2, NO1 versus NO2 e NO1 versus HP1. De forma que, a relação entre p-IRS1/IRS1 também mostrou significância entre NO versus HP, NO versus NO2 e entre NO1 versus NO2 ($p < 0,05$). Sendo assim, de forma semelhante, à dieta hiperlipídica não interferiu decisivamente para aumento da expressão de IRS1.

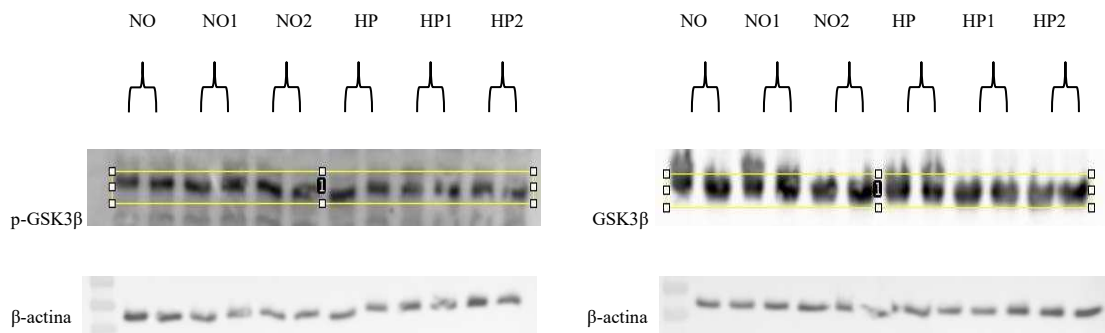
Os demais resultados obtidos corroboraram o teste de cognição y-maze. Ou seja, não foram detectadas diferenças estatísticas para indicadores de declínio cognitivo entre os grupos testados ($p < 0,05$, $n=36$, sendo 2 animais/grupo/membrana) (Figura 16).

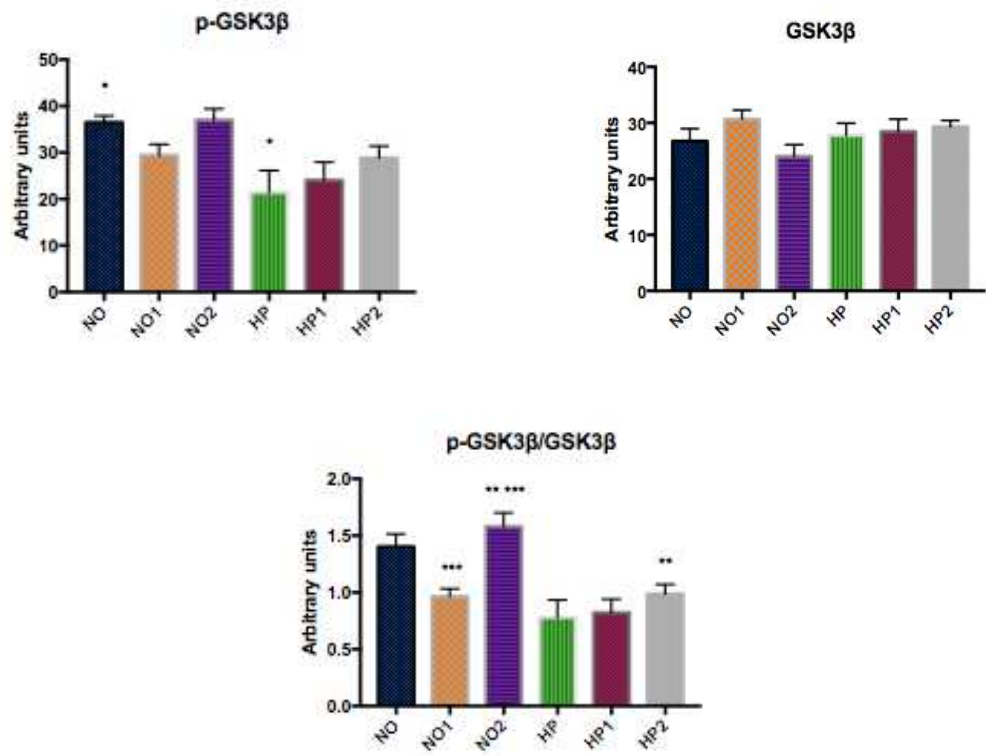
Figura 16. Marcadores proteicos para degeneração cerebral no hipocampo.

(a)

