

Efeito do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (DC) em  
camundongos obesos com dieta hiperlipídica: avaliação  
comparativa das linhagens Swiss e C57BL/J6



GABRIELA BUENO

BOTUCATU – SP  
2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeito do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (DC) em  
camundongos obesos com dieta hiperlipídica: avaliação  
comparativa das linhagens *Swiss* e *C57BL/J6*

**GABRIELA BUENO**

**PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA**

**PROF. DRA. LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: estrutura e função.

*Prof. Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima*

**BOTUCATU – SP  
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bueno, Gabriela.

Efeito do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (DC) em camundongos obesos com dieta hiperlipídica : avaliação comparativa das linhagens *Swiss* e C57BL/J6 / Gabriela Bueno. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima  
Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha  
Capes: 21006008

1. *Baccharis trimera*. 2. Essências e óleos essenciais.  
3. Obesidade. 4. Inflamação. 5. Dieta hiperlipídica.  
6. Dislipidemias.

Palavras-chave: *Baccharis trimera*; Dislipidemia; Inflamação metabólica; Obesidade.

### **AUXÍLIO FINANCEIRO:**

O presente trabalho foi realizado com os apoios da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

À minha família, em especial ao meu pai José Joaquim, minha mãe de sangue Fátima e minha mãe do coração Lúcia por todo apoio nos momentos mais difíceis, vocês foram uma fortaleza e me deram forças pra continuar e acreditar sempre no meu sonho. Às minhas irmãs Daniela, Juliana e Mariana e a minha querida e única Anna Júlia que sempre me ajudaram muito e me deram todo apoio nesse momento tão importante da minha vida. Aos meus cunhados Walter, Reginaldo e minha cunhada Marjorie que junto com minhas irmãs proporcionaram toda essa ajuda. Todos vocês da minha família são minha inspiração diária. Muito obrigada de coração por toda força. Aos meus amigos que são também minha família: Bruna, Luiza, Inácio, Felipe, Tragédia e Japa, muito obrigada por todos os momentos incríveis e por todas as comemorações.

Gostaria de agradecer também ao meu grupo do laboratório, sem eles esse trabalho não seria possível. Vocês me ensinam a cada dia o verdadeiro significado do trabalho em grupo.

Ao Garboso, meu querido amigo e colega de trabalho, muito obrigada por todas as trocas, ensinamentos e por toda ajuda nesse processo.

A Doku, minha amiga, companheira que sempre me ajudou, me aconselhou e sempre esteve ao meu lado em todos os momentos desse período.

Ao meu amigo Maycon, que tantas vezes me ouviu chorar e sorrindo sempre me acalmou e me acolheu. Esteve comigo durante todo esse período sempre me ajudando muito em todo o processo sem medir esforços para isso.

E por fim, gostaria de fazer um agradecimento especial para duas pessoas incríveis que foram absolutamente essenciais para todo esse processo de aprendizado:

Professora Lúcia, muito obrigada por todos os ensinamentos, por todo amor e carinho. Sempre vou me lembrar de todos os conselhos e pode ter certeza que guardo todos eles comigo. A senhora me mostrou muitos caminhos e me ensina a cada dia como um verdadeiro professor deve ser. Tenho uma admiração enorme pela mulher e profissional que a senhora é, sou absurdamente grata e fico orgulhosa por ter recebido da senhora uma orientação tão plena.

Professora Clélia, gostaria que a senhora soubesse que sinto imenso orgulho por te ter como minha orientadora. Tudo o que sou hoje devo a você e isso tem um valor inestimável para mim. Obrigada por ser, além de uma profissional excelente, uma mãe que tantas vezes me acolheu e acreditou em mim. Minha admiração pela senhora é enorme e minha gratidão por ter cruzado teu caminho é maior ainda.

A CAPES e CNPq pelo financiamento desse projeto.

A todos que de alguma forma me apoiaram durante esse período meus sinceros agradecimentos.

“Posso, tudo posso, naquele que me fortalece.”

**Filip. 4:13**

## PRÓLOGO

A realização do presente projeto de mestrado possibilitou a elucidação da ação farmacológica do óleo essencial de uma planta popular em animais saudáveis e obesos. Adicionalmente a execução desse projeto, realizei atividades complementares de cunho científico e também de extensão Universitária e de popularização da ciência que enriqueceram minha formação científica e pessoal.

### Trabalho publicação em periódicos

#### 2021:

**Bueno, G.**, Chavez Rico, S.L., Périco, L.L., Ohara, R., Rodrigues, V.P., Emílio-Silva, M.T., Assunção, R., Machado da Rocha, L.R., Nunes, D.S., Besten, M.A., Heiden, G., Lima Camargo, A.C., Justulin, L.A., Hiruma-Lima, C.A., 2021. The essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC improves gastric ulcer healing in rats through modulation of VEGF and MMP-2 activity. *J. Ethnopharmacol.* 271, 113832. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113832>

#### 2020:

Emílio-Silva, M.T., Rodrigues, V.P., **Bueno, G.**, Ohara, R., Martins, M.G., Horta-Júnior, J.A.C., Branco, L.G.S., Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A., 2020. Hypothermic effect of acute citral treatment during lps-induced systemic inflammation in obese mice: reduction of serum TNF- $\alpha$  and leptin levels. *Biomolecules* 10, 1–18. <https://doi.org/10.3390/biom10101454>

Ohara, R., Périco, L.L., Rodrigues, V.P., **Bueno, G.**, Zanatta, A.C., Campaner dos Santos, L., Vilegas, W., Constatino, F.B., Justulin, L.A., Hiruma-Lima, C.A., 2020. *Terminalia catappa* L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Ethnopharmacol.* 256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112793>

Périco, L.L., Emílio-Silva, M.T., Ohara, R., Rodrigues, V.P., **Bueno, G.**, Barbosa-Filho, J.M., da Rocha, L.R.M., Batista, L.M., Hiruma-Lima, C.A., 2020. Systematic analysis of monoterpenes: Advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. *Biomolecules* 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom10020265>

### Trabalhos apresentados em forma de painel em eventos científicos

- **Bueno, G.** ; Perico L, L. ; Rodrigues, V. P. ; Ohara, R. ; Emílio-Silva, Maycon T; Rocha, L. R. M. ; Basten, M. A. ; Nunes, D. The role of essential oil *Baccharis trimera* in experimental



ulcer disease: characterization of anti-inflammatory and healing mechanisms of action. 7<sup>th</sup> Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

- Hiruma-Lima, C. A. ; Perico, L. L. ; Emílio-Silva, Maycon T. ; Ohara, R. ; **Bueno, G.** ; Rodrigues, V. P. ; Rocha, L. R. M. ; Barbosa Filho, J. M. ; Batista, L. M. . Monoterpenes: systemic review about the advances in the management of peptic ulcer and *Helicobacter pylori*. 7<sup>th</sup> Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.
- Emílio-Silva, Maycon T.; Rodrigues, V. P. ; **Bueno, G.** ; Ohara, R. ; Rocha, L. R. M. ; Branco, L. G. S. ; Hiruma-Lima, C. A. Citral reduced levels of plasmatic TNF-alpha in mice fed with standard diet (SD) and high-fat diet (HFD) following LPS-induced systemic inflammation. 7<sup>th</sup> Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.
- Ohara, R., Périco, L.L., Rodrigues, V.P., **Bueno, G.**, Zanatta, A.C., Campaner dos Santos, L., Vilegas, W., Constatino, F.B., Justulin, L.A., Hiruma-Lima, C.A., 2020. *Terminalia catappa* L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia-reperfusion injury in rats 7<sup>th</sup> Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.
- Emílio-Silva, Maycon T. ; Rodrigues, V. P. ; Ohara, R. ; **Bueno, G.** ; Branco, Luiz G. S. ; Rocha, L. R. M. ; Hiruma-Lima, C. A. The cryogenic role of citral in systemic inflammation induced by lipopolyssaccharide (LPS) in high fat-fed obese mice. Fifth International Symposium on Inflammatory Diseases 2019 - INFLAMMA V, Ribeirão Preto, SP, 2019.

### Participação em eventos científicos

- Simpósio Anual da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, SP, 2019.
- Workshop "Redação de Patentes, Além dos Guias + Oficinas Práticas". Botucatu, SP, 2019.
- Simpósio Anual da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, SP, 2020.
- 7<sup>th</sup> Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.
- VI Simpósio Obesity and Cormobidities Reserch Center, plataformas Zoom e YouTube, 2020.

### Cursos realizados

- Minicurso: “Modelagem Molecular Aplicada a Produtos Naturais” durante 7<sup>th</sup> Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019. Duração de 4 horas.