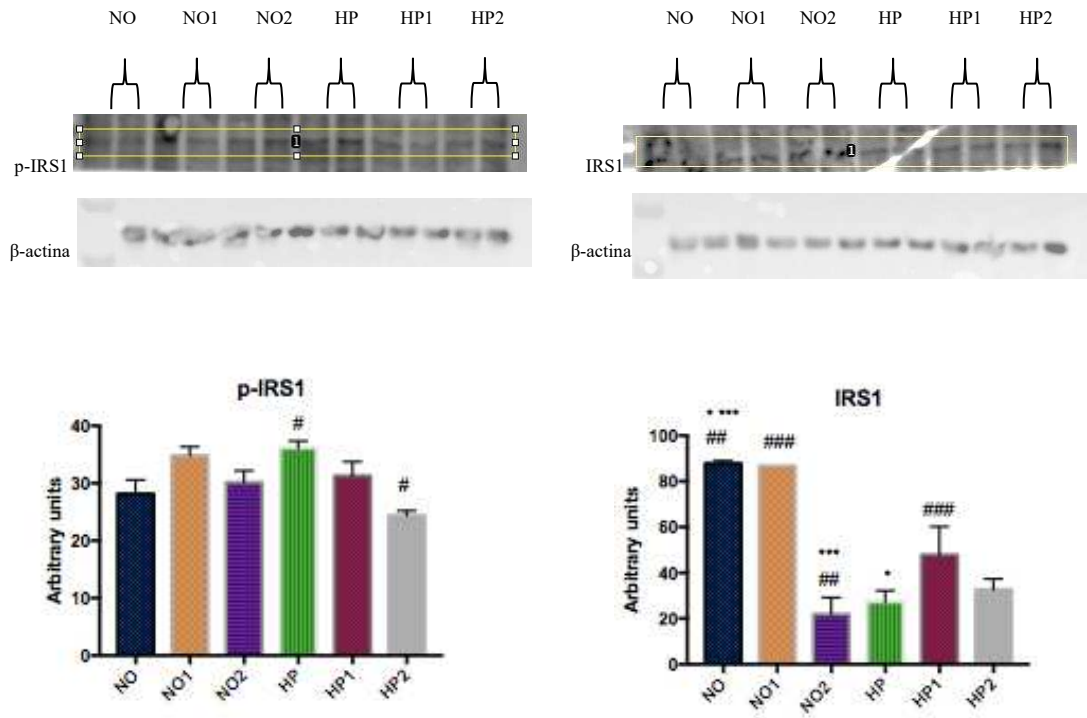


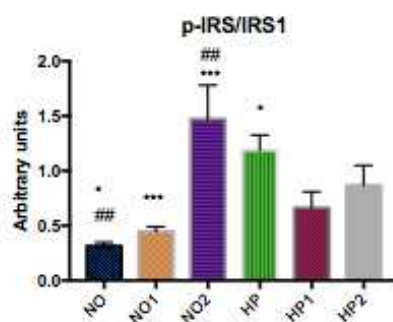
(b)





(c)





Dados avaliados por ANOVA one-way e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média $\pm$ SEM. Abreviações: Análise por Western blot para as proteínas cerebrais (fosforiladas e fosforilada/total) indicadores de neurodegeneração: (a) TAU, (b) GSK-3 β , e (c) IRS-1. (*) Grupos NO versus HP (**) NO2 versus HP2 (***) NO1 versus NO2 (#) HP versus HP2 (##) NO versus NO2 (###) NO1 versus HP1. Legenda: (NO) Dieta Normolipídica Controle, (NO1) Dieta Normolipídica dose 0,35% de alfa ácidos, (NO2) Dieta Normolipídica dose 3,5% de alfa ácidos, (HP) Dieta Hiperlipídica Controle, (HP1) Dieta Hiperlipídica dose 0,35% de alfa ácidos e (HP2) Dieta Hiperlipídica dose 3,5% de alfa ácidos.

7. DISCUSSÃO

A proposta do atual estudo foi investigar efeitos cognitivos em camundongos alimentados com extrato seco de lúpulo elaborado com a técnica de extração por dióxido de carbono supercrítico, todos os resultados da pesquisa estão expressos na Tabela 5. O uso da tecnologia visou otimizar o isolamento dos compostos ácidos alfa e beta, contando com as concentrações percentuais em ácidos alfa (15,24%) e ácidos beta (4,11%) por peso seco. Embora possa haver divergências de composição entre diferentes espécies já avaliadas, através das análises espectrofotométricas feitas com o *Humulus lupulus L.*, sob a perspectiva de proteção antioxidante, o ESL do estudo atual revelou ser fonte de compostos bioativos protetores (Tabela 2). É importante ressaltar que após o processo de fervura do lúpulo, os α -ácidos podem também ser convertidos em iso- α -ácidos, estes compostos isomerizados são mais solúveis que os α -ácidos e podem beneficiar diferentes tipos de aplicações, inclusive relacionadas a aplicabilidade biológica já descritas em diversos trabalhos científicos anteriores (Zhang et al. 2021).

Alguns vegetais são apontados como coadjuvantes na reversão de déficits de aprendizagem e memória, processos naturalmente afetados pelo envelhecimento e pelo aumento do estresse oxidativo (Medina dos Santos et al. 2023). Neste sentido, buscou-se comprovar a ação dos ácidos amargos alfa e beta, sobre a capacidade inibitória de NO $\cdot$ (componente de potencial citotóxico) e na mitigação da super estimulação da microglia, fatores associados à degeneração neural em pesquisas realizadas em modelo animal (Li et al. 2017; Ayabe et al. 2020; Alexaki 2021). Para fins de averiguação do desempenho comportamental de memória e aprendizagem na presença do quadro de obesidade, o teste cognitivo y-maze foi aplicado durante a 11ª semana de vida dos animais. Três

parâmetros foram avaliados: Controle de alternância espontânea (SPA), retorno do braço alternativo (AAR) e retorno do mesmo braço (SAR), porém nenhum grupo tratado com ESL mostrou diferença estatística em relação aos seus respectivos grupos controles (Figura 15). O período escolhido para a aplicação do teste foi estratégico, na medida em que somente a partir da sexta semana de vida de camundongos é possível encontrar depósitos de peptídeo beta-amilóide (A β) no cérebro (de Bem et al. 2021). O acúmulo de peptídeo beta amiloide (A β), em decorrência da obesidade (estado inflamatório de baixo grau), contribui ativamente para a aceleração do surgimento das doenças neurocognitivas (Grodzicki & Dziendzikowska 2020; de Bem et al. 2021).

Para fins de complementação da análise cognitiva y-maze foi averiguado o nível de expressão de algumas proteínas indicadoras de neurodegeneração no hipocampo. A partir da análise de Western blot foi observado parcialmente resultados compatíveis ao teste cognitivo y-maze aplicado. Ou seja, a dieta hiperlipídica não alterou a resposta de expressão das proteínas p-TAU e TAU sinalizadoras de degradação cognitiva entre os animais tratados com ESL (Figura 16). Embora tenha sido verificado uma tendência de diminuição da TAU na relação p-TAU/TAU entre os grupos (HP1) e (HP2) (Figura 16). Sabe-se que a hiperfosforilação e a agregação de proteína TAU são indícios do processo de neurodegeneração (Benítez et al. 2021). Estudos anteriores já apontaram que o uso de iso-alfa-ácidos (IAA) presentes no lúpulo amenizariam a inflamação no hipocampo de camundongos portadores de Alzheimer, uma vez que estes compostos reduziram níveis da proteína TAU fosforilada no cérebro (Ano et al. 2017, 2019a). O uso do ESL entre os grupos do estudo, no entanto, não exerceu diferença estatística para o marcador.

Em contrapartida, na relação de p-GSK3 β /GSK3 β foi encontrado diferença entre os grupos que receberam maior dosagem de extrato (NO2) e (HP2) ($p < 0,05$). Sabe-se que uma das vias proteicas mais frequentemente associadas à fosforilação da TAU é a feita por inativação da proteína GSK3 β (Lv et al. 2017; Huang et al. 2018). Uma eventual desregulação insulínica poderia contribuir para a atividade da GSK3 β , uma das quinases responsáveis pela fosforilação da tau, favorecendo disfunções sinápticas e consequente declínio cognitivo (Batista et al. 2017). De acordo com os achados da pesquisa, a ingestão de ESL minimizou a fosforilação da tau mediada por GSK3 β no hipocampo (Figura 16-B). De forma semelhante, a sinalização adequada de insulina pode evitar que ocorra a fosforilação de substratos serina/treonina (Ser/Thr) da proteína IRS1 também ligada à fosforilação da proteína TAU (Batista et al. 2017; Engin and Engin 2017). Neste contexto, foi verificado que a expressão de proteína IRS1 entre os animais submetidos a dieta normolipídica na menor dose (NO1) apresentaram melhor resposta ao uso do ESL. Entretanto, na relação de p-IRS1/IRS1, somente foi verificado diferença estatística entre os grupos normolipidêmicos (NO1) e (NO2) ($p < 0,05$), sugerindo a ocorrência de uma melhor resposta a insulina nos animais do grupo magro (Figura 16-C).

Em roedores o tecido adiposo é capaz de secretar adipocina como a resistina, que resiste à ação do hormônio insulina prejudicando a homeostase da glicose (Tripathi et al. 2020). Assim, níveis

séricos aumentados de resistina estão associados ao surgimento do Diabetes Mellitus (DM2), doença de Alzheimer (DA) (Demirci et al. 2017; Kshirsagar et al. 2021), e pode ser indicativo do processo de neurodegeneração (Bednarska-Makaruk et al. 2017). A partir da análise de resistina sérica aplicada no presente estudo, não foi encontrada diferença estatística em relação aos grupos tratados e controles; embora o grupo (HP2) tenha apresentado menor nível de resistina circulante no plasma em comparação aos demais grupos após aplicação do teste *t* student entre os grupos (NO2) e (HP2) ($p < 0,05$) (Figura 12).

Para analisar o perfil glicêmico dos animais foram aplicados os testes de tolerância à glicemia (GTT) e à insulina (ITT). A partir do teste GTT foi possível observar que os animais submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica (HP1) e (HP2), apresentaram menor área sob a curva para resposta glicêmica após receberem injeção de glicose em relação ao grupo controle (HP) ($p < 0,05$), apontando melhora da resistência periférica à glicemia. (Figura 11). De forma semelhante, o uso do ESL também mostrou atenuar a sensibilidade de resposta insulínica entre animais dos grupos (HP1) e (HP2) pós período de jejum de seis horas ($p < 0,05$) (Figura 11). Ambos resultados podem ajudar a explicar os indicadores de proteção de perda cognitiva evidenciados pela expressão das proteínas anteriormente mencionadas (relação $p\text{-GSK3}\beta$ / $\text{GSK3}\beta$ e IRS1). Curiosamente, em relação ao perfil lipídico, nenhuma diferença estatística foi identificada.