### **Extensão universitária**

- Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, Botucatu, SP, 2019. Duração de 48 horas.
- Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, Botucatu, SP, 2020. Duração de 48 horas.

### **Disciplinas cursadas**

- Bioestatística usando ambiente estatístico R. Conceito: A (4 créditos)
- O cientista e o professor universitário. Conceito: A (2 créditos)
- Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada. Conceito: A (2 créditos)
- Fisiopatologia da Obesidade e do Diabetes. Conceito: A (4 créditos)
- Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia. Conceito: A (6 créditos)

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                            |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Lista de abreviaturas</b>                                                                                                                                               | Pág. 10 |
| <b>Lista de figuras</b>                                                                                                                                                    | Pág. 12 |
| <b>Lista de tabelas</b>                                                                                                                                                    | Pág. 17 |
| <b>Resumo</b>                                                                                                                                                              | Pág. 18 |
| <b>Abstract</b>                                                                                                                                                            | Pág. 19 |
| <b>1- Introdução</b>                                                                                                                                                       | Pág. 20 |
| <b>2- Objetivo</b>                                                                                                                                                         | Pág. 26 |
| <b>3- Material e Métodos</b>                                                                                                                                               | Pág. 27 |
| 3.1. Animais                                                                                                                                                               | Pág. 27 |
| 3.2. Obtenção do óleo essencial e identificação dos constituintes majoritários                                                                                             | Pág. 27 |
| 3.3. Indução da obesidade por dieta hiperlipíca                                                                                                                            | Pág. 28 |
| 3.4. Tratamentos e coleta de material                                                                                                                                      | Pág. 29 |
| 3.5. Avaliação bioquímica das atividades de Catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e mieloperoxidase (MPO) e do nível de glutathione redutase (GSH) do tecido hepático | Pág. 30 |
| 3.6. Quantificação de citocinas (Multiplex)                                                                                                                                | Pág. 31 |
| 3.7. Testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI)                                                                                                               | Pág. 32 |
| 3.8. Análise estatística                                                                                                                                                   | Pág. 32 |
| <b>4- Resultados e Discussão</b>                                                                                                                                           | Pág. 33 |
| <b>5- Referências Bibliográficas</b>                                                                                                                                       | Pág. 59 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|               |                                                      |
|---------------|------------------------------------------------------|
| ALT           | Alanina amino-transferase                            |
| AST           | Aspartato amino-transferase                          |
| AUC           | <i>Area under curve</i> -área sob a curva            |
| CAT           | Catalase                                             |
| CETP          | Proteína de transferência de colesterol esterificado |
| DP            | Dieta padrão                                         |
| e.p.m.        | Erro padrão da média                                 |
| GSH           | Glutationa redutase                                  |
| HDL           | Lipoproteína de alta densidade                       |
| HFD           | <i>High fat diet</i> -dieta hiperlipídica            |
| IKK $\beta$   | Inibidora do NF- $\kappa$ B                          |
| IL-10         | Interleucina 10                                      |
| IL-13         | Interleucina 13                                      |
| IL-17         | Interleucina 17                                      |
| IL-1 $\beta$  | Interleucina 1 beta                                  |
| IL-2          | Interleucina 2                                       |
| IL-33         | Interleucina 33                                      |
| IL-4          | Interleucina 4                                       |
| IL-5          | Interleucina 5                                       |
| IL-6          | Interleucina 6                                       |
| ILC2s         | Células linfoides inatas do tipo 2                   |
| INF- $\gamma$ | Interferon-gama                                      |
| IRS-1         | Receptores de insulina 1                             |
| JNK           | Quinases c-Jun N-terminal                            |
| LDL           | Lipoproteína de baixa densidade                      |
| LPS           | Lipopolissacarídeo                                   |
| M1            | Macrófagos pró-inflamatórios                         |
| M2            | Macrófagos do tipo 2                                 |
| MCP           | Proteína quimioatraente de monócitos                 |

|               |                                            |
|---------------|--------------------------------------------|
| MPO           | Mieloperoxidase                            |
| NK            | <i>Natural Killer</i>                      |
| OEBT          | Óleo essencial da <i>Baccharis trimera</i> |
| SOD           | Superóxido dismutase                       |
| Th1           | T helper 1                                 |
| Th17          | Células T do tipo 17                       |
| Th2           | T helper 2                                 |
| TNF- $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa              |
| Treg          | T regulatórias                             |
| TTG           | Teste de tolerância à glicose              |
| TTI           | Teste de tolerância à insulina             |
| VLDL          | Lipoproteína de densidade muito baixa      |

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 1:** (A) e (B) Evolução da massa corporal dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 39 respectivamente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 2:** (A) e (B) Ingestão alimentar dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 35 respectivamente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pelo teste  $t$  de Student. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Fig. 3:** (A) e (B) Índice de adiposidade e (C) e (D) massa total dos tecidos adiposos dos camundongos Swiss e C57BL/J6 tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 4:** (A) e (B) Níveis séricos de ALT dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 40 respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP ou %  $p < 0,05$  e %%  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo OEBT 100.

**Fig. 5:** (A) e (B) Níveis séricos de AST dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 41 respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$

e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  e quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 6:** (A) e (B) Níveis séricos de Fosfatase Alcalina dos camundongos *Swiss* e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo DP. Pág. 42

**Fig. 7:** (A) e (B) Níveis séricos de HDL dos camundongos *Swiss* e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP. #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo HFD. Pág. 44

**Fig. 8:** (A) e (B) Níveis séricos de Triglicérides dos camundongos *Swiss* e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DP e \$  $p < 0,05$ ; \$\$\$  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo OEBT Pág. 44

**Fig. 9:** (A) e (B) Níveis séricos de VLDL dos camundongos *Swiss* e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \$\$\$  $p < 0,001$ ; \$  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OEBT 1. Pág. 45

**Fig. 10:** (A) e (B) Níveis séricos de Colesterol total dos camundongos *Swiss* e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  Pág. 45

e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 11:** (A) e (B) Níveis séricos de LDL dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 46 respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 12:** (A) e (B) Níveis séricos de Ureia dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 47 respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 13:** (A) e (B) Níveis séricos de Creatinina dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 47 respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre os grupos DP, HFD, OEBT 1. 10 e 100 nas duas linhagens Swiss e C57BL/J6.

**Fig. 14:** (A) e (B) Níveis séricos de Glicose dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 48 respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparado ao grupo DP, \$\$  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo OEBT 1 e # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo HFD.

**Fig. 15:** TTI Pré-tratamento - (A) e (B) Glicemia dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 50 respectivamente, no período de 120 minutos. (C) e (D) AUC dos camundongos Swiss e



C57BL/J6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey ou ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 16:** TTG Pré-tratamento - (A) e (B) Glicemia dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 52 respectivamente no período de 120 minutos. (C) e (D) AUC dos camundongos Swiss e C57BL/J6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey ou ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DP ou %  $p < 0,05$  quando comparados os grupos OEBT 1 e 100 em relação ao grupo DP.

**Fig. 17:** TTI Pós-tratamento - (A) e (B) Glicemia dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 53 respectivamente no período de 120 minutos. (C) e (D) AUC dos camundongos Swiss e C57BL/J6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via ou duas vias seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 18:** TTG Pós-tratamento - (A) e (B) Glicemia dos camundongos Swiss e C57BL/J6, Pág. 54 respectivamente no período de 120 minutos. (C) e (D) AUC dos camundongos Swiss e C57BL/J6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey ou ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo DP.