Devido ao acentuado sabor amargo dos ácidos alfa e beta, foi observado que os animais submetidos a dieta (HP2) tiveram dificuldade de ganhar peso, fato observado pelo consumo calórico e deposição de gordura menores (Tabela 3, Figura 7). Em contrapartida, a deposição de gordura total (retroperitoneal e epididimal) dos grupos hiperlipídicos na menor dosagem (HP1) e o grupo controle HP não foi estatisticamente diferentes. Por meio da análise histológica do fígado foi evidenciado que embora os grupos sob dieta hiperlipídica propenciam ao acometimento do quadro de esteatose, nenhum grupo alcançou escore > 5 para NAFLD, excluindo uma possível lesão hepática ocasionada pela indução da dieta rica em gordura. A histologia hepática foi avaliada usando o sistema de pontuação da Rede de Pesquisa Clínica (CRN) para esteato-hepatite não alcoólica (NASH), um índice indicativo de risco de desenvolvimento de síndrome metabólica associada à necroinflamação hepática, fibrose e cirrose hepática (Roth et al. 2012) (Tabela 4). Anteriormente já foi reportado na literatura que o uso dos compostos IAA do lúpulo seriam capazes de mitigar quadros de esteatose hepática, inflamação e fibrose (Mahli et al. 2018). Segundo os autores, os IAA conseguem inibir o acúmulo de lipídios e parece agirem na expressão do receptor proliferador de peroxissomo específico gama (PPAR- γ) e enzimas-chave na síntese lipídica, etapas fisiopatológicas precursoras para o desenvolvimento de NAFLD (Mahli et al. 2018; Ponticelli et al. 2021). A partir dos dados coletados, é possível inferir que o uso do ESL pode ter atuado nesta via estimulando a oxidação hepática de ácidos graxos (Miura et al. 2005).

O surgimento precoce das doenças neurocognitivas anteriormente relacionadas ao período senescente da vida também está intimamente ligado ao desequilíbrio da capacidade antioxidante

(Grodzicki & Dziendzikowska 2020). O acúmulo de tecido adiposo é responsável pela indução de alterações no perfil oxidativo. Por esta razão, neste estudo foram averiguados os níveis da enzima SOD e de GSH no hipocampo e córtex dos animais (Ge et al. 2019; Vazquez-Cervantes et al. 2021). Os resultados mostraram que a produção de SOD aumentou no grupo (HP1), mas diminuiu grupo (HP2) ($p < 0,05$) (Figura 13). Anteriormente, já tinha sido reportado, em estudo com camundongos, que o composto Xantohumol do lúpulo foi capaz de induzir o aumento dos níveis de SOD e GSH, e diminuir dos níveis dos marcadores de estresse oxidativo Malondialdeído (MDA) e ROS (Lv et al. 2017). A diferença de ingestão entre os grupos tratados com a dieta hiperlipídica pode explicar o efeito contrário na produção de SOD, uma vez que o excesso de peso provocaria maior demanda pelo equilíbrio antioxidante a nível sistêmico e cerebral (Hidalgo-Lanussa et al. 2020). Em relação à modulação de atividade da enzima GSH, não houve diferença entre os grupos tratados e não tratados com o ESL.

Sabe-se que em quadros de hiperglicemia, a respiração aeróbica mitocondrial se eleva, demandando maior atividade da cadeia de transporte de elétrons e a produção de compostos glicosilados. O cenário de estresse oxidativo aumentado corrobora para a ativação de cascatas inflamatórias mediadas por NF- κ B, AMP-c e proteína ativadora 1 (Ponticelli et al. 2021). Os compostos IAA presentes no lúpulo neste sentido, já demonstraram exercer atividade anti-inflamatória, inibindo a via do NF- κ B (Ponticelli et al. 2021). Este composto parece agir em várias quinases e na secreção desregulada de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias relacionadas à obesidade (Ponticelli et al. 2021), sendo uma possível explicação para alguns efeitos encontrados no estudo, como a diminuição do acúmulo de gordura e possível inativação de cascatas pró-inflamatórias (Tabela 3). Fato que também já foi observado em pesquisas anteriores (Bortoluzzi et al. 2016; Ano et al. 2019).

Sabe-se que diversos marcadores inflamatórios são encontrados em maiores concentrações em indivíduos obesos. Dietas contendo alto teor em gorduras fazem as células dendríticas (leucócitos) estimularem a secreção de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 além de receptores do tipo TLR4 (Engin and Engin 2017). Além disso, o aumento da expressão de interleucina IL-6 na obesidade, por exemplo, pode induzir a resistência à insulina. O motivo seria que tanto a IL-6 quanto TNF- α , outra citocina inflamatória, auxiliam na ativação c-Jun Quinase N-terminal (JNK) e na NF- κ B, proteínas sinalizadoras de bloqueio para ação da insulina (Alexaki, 2021). Desta forma, para fins de avaliação sobre a capacidade anti inflamatória do ESL as citocinas inflamatórias investigadas TNF- α e IL-1 β mostraram que a suplementação do extrato na dieta não foi protetivo, contrariando em parte, alguns resultados já reportados na literatura sobre o uso de ácidos amargos do lúpulo (Bortoluzzi et al. 2016; Ayabe et al. 2018a) (Figura 14). Os relatos, no entanto, se referem a ação protetora dos beta ácidos em tecido do íleo de frango na diminuição de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β & IFN- γ (Bortoluzzi et al., 2016); E, na supressão da produção de TNF- α em camundongos C57BL/6 animais obesos suplementados com IAA na concentração de 0,05% (p/p) (Ayabe et al.