**Fig. 19:** (A) e (B) IL-4 e IL-10 do Tecido adiposo (TA) dos camundongos C57BL/J6, Pág. 57 respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$

e.p.m (n=5-7) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*p < 0,05 e \*\*p < 0,01, quando comparado ao grupo DP.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Composição das rações utilizadas na dieta padrão e hiperlipídica (HFD). Pág. 29

**Tabela 2** – Peso relativo e absoluto dos órgãos (fígado, baço, rins e coração) de camundongos *Swiss* e C57BL/J6 tratados por 28 dias com diferentes doses do óleo essencial de *B. trimera* (OEBT). Pág. 37

**Tabela 3** – Dosagem de parâmetros bioquímicos (SOD, CAT, MPO e GSH) do fígado de camundongos *Swiss* e C57BL/J6 tratados por 28 dias com as doses de 1, 10 ou 100 mg/kg do óleo essencial de *B. trimera* (OEBT). Pág. 39

## RESUMO

A obesidade é uma desordem metabólica caracterizada pelo acúmulo de gordura no corpo que representa um risco à saúde do indivíduo. Esse acúmulo leva ao desenvolvimento de um processo inflamatório crônico de baixo grau e tem sido associado a doenças como diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. No tecido adiposo, ocorrem mudanças no perfil das células imunes e na produção de adipocinas podendo comprometer a sensibilidade à insulina. Além desse processo inflamatório característico na obesidade, também ocorrem mudanças no perfil lipídico causada por uma dislipidemia instalada em animais obesos. A relação entre obesidade e doenças metabólicas torna as vias inflamatórias um interessante alvo terapêutico. Muitos produtos naturais são utilizados na medicina popular para perda de peso se tornando alvos terapêuticos interessantes. A *Baccharis trimera* Less (DC), conhecida como carqueja, é utilizada pela população para perda de peso e alguns estudos apontam para um possível efeito antiobesogênico. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de *Baccharis trimera* (OEBT) em camundongos obesos que consumiram dieta hiperlipídica nas linhagens *Swiss* e C57BL/J6. Camundongos machos *Swiss* e C57BL/J6 foram submetidos a indução de obesidade por meio da ingestão de uma dieta hiperlipídica no período de 12 semanas e foram tratados oralmente com OEBT nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg. Nesse estudo foram avaliadas a massa corporal, ingestão alimentar, índice de adiposidade, peso de órgãos (fígado, rins, baço e coração) e a massa dos três tecidos adiposos (epididimal, retroperitoneal e visceral). Foram analisados também os parâmetros relacionados à dislipidemia, tolerância à insulina e à glicose desses animais obesos tratados com OEBT bem como sua possível ação anti-inflamatória. Como resultado observou-se que após as 12 semanas com a dieta hiperlipídica os animais da linhagem *Swiss* apresentaram apenas alterações na massa corporal e no índice de adiposidade. Entretanto, os camundongos da linhagem C57BL/J6 apresentaram alterações na massa corporal, índice de adiposidade, dislipidemia, resistência à insulina e alterações nos mediadores anti-inflamatórios, quando comparado aos animais tratados com a dieta padrão. Neste trabalho, foi possível concluir que a linhagem *Swiss* não foi efetiva como modelo experimental para a instalação de uma inflamação metabólica causada pela ingestão de uma dieta hiperlipídica durante 12 semanas. Em contrapartida, os resultados indicam que a linhagem de camundongos C57BL/J6 foi capaz de desenvolver alterações morfológicas e induzir a dislipidemia e resistência à insulina com o uso da dieta. O tratamento dos animais C57BL/J6 com o OEBT resultou em diminuição dos níveis de ALT no fígado e em uma ação anti-inflamatória pelo aumento da IL-10 no tecido adiposo epididimal nos animais submetidos a dieta hiperlipídica.

**Palavras chave:** *Baccharis trimera* Less. DC; óleo essencial; obesidade; dieta hiperlipídica; dislipidemia; inflamação.

## ABSTRACT

Obesity is a metabolic disorder characterized by the accumulation of fat in the body that represents a risk to the health of the individual. This accumulation leads to the development of a low-grade chronic inflammatory process and has been associated with diseases such as type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases and neurodegenerative diseases. In adipose tissue, changes in the profile of immune cells and in the production of adipokines occur, which may compromise insulin sensitivity. In addition to this inflammatory process characteristic of obesity, there are also changes in the lipid profile caused by dyslipidemia installed in obese animals. The relationship between obesity and metabolic diseases makes inflammatory pathways an interesting therapeutic target. Many natural products are used in folk medicine for weight loss becoming interesting therapeutic targets. *Baccharis trimera*, known as gorse, is already used by the population for weight loss and some studies have pointed out its possible antiobesogenic effect. The objective of this work was to evaluate the effect of *Baccharis trimera* Less (DC) essential oil (EOBT) in obese mice with a high fat diet in the Swiss and C57BL / J6 strains. Male Swiss and C57BL / J6 mice were subjected to an obesity induction by eating a high-fat diet over a 12-week period and were treated with EOBT in three different doses. Body mass, food intake, adiposity index, organ weight (liver, kidneys, spleen and heart) and the mass of the three adipose tissues (epididymal, retroperitoneal and visceral) were evaluated. In this study, parameters related to dyslipidemia, insulin and glucose tolerance tests of these obese animals treated with EOBT were analyzed. As a result, it was observed that after 12 weeks with the high fat diet, the Swiss line animals showed only changes in body mass and in the adiposity index. However, C57BL / J6 mice showed changes in body mass, adiposity index, dyslipidemia, insulin resistance and changes in anti-inflammatory mediators, when compared to animals treated with the standard diet. In this work, it was possible to conclude that the Swiss strain was not effective in the proposed model for the installation of a metabolic inflammation caused by the ingestion of a high fat diet (during 12 weeks). However, our observations indicate that the C57BL / J6 mouse strain was able to develop morphological changes, dyslipidemia and insulin resistance. EOBT, at a dose of 1 mg / kg, had a beneficial effect on the liver by decreasing ALT levels and we also proved its anti-inflammatory action in the three doses tested due to the increase in IL-10 in the epididymal adipose tissue.

**Keywords:** *Baccharis trimera* Less. DC; essential oil; obesity; high fat diet; dyslipidemia; inflammation.

## 1- INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença que tem atingido proporções epidêmicas levando 2,8 milhões de pessoas a morte a cada ano em decorrência do excesso de peso<sup>1</sup>. A prevalência da obesidade triplicou entre os anos de 1975 e 2016 afetando pessoas de todas as faixas etárias. No ano de 2016, 1,9 bilhões de pessoas no mundo todo estavam com sobrepeso e 650 milhões de pessoas foram consideradas obesas e na atualidade a obesidade é considerada um problema de saúde pública mundial<sup>1</sup>. A taxa de obesidade no Brasil cresceu 60% em dez anos, passando de 11,8% para 18,9% no período de 2006 a 2016. A prevalência da obesidade duplica a partir dos 25 anos de idade e é maior entre os que tem menos escolaridade<sup>2</sup>.

A obesidade é definida como um excesso de gordura no corpo que representa um risco à saúde do indivíduo.<sup>1</sup> Um dos principais parâmetros para mensurar a taxa de obesidade é por meio do índice de massa corporal (IMC) que considera a massa corporal do indivíduo e a altura. Um indivíduo com um IMC superior ou igual a 30 é considerado obeso<sup>1</sup>. A obesidade é causada pelo aumento do consumo energético combinado com a diminuição no gasto energético que pode gerar um aumento progressivo do tecido adiposo podendo levar a um comprometimento da saúde do indivíduo<sup>3</sup>. Esse balanço energético positivo gera um estresse homeostático, particularmente nos adipócitos<sup>4</sup>.

A obesidade é uma desordem metabólica que está intimamente relacionada com uma inflamação crônica de baixo grau e tem sido associada a doenças como diabetes *mellitus* tipo 2, asma, câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas<sup>5,6</sup>. O tecido adiposo é o principal local de armazenamento de energia, responsável pela regulação metabólica e pelo balanço energético<sup>7</sup>. A sustentação do balanço energético positivo pode levar o indivíduo a um quadro de hipersecreção de leptina, insulina e catecolaminas. Em resposta ao excesso de nutrientes, os adipócitos aumentam em número (hiperplasia) e em volume (hipertrofia) para se adequarem às necessidades de armazenamento

lipídico. Esse aumento dos adipócitos, quando atinge seu limite de expansão, gera um estresse mecânico no tecido adiposo que tem como resposta o início de um processo inflamatório<sup>4</sup>.

O gatilho inicial que gera o quadro inflamatório na obesidade ainda é pouco compreendido. Existem algumas hipóteses que foram sugeridas pela literatura, tais como o desbalanço entre o consumo e gasto energético, aumento da permeabilidade intestinal ou ainda componentes da dieta<sup>4</sup>. Outra hipótese do gatilho inicial do quadro inflamatório da obesidade é a rápida expansão do tecido adiposo que pode fornecer um estresse mecânico no tecido, levando a hipóxia e a morte celular de adipócitos<sup>4</sup>.

Os primeiros indícios que apoiaram a ideia de que a obesidade tinha relação com a inflamação surgiram há aproximadamente 50 anos quando foi constatado o aumento nos níveis plasmáticos de fibrinogênio em pacientes obesos<sup>8</sup>. A partir dos anos 90, pesquisadores observaram o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) no tecido adiposo de roedores obesos e a melhoria da resistência à insulina após a neutralização de TNF- $\alpha$ . Posteriormente, surgiram vários estudos que relacionam inflamação e obesidade.<sup>8</sup> Atualmente sabe-se que além do TNF- $\alpha$ , outros mediadores inflamatórios como as interleucinas 6 e 1 beta (IL-6, IL-1 $\beta$ ) e a proteína quimioatraente de monócitos (MCP)-1 estão relacionados com essa resposta inflamatória<sup>9,10</sup>.

No tecido adiposo, estão presentes células imunes que são responsáveis pela manutenção da integridade e da sensibilidade do tecido. Essas células imunes podem sofrer mudanças durante o desenvolvimento da obesidade<sup>11</sup>. No indivíduo saudável, células imunes trabalham no seu estado do tipo 2 ou T helper 2 (Th2) e têm como principal regulador a interleucina 33 (IL-33), citocina constitutiva secretada por células epiteliais. A IL-33 é responsável pela indução de células linfoides

inatas do tipo 2 (ILC2s) a gerarem citocinas como interleucinas 5 e 13 (IL-5 e IL-13), que podem ativar eosinófilos<sup>4,12,13</sup>.

Eosinófilos são os principais secretores de interleucina 4 (IL-4) no tecido adiposo, que tem papel importante na polarização de macrófagos do tipo 2 (M2). Os macrófagos M2, no tecido adiposo saudável, são dominantes e responsáveis pela produção de marcadores anti-inflamatórios como a interleucina 10 (IL-10). Associada com a adiponectina (produzida por adipócitos), a IL-10 favorece um ambiente anti-inflamatório que promove a manutenção da sensibilidade à insulina no adipócito. Dessa forma, numa condição de equilíbrio energético, adipócitos e células imunes trabalham em coordenação no armazenamento e mobilização de energia em resposta a demanda energética do organismo<sup>4,11,14</sup>.

No indivíduo obeso, as células imunes assumem um estado do tipo 1, que têm como regulador principal o TNF- $\alpha$ , que é secretado pelos adipócitos ou pelas células imunes e está relacionado com a preservação da integridade do tecido em resposta ao excesso de oferta de nutrientes<sup>4,11</sup>. O aumento na massa do tecido adiposo leva a mudança no perfil da produção de adipocinas<sup>11</sup>. A disfunção homeostática causada pelo aumento progressivo do tecido adiposo leva também ao aumento da expressão de outros mediadores como IL1- $\beta$ , IL-6 e MCP-1. Esses mediadores inflamatórios têm várias atuações, por exemplo, o TNF- $\alpha$  e IL-6 podem induzir lipogênese hepática e aumentar a produção de triglicerídeos pelo fígado<sup>15,16</sup>. O mediador MCP-1 causa aumento da infiltração de macrófagos e auxilia no processo de resistência à insulina. Não somente o mediador inflamatório MCP-1, mas outros fatores podem estar envolvidos na infiltração de macrófagos no tecido adiposo<sup>17,18</sup>. Em tecidos adiposos de ratos obesos já foi observado um aumento da infiltração de macrófagos pró-inflamatórios (M1). Os macrófagos assumem esse perfil pró-inflamatório através de estímulos de mediadores como o interferon-gama (INF- $\gamma$ ) que é produzido por células *Natural Killer* (NK) e também por células T helper 1 (Th1) em resposta a um estresse metabólico<sup>19</sup>. As células Th1



além de produzirem INF- $\gamma$ , produzem altas quantidades interleucina 2 (IL-2) que estimula a proliferação de células T, incluindo as CD4+ numa resposta autócrina<sup>20</sup>. O envolvimento das células Th1 na obesidade é bem estabelecido, pois existem relatos que indivíduos obesos possuem alta quantidade dessas células no tecido adiposo visceral, quando comparados com indivíduos saudáveis<sup>19</sup>. As células T do tipo 17 (Th17) que também têm papel importante no desenvolvimento da obesidade<sup>21</sup>, são encontradas no tecido adiposo e são responsáveis por secretar interleucina 17 (IL-17)<sup>21</sup> cuja função é recrutar neutrófilos para o local da inflamação<sup>21</sup>. Outros tipos celulares como as células T do tipo 2 (Th2) são células imunes que secretam as citocinas IL-4, IL-5 e IL-6<sup>19</sup>. Poucos estudos têm detalhado o papel anti-inflamatório que essas células exercem no indivíduo obeso, porém estudos realizados por Winer e colaboradores (2009)<sup>22</sup> revelaram um número reduzido de células Th2 no tecido visceral de camundongos obesos. Outras células que residem no tecido adiposo são as células T regulatórias (Treg), que estão envolvidas na resposta inflamatória e em obesos as células Treg estão em números reduzidos o que proporciona um ambiente favorável para a ativação imune, que pode levar a um aumento de macrófagos M1 no tecido adiposo podendo afetar negativamente a sensibilidade à insulina<sup>6,11,19,23</sup>. Outras células do sistema imune, tais como mastócitos e células NK, também se encontram aumentadas no tecido adiposo de obeso<sup>3</sup>.

Xu, H. *et al.* (2003)<sup>24</sup> relataram, no tecido adiposo, aumento da expressão de genes relacionados a macrófagos na terceira semana de ingestão de dieta hiperlipídica (HFD) com aumento intenso na 16ª e 26ª semanas de tratamento<sup>24</sup>. Outro estudo mostrou elevação na infiltração de macrófagos com 8 semanas de dieta hiperlipídica, aumentando progressivamente até o final da indução com 16 e 20 semanas<sup>25</sup>. Xu (2003)<sup>24</sup> e Strissel (2007)<sup>25</sup> relacionaram o aumento da infiltração de macrófagos com a morte celular de adipócitos e indicaram a hipótese de que esses macrófagos podem ser responsáveis pela remoção e remodelação do tecido adiposo. Adipócitos mortos se acumulam no tecido adiposo formando estruturas chamadas *crown-like* que promove recrutamento de macrófagos pró-

inflamatórios, e esse processo contribui para o aumento da presença de macrófagos no tecido adiposo<sup>26</sup>. A inflamação encontrada em tecidos de roedores obesos também foi relatada em humanos, Hotamisligil *et al.*, (1995)<sup>27</sup> observaram aumento da produção de citocinas inflamatórias no tecido adiposo de humanos obesos, quando comparados aos indivíduos saudáveis.<sup>3</sup>

Essa inflamação sistêmica induzida pela obesidade se origina predominantemente no tecido adiposo e os mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo podem causar resistência à insulina<sup>3,11</sup>. Há tempos estuda-se a relação da resistência à insulina com inflamação e há 35 anos o primeiro mediador apontado como responsável pelo processo foi TNF- $\alpha$ , que poderia ter um papel importante nessa relação<sup>3</sup>. Estudos mostraram que adipócitos tratados com TNF- $\alpha$  apresentaram diminuição da sinalização da insulina e consequentemente diminuição da entrada de glicose nas células<sup>28</sup>. Várias vias metabólicas diferentes podem ser ativadas em resposta ao excesso de nutrientes e podem desencadear uma resposta inflamatória a esse estresse gerado no indivíduo obeso que poderá acarretar na resistência à insulina<sup>3</sup>.

A insulina e o glucagon são considerados os principais reguladores do suprimento da energia celular, equilíbrio de macronutrientes e da manutenção adequada das concentrações de glicose no sangue<sup>29</sup>. A insulina, produzida pelas células  $\beta$  no pâncreas, ativa processos anabólicos facilitando a difusão da glicose para os músculos e adipócitos, aumentando a ativação da glicólise e síntese de proteínas ou ácidos graxos, respectivamente<sup>29,30</sup>. Além disso, a insulina também suprime a produção hepática de glicose (gliconeogênese)<sup>29</sup>. Quando ocorre um comprometimento no reconhecimento da insulina pelas células, a glicose não é utilizada, acarretando no aumento da glicemia, isso provoca maior produção de insulina pelas células  $\beta$  caracterizando o nível inicial da resistência à insulina<sup>30</sup>. Se esse ambiente resistente à insulina se mantiver durante um longo período, pode ocorrer um desgaste das células  $\beta$ , que cada vez mais terão que produzir altas quantidades de insulina em decorrência da demanda, o que leva a permanência da glicemia em elevados níveis<sup>30</sup>.

Além do comprometimento da sensibilidade à insulina, a obesidade pode prejudicar órgãos como o fígado<sup>31</sup>. O fígado é responsável pelo metabolismo das lipoproteínas, participando da produção e/ou liberação de todas as classes de partículas de lipoproteínas, além disso, o fígado é também um importante centro de metabolismo do colesterol<sup>32,33,31</sup>. O acúmulo de lipídeos pode levar a um comprometimento na sinalização da insulina neste órgão podendo culminar num quadro de resistência à insulina<sup>34</sup>. A resistência à insulina desencadeia o aumento da atividade da lipase hormônio-sensível e lipólise no tecido adiposo resultando no aumento de ácidos graxos livres na circulação, o que provoca maior síntese de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) no fígado, e posterior quadro de hipertrigliceridemia<sup>34</sup>. A hipertrigliceridemia junto com o aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL) caracterizam a dislipidemia aterogênica<sup>31</sup>. A dislipidemia aterogênica está intimamente relacionada com doenças cardiovasculares e a obesidade é um importante fator de risco para essa doença<sup>35</sup>.