2018a), diferente da proposta de dosagem do presente estudo. Ademais, na literatura já foi reportado a existência de uma relação direta entre volume do hipocampo com a obesidade por causa da hipertrofia causada por consumo de dieta hiperlipídica e portanto, inflamatória (Borshchev et al. 2019). Neste estudo, no entanto, não foi detectada diferenças estatísticas entre os pesos dos cérebro dos grupos tratados e controle extraídos na eutanásia (Tabela 3).

Ademais, considerando as diferenças farmacocinética e farmacodinâmica, entre o modelo experimental e a possibilidade para aplicação humana, a quantidade de ESL seria equivalente às dosagens de 0,09 mg/kg na dose mais baixa e 0,91mg/kg para a mais alta. A extrapolação foi obtida a partir do método dose equivalente humana (HED) determinada pela equação $HED (mg / kg = Animal NOAEL mg/kg) \times (Weight_{animal} [kg]/Weight_{human} [kg])^{(1-0.67)}$ (Nair & Jacob, 2016). O valor HED obtido é ainda dividido pelo fator de 10, para aumentar o nível de segurança na conversão à aplicação humana.

Por fim, durante as 14 semanas de experimento, apenas cinco animais foram excluídos do estudo, sendo: dois do grupo (HP2) decorrentes da crescente dificuldade de adaptação da dieta e perda ponderal de peso, dois do grupo (NO2) durante a aplicação do teste de ITT e um do grupo (NO1) por briga dentro da caixa.

Tabela 5. Resultados dos marcadores biológicos avaliados em relação ao uso de ESL.

	Resposta Positiva	Resposta Negativa	Não conclusivo/ Não comprovado
Controle de Peso	X		
Acúmulo de Gordura	X		
Score NAFLD	X		
Triglicerídeos			X
HDL-c			X
LDL-c			X
Colesterol Total			X
GTT	X		
ITT	X		
Resistina	X		
GSH			X
SOD	X		
IL-1 β			X
TNF-a			X
SPA-maze			X

AAR-maze	X
SAR-maze	X
TAU	X
GSK3 β	X
IRS-1	X

8. CONCLUSÃO

A suplementação de dieta com extrato seco de lúpulo (ESL) nas concentrações 0.35g/kg e 3,5g/kg em ácidos alfa mostrou proteger camundongos C57/JB6 obesos contra o desequilíbrio glicêmico e redução do ganho de peso. A partir dos testes de tolerância glicêmica e tolerância à insulina foi verificado melhor controle de estabilização dos níveis de glicemia entre os animais tratados com extrato em relação aos grupos controles magro (NO) e obeso (HP) ($p < 0,05$). O benefício parece estar diretamente relacionado à melhora da regulação do metabolismo glicêmico por ação bioativa dos alfa ácidos e perfil de polifenóis do extrato obtidos pela técnica de extração SFE. Ao favorecer a resposta glicêmica, o ESL também contribuiu para redução do estresse oxidativo, verificado pelo perfil enzimático de SOD, e de sinalizadores de degeneração cerebral GSK3 β e IRS1 ($p < 0,05$), estes por sua vez, podem ter atenuado o processo de fosforilação de proteínas TAU e redução do acúmulo de peptídeo amilóide- β , alguns dos principais marcadores de danos neurodegenerativos.

9. REFERÊNCIAS

- Acero N, Ortega T, Villagrasa V, Leon G, Muñoz-Mingarro D, Castillo E, et al. Phytotherapeutic alternatives for neurodegenerative dementias: Scientific review, discussion and therapeutic proposal. Vol. 37, *Phytotherapy Research*. John Wiley and Sons Ltd; 2023. p. 1176–211.
- Agustí A, García-Pardo MP, López-Almela I, Campillo I, Maes M, Romani-Pérez M, et al. Interplay between the gut-brain axis, obesity and cognitive function. *Front Neurosci*. 2018;12(MAR):1–17.
- Alexaki VI. The Impact of Obesity on Microglial Function: Immune, Metabolic and Endocrine Perspectives. *Cells*. 2021;10(7).
- Almeida A da R, Maciel MV de OB, Machado MH, Bazzo GC, de Armas RD, Vitorino VB, et al. Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. *Int J Food Sci Technol*. 2020 Jan 1;55(1):340–7.
- Ano Y, Dohata A, Taniguchi Y, Hoshi A, Uchida K, Takashima A, et al. Iso- α -acids, bitter components of beer, prevent inflammation and cognitive decline induced in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 2017;292(9):3720–8.
- Ano Y, Kitaoka S, Ohya R, Kondo K, Furuyashiki T. Hop bitter acids increase hippocampal dopaminergic activity in a mouse model of social defeat stress. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):1–12.
- Ano Y, Ohya R, Kondo K, Nakayama H. Iso- α -acids, hop-derived bitter components of beer, attenuate age-related inflammation and cognitive decline. *Front Aging Neurosci*. 2019a;10(FEB):1–9.
- Ano Y, Yoshikawa M, Takaichi Y, Michikawa M, Uchida K, Nakayama H, et al. Iso- α -acids, bitter components in beer, suppress inflammatory responses and attenuate neural hyperactivation in the hippocampus. *Front Pharmacol*. 2019b;10(FEB):1–10.
- Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: Concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2018;14(3):168–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2017.185>
- Arruda TR, Pinheiro PF, Silva PI, Bernardes PC. A new perspective of a well-recognized raw material: Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities and α - and β -acids profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. *Lwt* [Internet]. 2021;141(January):110905. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110905>
- Astray G, Gullón P, Gullón B, Munekata PES, Lorenzo JM. *Humulus lupulus* L. as a natural source of functional biomolecules. *Appl Sci*. 2020;10(15).
- Ayabe T, Fukuda T, Ano Y. Improving effects of hop-derived bitter acids in beer on cognitive functions: A new strategy for vagus nerve stimulation. *Biomolecules*. 2020;10(1):1–15.
- Ayabe T, Ohya R, Kondo K, Ano Y. Iso- α -acids, bitter components of beer, prevent obesity-induced cognitive decline. *Sci Rep* [Internet]. 2018a;8(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23213-9>
- Ayabe T, Ohya R, Taniguchi Y, Shindo K, Kondo K, Ano Y. Matured Hop-Derived Bitter Components in Beer Improve Hippocampus-Dependent Memory Through Activation of the Vagus Nerve. *Sci Rep*. 2018b;8(1):1–10.
- Bakkar NMZ, Dwaib HS, Fares S, Eid AH, Al-Dhaheri Y, El-Yazbi AF. Cardiac autonomic neuropathy: A progressive consequence of chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes and related metabolic disorders. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23):1–20.
- Barone E, Tramutola A, Triani F, Calcagnini S, Di Domenico F, Ripoli C, et al. Biliverdin Reductase-A Mediates the Beneficial Effects of Intranasal Insulin in Alzheimer Disease. *Mol Neurobiol*. 2019;56(4):2922–43.

- Batista ÂG, Soares ES, Mendonça MCP, da Silva JK, Dionísio AP, Sartori CR, et al. Jaboticaba berry peel intake prevents insulin-resistance-induced tau phosphorylation in mice. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(10):1–10.
- de Bem AF, Krolow R, Farias HR, de Rezende VL, Gelain DP, Moreira JCF, et al. Animal Models of Metabolic Disorders in the Study of Neurodegenerative Diseases: An Overview. *Front Neurosci*. 2021;14(January):1–22.
- Benítez MJ, Cuadros R, Jiménez JS. Phosphorylation and dephosphorylation of tau protein by the catalytic subunit of PKA, as probed by electrophoretic mobility retard. *J Alzheimer's Dis*. 2021;79(3):1143–56.
- Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Vol. 239, *Analytical Biochemistry*. 1996.
- Bessac A, Cani PD, Meunier E, Dietrich G, Knauf C. Inflammation and gut-brain axis during type 2 diabetes: Focus on the crosstalk between intestinal immune cells and enteric nervous system. *Front Neurosci*. 2018;12(OCT):1–9.
- Biessels GJ, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(11):660–71.
- Borshchev YY, Uspensky YP, Galagudza MM. Pathogenetic pathways of cognitive dysfunction and dementia in metabolic syndrome. *Life Sci* [Internet]. 2019;237:116932. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116932>.
- Bortoluzzi C, Menten JFM, Silveira H, Melo ADB, Rostagno MH. Hops β -acids (*Humulus lupulus*) decrease intestinal gene expression of proinflammatory cytokines in an ex-vivo model. *J Appl Poult Res* [Internet]. 2016 Jun;25(2):191–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056617119302235>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional. Relatórios de acesso público. Brasília, DF: MS, 2020. Disponível em: <http://sisaps.saude.gov.br/sisvan/relatoriopublico/index>. Acesso em: 07 mai. 2023.
- Carbone K, Gervasi F. An Updated Review of the Genus *Humulus*: A Valuable Source of Bioactive Compounds for Health and Disease Prevention. *Plants*. 2022;11(24).
- Castro CB, Whittock LD, Whittock SP, Leggett G, Koutoulis A. DNA sequence and expression variation of hop (*Humulus lupulus*) valerophenone synthase (VPS), a key gene in bitter acid biosynthesis. *Ann Bot*. 2008;102(2):265–73.
- Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K, Haegeman G, De Keukeleire D, Heyerick A. Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *J Nat Prod* [Internet]. 2009 Jun 26;72(6):1220–30. Available from: <https://doi.org/10.1021/np800740m>
- Crispino M, Trinchese G, Penna E, Cimmino F, Catapano A, Villano I, et al. Interplay between peripheral and central inflammation in obesity-promoted disorders: The impact on synaptic mitochondrial functions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):1–22.
- Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J Agric Food Chem*. 2004 Jan 14;52(1):48–54.
- Demirci S, Aynal A, Demirci K, Demirci S, Aridoğan BC. The serum levels of resistin and its relationship with other proinflammatory cytokines in patients with Alzheimer's disease. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2017;15(1):59–63.
- Durello RS, Silva LM, Bogusz S., Lucas M. Silva. Química do lúpulo. *Química nova*. 2019;42(8):900–19.
- Easterling KA, Pitra NJ, Morcol TB, Aquino JR, Lopes LG, Bussey KC, et al. Identification