Atualmente são poucos os medicamentos aprovados para o tratamento de obesidade, além disso o uso de alguns desses medicamentos têm sido relacionados com efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, doenças cardiovasculares, entre outras<sup>36,37</sup>.

No Brasil em 2006 foi aprovada uma proposta de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC-SUS), tendo como objetivo central incentivar a pesquisa com fitoterápicos a partir de plantas medicinais com o intuito de resgatar e valorizar o uso de plantas medicinais e também validar cientificamente seu uso e produção<sup>38</sup>.

A relação entre obesidade, tecido adiposo e doenças metabólicas torna as vias inflamatórias um interessante alvo terapêutico para o tratamento da obesidade, porém os ensaios clínicos realizados até o momento foram insatisfatórios e exigem mais estudos<sup>4</sup>. Além disso, plantas medicinais que são

utilizadas popularmente para perda de peso tornam-se uma alternativa terapêutica interessante para a investigação de um possível medicamento antiobesogênico<sup>38</sup>.

*Baccharis trimera* Less (DC) é uma planta nativa do Brasil, amplamente encontrada em regiões tropicais e popularmente conhecida no Brasil como “Carqueja”<sup>39</sup>. Na medicina popular é utilizada na forma de chá para o alívio de sintomas de hipertensão, reumatismo, diabetes, entre outras<sup>40</sup>. Além dessas aplicações, seu chá também é usado para perda de peso e desordens hepáticas, sendo uma das plantas mais citadas popularmente<sup>41</sup>. Essa planta também possui diversas ações farmacológicas comprovadas, como por exemplo, ação antimicrobiana, antiulcerogênica, anti-inflamatória e analgésica<sup>40,41</sup>. Nascimento e colaboradores (2017)<sup>36</sup> realizaram um estudo em ratos diabéticos que indicou um efeito hipoglicêmico da fração aquosa da *B. trimera*. Além do mais, o extrato metanólico da *B. trimera* causou diminuição da massa corporal e dos níveis de colesterol em ratos obesos tratados por 35 dias e também a inibição *in vitro* de lipase pancreática<sup>38</sup>. Além disso, estudos realizados em nosso laboratório comprovaram que o óleo essencial da *B. trimera* possui efeito gastroprotetor, cicatrizante e anti-inflamatório<sup>42</sup>. Esses estudos fornecem importantes indicativos da ação antiobesogênica da *B. trimera* e que pretendemos investigar nesse projeto<sup>41</sup>.

## 2-OBJETIVO

Avaliar o efeito da ingestão de dieta hiperlipídica em camundongos das linhagens Swiss e C57BL/J6 e o efeito do óleo essencial de *Baccharis trimera* Less (DC) nas alterações provocadas por essa dieta.

### 3-MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss e C57BL/J6 machos, livre de patógenos (com idade de cinco a seis semana), adquiridos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA), UNESP-Botucatu e do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB, respectivamente. Os animais foram mantidos em caixas de fundo sólido forradas com maravalha no biotério de camundongos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Setor Fisiologia) do Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, sob temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água. O ambiente foi enriquecido com iglus para elevar a condição de bem-estar dos camundongos e minimizar o estresse durante o longo período de manutenção dos animais com dieta e sob tratamento. O protocolo experimental desse projeto foi submetido e aprovado após análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, UNESP – Campus de Botucatu (protocolo nº1156) estando de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009) (Anexo-1).

#### 3.2.Obtenção do óleo essencial e identificação dos constituintes majoritários

A extração do óleo essencial da *Baccharis trimera* (OEBT) foi realizada a partir das folhas da planta que foram submetidas a um arraste de vapor d'água com a utilização de um aparelho do tipo Clevenger (Marconi S.A. Piracicaba, SP, Brasil). O material vegetal (folhas) foi submetido a secagem em estufa na temperatura ambiente por 48 horas e após isso as folhas foram moídas e adicionadas a um balão de 2 litros contendo 1,0 L de água destilada e submetidas à hidrodestilação por 2 horas e 30 minutos utilizando uma manta aquecedora até a ebulição do hidrodestilado. O óleo essencial obtido foi armazenado em frasco âmbar a 5 °C para evitar alterações. A coleta da planta, a extração do óleo

essencial e o processamento para a identificação dos constituintes majoritários foi realizado pelo Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) que realizou os estudos químicos baseados em espectrometria de massas, UV-VIS, FT-IR, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, CLAE e CG/EM/DIC. Foi utilizado uma coluna capilar apolar e os bancos de espectros de massas NIST107, NIST21 e WILEY8 para identificação dos componentes que foram confirmados utilizando-se dos índices de retenção relativos comparados de acordo com a literatura<sup>43</sup>.

### **3.3.Indução da obesidade por dieta hiperlipídica**

Após a chegada dos animais do biotério CPPA e CEMIB para o biotério setorial de nossa unidade, dividimos esses animais foram divididos em dois grupos: dieta padrão (DP) e dieta *High-Fat Diet* (HFD). Para o grupo controle foi ofertado ração com dieta padrão (controle, 15% de calorias provenientes de lipídeos) e para o segundo grupo, denominado obeso, foi ofertado uma dieta denominada AIN 93 com alto teor de lipídeos HFD (60% de calorias provenientes de lipídeos) no período de 12 semanas no intuito de obter animais que mimetizem a instalação da obesidade. A composição da dieta utilizada está representada na Tabela 1 e a mesma foi adquirida na empresa de fornecimento de insumos PragSoluções Biociências Ltda. (Jaú, SP, Brasil). Durante o período de indução da obesidade e tratamento a massa corporal e a ingesta alimentar foram mensuradas duas vezes na semana e a partir da média semanal de cada grupo obtivemos a evolução da massa corporal e a ingestão alimentar.

**Tabela 1 – Composição das rações utilizadas na dieta padrão e hiperlipídica (HFD)**

| <b>Componente</b>              | <b>Dieta Padrão</b> |                | <b>Dieta Hiperlipídica (HFD)</b> |                |
|--------------------------------|---------------------|----------------|----------------------------------|----------------|
|                                | <b>g/kg</b>         | <b>kcal/kg</b> | <b>g/kg</b>                      | <b>kcal/kg</b> |
| <b>Amido de milho (q.s.p.)</b> | <b>397,5</b>        | <b>1590</b>    | <b>115,5</b>                     | <b>462</b>     |
| <b>Caseína</b>                 | <b>200</b>          | <b>800</b>     | <b>200</b>                       | <b>800</b>     |
| <b>Sacarose</b>                | <b>100</b>          | <b>400</b>     | <b>100</b>                       | <b>400</b>     |
| <b>Maltodextrina</b>           | <b>132</b>          | <b>528</b>     | <b>132</b>                       | <b>528</b>     |
| <b>Banha de porco</b>          | <b>-</b>            | <b>-</b>       | <b>321</b>                       | <b>528</b>     |
| <b>Óleo de soja</b>            | <b>70</b>           | <b>630</b>     | <b>40</b>                        | <b>360</b>     |
| <b>Celulose</b>                | <b>50</b>           | <b>-</b>       | <b>50</b>                        | <b>-</b>       |
| <b>Mix de minerais</b>         | <b>35</b>           | <b>-</b>       | <b>35</b>                        | <b>-</b>       |
| <b>Mix de vitaminas</b>        | <b>10</b>           | <b>-</b>       | <b>10</b>                        | <b>-</b>       |
| <b>L-Cistina</b>               | <b>3</b>            | <b>-</b>       | <b>3</b>                         | <b>-</b>       |
| <b>Colina</b>                  | <b>2,5</b>          | <b>-</b>       | <b>2,5</b>                       | <b>-</b>       |
| <b>Total</b>                   | <b>1000</b>         | <b>3948</b>    | <b>1000</b>                      | <b>5358</b>    |

### **3.4.Tratamentos e Coleta de Material**

Inicialmente tínhamos dois grandes grupos de camundongos das linhagens *Swiss* e *C57BL/J6*, que foram denominados de saudáveis (DP) e obesos (HFD). O grupo obeso foi dividido em quatro subgrupos com os seguintes tratamentos que foram administrados via oral (gavagem): OEBT nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg (solubilizado com Tween 80 a 1%) e animais tratados somente com o

veículo (Tween 80 a 1%) em volume equivalente a 10 mL/kg. As três doses do OEBT foram selecionadas a partir do estudo prévio, realizado em nosso laboratório, no qual o óleo demonstrou sua ação gastroprotetora, cicatrizante e anti-inflamatória na dose de 100 mg/Kg e também a ausência de toxicidade pelo tratamento durante 14 dias <sup>42</sup>. Optamos pela seleção adicional das doses de 1 e 10 mg/Kg levando em consideração os resultados de toxicidade e o longo período de tratamento. No grupo dos animais DP foi administrado o veículo (Tween 80 a 1%) a 10 mL/kg pelo período equivalente ao tratamento com o OEBT. O tratamento dos animais (uma vez ao dia) se iniciou na 9ª semana de indução de obesidade e perdurou por 28 dias consecutivos. Ao final do período de tratamento, os animais foram eutanasiados e foram coletados e pesados o tecido adiposo (abdominal, retroperitoneal e epididimal), fígado, coração, rim e baço. O soro foi coletado e armazenado a -80 °C até a utilização e a avaliação bioquímica dos parâmetros: colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos, uréia, creatinina, aspartato amino-transferase (AST), alanina amino-transferase (ALT), fosfatase alcalina e glicose. A determinação bioquímica foi realizada por química seca, através dos kits colorimétricos da BioClin (Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções de uso do fabricante.