- of tandem repeat families from long-read sequences of *Humulus lupulus*. *PLoS One*. 2020;15(6):1–20.
- Engin AB, Engin A. Obesity and Lipotoxicity. 2017;960. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5>.
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):3117–32.
- Fiory F, Perruolo G, Cimmino I, Cabaro S, Pignalosa FC, Miele C, et al. The Relevance of Insulin Action in the Dopaminergic System. *Front Neurosci*. 2019;13(August):1–16.
- Fukuda T, Ohnuma T, Obara K, Kondo S, Arai H, Ano Y. Supplementation with Matured Hop Bitter Acids Improves Cognitive Performance and Mood State in Healthy Older Adults with Subjective Cognitive Decline. *J Alzheimer's Dis*. 2020;76(1):387–98.
- Ge Z, Wang C, Zhang J, Li X, Hu J. Tempol protects against acetaminophen induced acute hepatotoxicity by inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Front Physiol*. 2019;10(MAY).
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415–45.
- Grodzicki W, Dziendzikowska K. The role of selected bioactive compounds in the prevention of alzheimer's disease. *Antioxidants*. 2020;9(3):1–18.
- Guariglia A, Monahan M, Pickering K, Roberts T. Financial health and obesity. *Soc Sci Med*. 2021 May 1;276.
- Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol*. 2020;94:651–715.
- Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Gary E, Brosseon F, Feinstein DL, et al. HHS Public Access Neuroinflammation in Alzheimer ' s Disease. *Lancet Neurol*. 2018;14(4):388–405.
- Hidalgo-Lanussa O, Baez-Jurado E, Echeverria V, Ashraf GM, Sahebkar A, Garcia-Segura LM, et al. Lipotoxicity, neuroinflammation, glial cells and oestrogenic compounds. *J Neuroendocrinol*. 2020;32(1):1–15.
- Hölter SM, Garrett L, Einicke J, Sperling B, Dirscherl P, Zimprich A, et al. Assessing Cognition in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2015;5(4):331–58.
- Hotamisligil GS, Davis RJ. Cell signaling and stress responses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(10):1–20.
- Hrnčič MK, Španinger E, Košir IJ, Knez Ž, Bren U. Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. *Nutrients*. 2019;11(2):1–37.
- Huang X, Wang J, Chen X, Liu P, Wang S, Song F, et al. The Prenylflavonoid xanthohumol reduces Alzheimer-Like changes and modulates multiple pathogenic molecular pathways in the Neuro2a/APPswe cell model of AD. *Front Pharmacol*. 2018;9(APR):1–13.
- Jiang H, Przybyszewski J, Mitra D, Becker C, Brehm-Stecher B, Tentinger A, et al. Soy Protein Diet, but Not *Lactobacillus rhamnosus* GG, Decreases Mucin-1, Trefoil Factor-3, and Tumor Necrosis Factor- α in Colon of Dextran Sodium Sulfate-Treated C57BL/6 Mice. *J Nutr*. 2011 Jul;141(7):1239–46.
- Khaw KY, Parat MO, Shaw PN, Falconer JR. Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Molecules*. 2017;22(7).
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–21.
- Kothari V, Luo Y, Tornabene T, O'Neill AM, Greene MW, Geetha T, et al. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim Biophys*