### **3.5. Avaliação bioquímica das atividades de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e mieloperoxidase (MPO) e do nível de glutathione redutase (GSH) do tecido hepático**

MPO: foi utilizado o método de Krawisz *et al.* (1984)<sup>44</sup>. Amostras de tecido do fígado dos diferentes grupos, mantidas a -80°C, foram solubilizadas com brometo hexadeciltrimetilamônio e a atividade da MPO foi medida por meio de um ensaio com O-dianisidina, substrato da peroxidase. O tampão HTAB atua como detergente lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a enzima, que então é liberada. A atividade enzimática se determina seguindo a cinética da reação da enzima com



água oxigenada do tampão de reação, sendo que 1 Unidade de mieloperoxidase determinada é capaz de degradar 1 mmol/minuto de água oxigenada a 25°C. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/g de tecido.

SOD: foi realizado o método de Winterbourn *et al.* (1975)<sup>45</sup>. As amostras de tecido hepático foram diluídas em tampão fosfato, na proporção 1:20. Em 100 µl do homogenato foram adicionados 150 µl da solução de hipoxantina (0,1mM), xantina oxidase (0,07uLa ) e nitrobluetetrazolium (NBT – 0,6mM). A determinação da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos como unidade de SOD/g de tecido.

CAT: foi utilizado o método de Aebi, (1984)<sup>46</sup>. Sobre a amostra do tecido hepático foi adicionada uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,01 mol em tampão fosfato salino, PBS, 0,05 mol a pH 7). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidade de catalase/minuto x g tecido.

GSH: Foi realizada o método Faure (1995)<sup>47</sup>. O conteúdo de GSH foi determinado utilizando-se 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). A reação enzimática é constituída de 20 µl da amostra, 140 µl de NADPH, 5 µl de PBS e 20 µl DTNB. A absorbância foi determinada em 412 nm utilizando-se um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol/g de tecido.

### **3.6.Quantificação de citocinas (Multiplex)**

As amostras do tecido adiposo epididimal, após a extração, foram utilizadas na quantificação de citocinas IL-4 e IL-10 com o kit Luminex Mouse Magnetic Assay, R&D Systems por ensaio multiplex. O kit foi utilizado de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média com significância mínima de  $p < 0,05$ .

### **3.7. Testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI)**

Os testes foram realizados antes e após o início do tratamento com os animais em jejum de seis horas e sem a administração de anestesia. No TTI, após a determinação da glicemia basal, os animais receberam injeção intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg) e em seguida foram repetidas as leituras de glicemia 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de insulina.<sup>48</sup> Para o TTG foi coletada a partir da cauda do animal uma amostra de sangue e a glicemia basal foi determinada com um monitor de glicemia (Accu-chek Active Roche, Mannheim, Alemanha). Após a determinação da glicemia basal os camundongos receberam uma solução de glicose (2 g/kg) via oral, em seguida as medidas de glicemia foram repetidas 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração. Ao final foram realizados cálculos da Área sob a curva (AUC) da resposta glicêmica.<sup>29</sup>

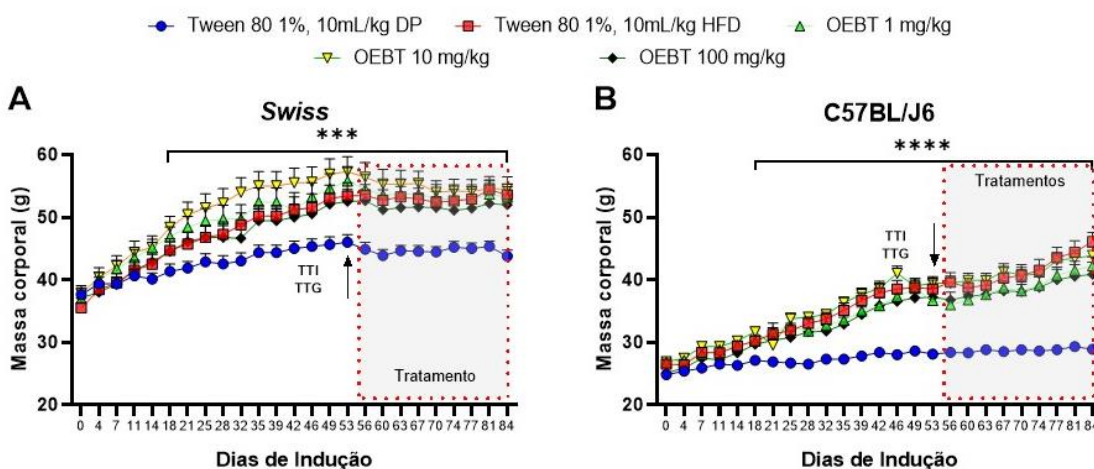
### **3.8. Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos ao teste de D'agostino-Pearson para determinação de normalidade. Dados paramétricos foram submetidos ao teste *t* de Student não-pareado para comparação entre dois grupos e ANOVA de uma via para comparação entre três grupos ou mais, seguido do teste de Tukey. Para análise de resultados com mais de uma variável foi utilizado ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni ou Tukey. O valor mínimo de significância estatística considerado foi de  $p < 0,05$ .

#### 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obesidade é uma desordem metabólica que tem atingido proporções mundiais<sup>1</sup>. Ela é causada por um desbalanço energético e pode resultar no aumento progressivo do tecido adiposo que consequentemente pode levar a um comprometimento da saúde do indivíduo<sup>3,49</sup>. O alto consumo de dietas ricas em gorduras aumenta o risco do comprometimento de órgãos, tanto em humanos, como em outros animais<sup>50</sup>.

Os modelos de indução de obesidade em animais experimentais através da oferta de dietas hipercalóricas se assemelham à realidade humana e são muito utilizados para os estudos voltados a alterações metabólicas ligadas a obesidade<sup>51-53</sup> e podem ser uma opção relevante nos estudos de avaliação de opções terapêuticos para o tratamento da doença<sup>54,55</sup>. Sharma, *et al.* (2017) comprovaram que a oferta da dieta AIN-93, a mesma utilizada nesse projeto, a oferta dessa dieta foi capaz de aumentar significativamente a massa corporal de camundongos C57BL/J6, isso comprova a eficácia do uso dessa ração para modelos de indução de obesidade<sup>56</sup>. Essa alteração na massa corporal também ocorreu em um estudo realizado em camundongos C57BL/J6 que receberam dieta hiperlipídica por 12 semanas<sup>57</sup>. Levando em consideração esses achados na literatura, selecionamos em nosso estudo o período de 12 semanas de oferta de dieta hiperlipídica com 60% de calorias provenientes de lipídeos para induzir obesidade nas duas linhagens mais utilizadas na literatura. Os animais que receberam HFD apresentaram um aumento significativo da massa corporal, quando comparados ao grupo que recebeu DP na terceira semana de indução de obesidade com a dieta hiperlipídica. A partir da terceira semana essa diferença da massa corporal se manteve, inclusive após o período de tratamento com o OEBT (Fig. 1).

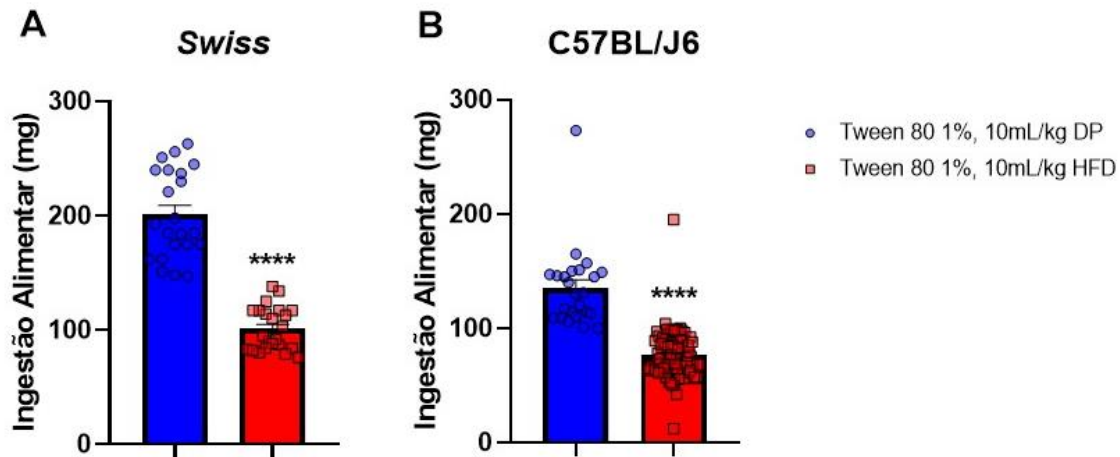


**Fig. 1:** (A) e (B) Evolução da massa corporal dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n=9-11$ ) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. \*\*\* $p<0,001$  e \*\*\*\* $p<0,0001$  quando comparado ao grupo DP.

A ingestão alimentar em gramas dos grupos que receberam HFD foi menor do que os grupos que receberam a DP nas duas linhagens Swiss e C57BL/J6 (Fig. 2). Os animais da linhagem Swiss que receberam HFD consumiram uma massa de dieta 49,9% menor quando comparado ao grupo DP. A linhagem C57BL/J6 apresentou consumo 43,2% menos da massa da dieta em relação ao seu grupo DP. Apesar dos animais que se alimentaram com DP terem apresentado maior consumo em gramas quando comparados ao grupo que recebeu HFD, o grupo HFD apresentou maior eficiência energética, pois apesar de terem consumido menor quantidade de dieta aumentaram significativamente a massa corporal e o tecido adiposo em relação ao grupo DP.

Segundo Prior *et al* (2008)<sup>58</sup> e Townsend *et al* (2008)<sup>59</sup> o aumento do consumo energético não é obrigatoriamente um fator para o aumento da adiposidade, da massa corporal e do tecido adiposo. Esse aumento pode ter relação com as alterações nas modulações hipotalâmicas da sinalização de leptina devido a ocorrência de uma hiperleptinemia. Também pode ocorrer em obesos a redução da

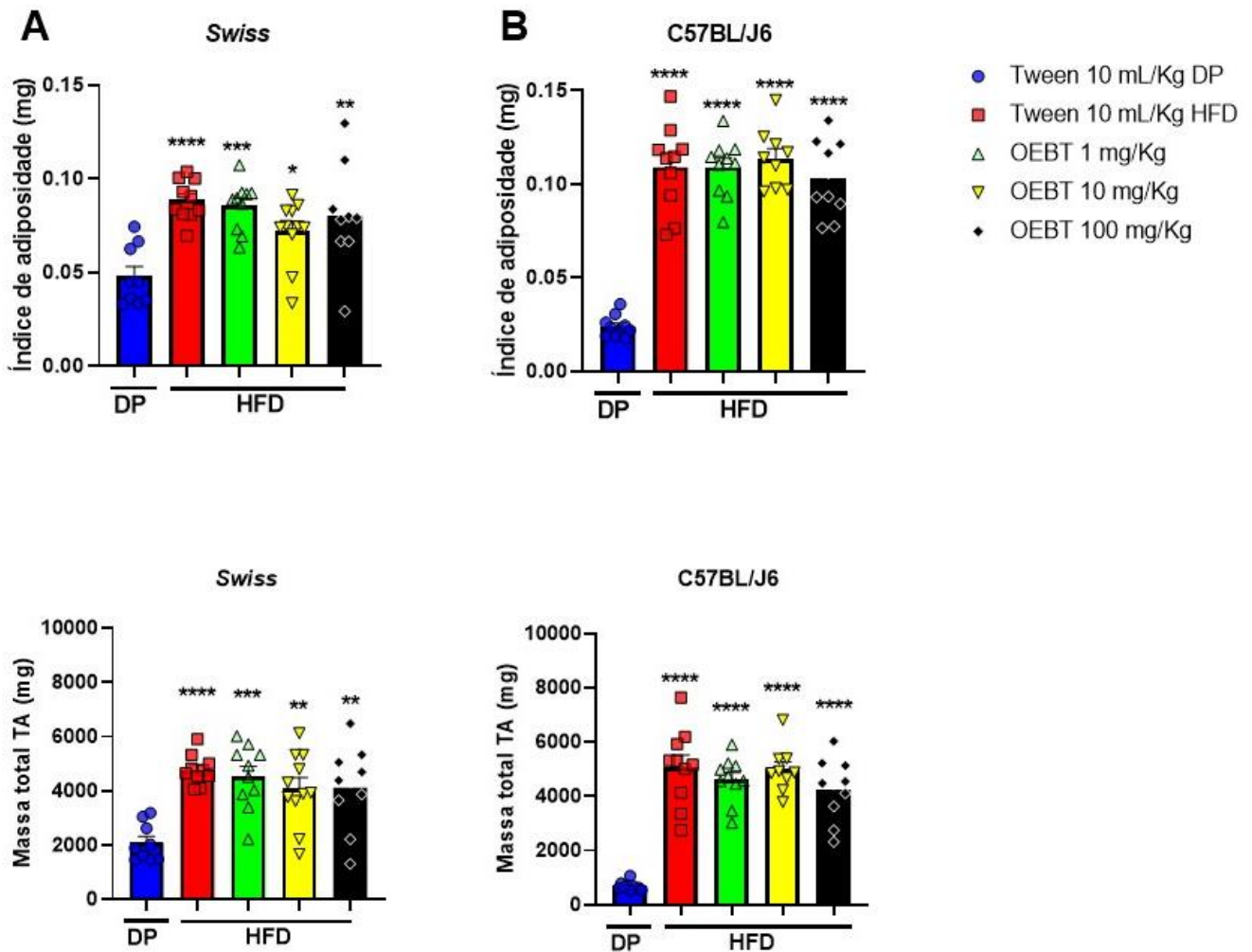
capacidade oxidativa mitocondrial que favorece o acúmulo de gordura<sup>60,61</sup>. Levando em consideração a massa corporal (Fig 1) e o índice de adiposidade das duas linhagens estudadas (Fig. 3), nossos resultados indicam que está ocorrendo um maior aproveitamento energético nos animais que receberam HFD em relação ao grupo que consumiu a DP.



**Fig. 2:** (A) e (B) Ingestão alimentar dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pelo teste t de Student. \*\*\*\*p<0,0001.

O tecido adiposo desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da inflamação relacionada à obesidade<sup>62</sup>. Estudos já apontaram um aumento significativo da massa do tecido adiposo em camundongos que receberam HFD pelo período de 12 semanas<sup>63</sup>. Nesse estudo, calculamos o índice de adiposidade que leva em consideração a massa total dos tecidos adiposos em relação a massa corporal do animal. Podemos observar um aumento significativo da massa total dos tecidos adiposos e índice de adiposidade do grupo que recebeu HFD, em comparação ao grupo que recebeu DP em ambas linhagens (Fig. 3), corroborando com resultados encontrados na literatura<sup>63</sup>. Apesar de observarmos esse aumento significativo, tanto no peso total dos tecidos adiposos, quanto no índice de adiposidade dos animais do grupo HFD em relação ao grupo DP, os grupos de animais

que receberam o tratamento com o OEBT (nas três diferentes doses) não apresentaram reduções significativas no peso total dos tecidos adiposos e no índice de adiposidade em relação ao grupo HFD após o período de tratamento.



**Fig. 3:** (A) e (B) Índice de adiposidade e (C) e (D) massa total dos tecidos adiposos dos camundongos Swiss e C57BL/J6 tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. e \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP.

Para a análise do peso do fígado, baço, rins e coração, foram levados em consideração o peso absoluto e peso relativo dos órgãos. Em alguns órgãos se observou que o peso relativo dos animais

que receberam HFD foi menor que nos animais que receberam DP. Apesar da diminuição do peso relativo, a progressão do peso dos órgãos não segue a mesma velocidade que a progressão do peso corporal do animal. Portanto, considerando-se o peso absoluto, não houve alteração no peso dos órgãos causada pela ingestão de HFD em relação ao grupo que recebeu a DP (Tabela 2). Nos animais Swiss, o tratamento com o OEBT (nas doses de 1 e 100 mg/Kg) promoveu aumento significativo no peso do fígado em relação aos animais tratados com DP (Tabela 2). Nos animais C57BL/J6 o tratamento com o OEBT (1 mg/Kg) promoveu aumento do peso do baço e dos rins quando comparado aos animais tratados com DP ou HFD (Tabela 2). Portanto, novos parâmetros relacionados com esse órgãos devem ser investigados a seguir para avaliar se as alterações são em decorrência ou não do tratamento OEBT.