- Acta - Mol Basis Dis. 2017 Feb 1;1863(2):499–508.
- Kshirsagar V, Thingore C, Juvekar A. Insulin resistance: a connecting link between Alzheimer's disease and metabolic disorder. *Metab Brain Dis.* 2021;36(1):67–83.
- Lamas CA, Lenquiste SA, Baseggio AM, Cuquetto-Leite L, Kido LA, Aguiar AC, et al. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. *J Funct Foods.* 2018;47(May):434–46.
- Lenquiste SA, de Almeida Lamas C, da Silva Marineli R, Moraes ÉA, Borck PC, Camargo RL, et al. Jaboticaba peel powder and jaboticaba peel aqueous extract reduces obesity, insulin resistance and hepatic fat accumulation in rats. *Food Res Int [Internet].* 2019;120(November 2018):880–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.053>
- Li J, Li N, Li X, Chen G, Wang C, Lin B, et al. Characteristic α -Acid Derivatives from *Humulus lupulus* with Antineuroinflammatory Activities. *J Nat Prod.* 2017;80(12):3081–92.
- López-Taboada I, González-Pardo H, Conejo NM. Western Diet: Implications for Brain Function and Behavior. *Front Psychol.* 2020;11(November):1–11.
- Lv H, Liu Q, Wen Z, Feng H, Deng X, Ci X. Xanthohumol ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via induction of AMPK/GSK3 β -Nrf2 signal axis. *Redox Biol [Internet].* 2017;12(February):311–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.001>
- Mahli A, Koch A, Fresse K, Schiergens T, Thasler WE, Schönberger C, et al. Iso-alpha acids from hops (*Humulus lupulus*) inhibit hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis. *Lab Invest [Internet].* 2018;98(12):1614–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41374-018-0112-x>
- McMurray F, Patten DA, Harper ME. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity—Recent Findings and Empirical Approaches. *Obesity.* 2016;24(11):2301–10.
- Medina dos Santos N, Batista ÂG, Padilha Mendonça MC, Figueiredo Angolini CF, Grimaldi R, Pastore GM, et al. Açai pulp improves cognition and insulin sensitivity in obese mice. *Nutr Neurosci.* 2023;
- Mikyška A, Jurková M. Varietal specificity of polyphenols, free phenolics and antioxidant potential in hops. *Kvas Prum.* 2019;65(6):178–85.
- Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun [Internet].* 2014;42:10–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.04.001>.
- Miura Y, Hosono M, Oyamada C, Odai H, Oikawa S, Kondo K. Dietary isohumulones, the bitter components of beer, raise plasma HDL-cholesterol levels and reduce liver cholesterol and triacylglycerol contents similar to PPAR α activations in C57BL/6 mice. *Br J Nutr.* 2005;93(4):559–67.
- Muzykiewicz A, Nowak A, Zielonka-Brzezicka J, Florkowska K, Duchnik W, Klimowicz A. Comparison of antioxidant activity of extracts of hop leaves harvested in different years. *Herba Pol.* 2019;65(3):1–9.
- Nagy C, Einwallner E. Study of in vivo glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT). *J Vis Exp.* 2018 Jan 7;2018(131).
- Nair A, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7(2):27.
- Nascimento R de P do, Moya AMTM, Machado AP da F, Geraldi MV, Diez-Echave P, Vezza T, et al. Review on the potential application of non-phenolic compounds from native Latin American food byproducts in inflammatory bowel diseases. *Food Res Int.* 2021;139(July 2020).

- Ponticelli M, Russo D, Faraone I, Sinisgalli C, Labanca F, Lela L, et al. The promising ability of *Humulus lupulus* L. Iso- α -acids vs. diabetes, inflammation, and metabolic syndrome: A systematic review. *Molecules*. 2021;26(4).
- Praxis DP. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. 1993.
- Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci* [Internet]. 2016;148:183–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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.
- Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, Ortega ÁL, Pérez S, Sandhu MA. PGC-1 α , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020
- Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, et al. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and toll-like receptor activation. *Hepatology*. 2012;55(4):1103–11.
- Rothe J, Fischer R, Cotterchio C, Gastl M, Becker T. Analytical determination of antioxidant capacity of hop-derived compounds in beer using specific rapid assays (ORAC, FRAP) and ESR-spectroscopy. *Eur Food Res Technol* [Internet]. 2023;249(1):81–93. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04135-3>.
- Sánchez-Muniz FJ, Macho-González A, Garcimartin A, Santos-López JA, Benedi J, Bastida S, et al. The nutritional components of beer and its relationship with neurodegeneration and alzheimer's disease. *Nutrients*. 2019;11(7).
- Sureda A, Daglia M, Argüelles Castilla S, Sanadgol N, Fazel Nabavi S, Khan H, et al. Oral microbiota and Alzheimer's disease: Do all roads lead to Rome? *Pharmacol Res*. 2020;151(November).
- Stanley M, Macauley SL, Holtzman DM. Changes in insulin and insulin signaling in Alzheimer's disease: Cause or consequence? *J Exp Med*. 2016;213(8):1375–85.
- Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric*. 1959;10(1):63–8.
- Takahashi Y, Fukusato T. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(42):15539–48.
- Tripathi D, Kant S, Pandey S, Ehtesham NZ. Resistin in metabolism, inflammation, and disease. *FEBS J*. 2020;287(15):3141–9.
- Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier. *Front Neurosci*. 2018;12(December):1–19.
- Vazquez-Cervantes GI, Ortega DR, Ayala TB, de la Cruz VP, Esquivel DFG, Salazar A, et al. Redox and anti-inflammatory properties from hop components in beer-related to neuroprotection. *Nutrients*. 2021;13(6).
- West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1992;262(6 31-6).
- White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, Souza LA, Soares AF, Barbosa APO, et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(5):339–45.
- Whitney G, Harder DB. Genetics of bitter perception in mice. *Physiol Behav* [Internet]. 1994;56(6):1141–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031938494903581>
- Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., & Carrell, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*,

- 85(2), 337– 341.
- WHO. Obesity and overweight, (2021). Jun 9, 2021. Available from:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Yamaguchi N, Satoh-Yamaguchi K, Ono M. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine*. 2009;16(4):369–76.
- Zanoli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol*. 2008;116(3):383–96.
- Zevallos VF, Raker V, Tenzer S, Jimenez-Calvente C, Ashfaq-Khan M, Rüssel N, et al. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*. 2017 Apr;152(5):1100-1113.e12.
- Zhang G, Zhang N, Yang A, Huang J, Ren X, Xian M, et al. Hop bitter acids : resources , biosynthesis , and applications. 2021.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* [Internet]. 1999;64(4):555–9. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814698001022>