**Tabela 2** - Peso relativo e absoluto do fígado, baço, rins e coração de camundongos Swiss e C57BL/J6 tratados por 28 dias com diferentes doses do óleo essencial de *B. trimera* (OEBT).

| Tratamento |           | Fígado         |                  | Baço          |                | Rim            |                  | Coração        |                 |
|------------|-----------|----------------|------------------|---------------|----------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|
|            |           | Relativo (%)   | Absoluto (mg)    | Relativo (%)  | Absoluto (mg)  | Relativo (%)   | Absoluto (mg)    | Relativo (%)   | Absoluto (mg)   |
| Swiss      | DP        | 4,94± 0,16     | 2162,00±79,01    | 0,32± 0,02    | 128,80± 8,07   | 0,67± 0,02     | 295,90±12,57     | 0,56± 0,03     | 246,60± 15,10   |
|            | HFD       | 5,36± 0,407    | 2740,00±228,00   | 0,25± 0,01*   | 136,90± 7,33   | 0,63± 0,04     | 335,00±12,71     | 0,46± 0,01*    | 250,00± 12,0800 |
|            | OEB T 1   | 5,06± 0,60     | 2954,00±230,00*  | 0,27± 0,01    | 148,10± 8,38   | 0,60± 0,03     | 318,80±15,56     | 0,44± 0,02**   | 232,20± 7,91    |
|            | OEB T 10  | 5,17± 0,29     | 2701,00±113,20   | 0,28± 0,01    | 152,60± 8,89   | 0,66± 0,05     | 350,80±21,41     | 0,47± 0,02*    | 252,70± 12,01   |
|            | OEB T 100 | 0,6,47± 0,63   | 3154,00±227,30** | 0,26± 0,01    | 132,90± 8,74   | 0,62± 0,06     | 318,40±22,80     | 0,49± 0,03     | 255,20± 13,13   |
| C57BL/J6   | DP        | 4,94± 0,11     | 1431,00±58,31    | 0,27± 0,01    | 81,71±2,79     | 0,65± 0,01     | 185,20±4,93      | 0,55± 0,03     | 154,10± 8,05    |
|            | HFD       | 3,49± 0,17**** | 1613,00±112,60   | 0,20± 0,01*** | 86,45±4,17     | 0,40± 0,01**** | 180,60±3,77      | 0,34± 0,02**** | 155,90± 4,91    |
|            | OEB T 1   | 3,96± 0,22**#  | 1690,00±144,50   | 0,25± 0,00#   | 103,40±4,81**# | 0,55± 0,03###  | 224,30±10,20***# | 0,36± 0,01**** | 152,80± 7,39    |
|            | OEB T 10  | 3,27± 0,17**** | 1449,00±111,80   | 0,22± 0,01*   | 93,13±4,10     | 0,45± 0,03**** | 203,00±9,66      | 0,36± 0,02**** | 159,80± 8,42    |
|            | OEB T 100 | 3,74± 0,15**** | 1522,00±85,06    | 0,21± 0,01**  | 85,81±1,88     | 0,47± 0,03***  | 185,50±5,88\$\$  | 0,35± 0,02**** | 142,50± 6,80    |

Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001, quando comparado ao grupo DP; #p < 0,05 e ### p < 0,001 quando comparado ao grupo HFD e \$ p < 0,05, \$\$p < 0,01 quando comparado ao grupo OEBT1.

O fígado tem papel fundamental no processo de desenvolvimento da inflamação na obesidade<sup>64-66</sup>. Heijden, *et al.* (2015)<sup>63</sup> mostraram que a exposição a HFD nos períodos de 24, 40 e 52 semanas aumentaram o peso absoluto do fígado de camundongos C57BL/J6. Em nossos resultados podemos observar (Tabela 2) que apesar de observarmos aumento significativo da massa absoluta nos grupos OEBT 1 e 100 na linhagem Swiss, não houve alteração do grupo HFD em relação ao grupo DP. Na linhagem C57BL/J6 não observamos diferença estatística na massa absoluta do fígado nos grupos avaliados (Tabela 2). Essa ausência de alterações morfológicas no fígado pode ter ocorrido devido a uma resposta tardia que o fígado tem em relação ao tecido adiposo diante da ingestão de HFD<sup>63</sup>. Um estudo comparativo entre os períodos de 24 e 40 semanas de indução de obesidade mostrou que o fígado, apesar de ter um papel fundamental no processo inflamatório proveniente da obesidade, possui resposta mais tardia ao estresse causado pelo desbalanço energético, apresentando alterações com 40 semanas de indução da obesidade, enquanto o tecido adiposo apresentou alterações com 24 semanas.<sup>63</sup> Apesar da ausência de alterações de peso, observamos alterações morfológicas como a coloração amarelada nos fígados de animais que receberam dieta com alto teor de lipídios. Em nossos resultados observamos que somente os animais Swiss tratamento com o OEBT (nas doses de 1 e 100 mg/Kg) apresentam aumento significativo no peso do fígado em relação aos animais tratados com DP. Portanto, a partir dessas observações demos prosseguimento na avaliação bioquímica de enzimas que estão relacionadas com o estresse oxidativo como a CAT, SOD e GSH<sup>67</sup>. E também avaliamos a mieloperoxidase (MPO) que está relacionada com a instalação de um processo inflamatório local pela ocorrência de um infiltrado neutrofílico no tecido<sup>67</sup>.

Na tabela 3 é possível observar que não houve nenhuma alteração desses parâmetros no fígado dos camundongos das duas linhagens estudadas indicando provavelmente que o estresse oxidativo decorrente da obesidade no fígado se dá em uma etapa mais tardia. Também avaliamos parâmetros



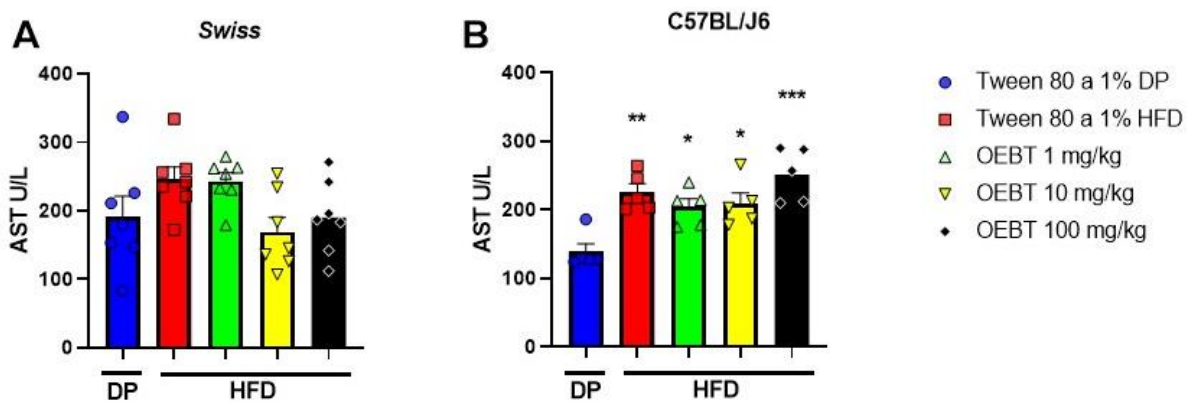
bioquímicos que estão relacionados com a função hepática, como ALT, AST e fosfatase alcalina<sup>68</sup>. A ALT e AST são enzimas presentes no fígado e seu aumento é indicativo de lesão hepática<sup>69</sup>. Estes são marcadores normalmente encontrados em obesos que aumentam progressivamente com o aumento do índice de massa corporal. Apesar da linhagem Swiss apresentar alterações morfológicas no fígado e aumento de peso nos animais tratados com OEBT, essas alterações macroscópicas não chegaram a promover alterações bioquímicas relevantes nesses dois parâmetros. Em contrapartida, na linhagem C57BL/J6 é possível observar que os níveis séricos de AST se apresentaram significativamente aumentados nos grupos dos animais que receberam a HFD por 12 semanas em relação ao grupo DP (Fig. 4), corroborando com dados da literatura que apontam o aumento significativo de AST em camundongos C57BL/J6 obesos<sup>70</sup>. O tratamento com o OEBT não promoveu alterações nos níveis séricos de AST em relação ao grupo DP ou HFD tratado com veículo.

**Tabela 3** – Dosagem de parâmetros bioquímicos (SOD, CAT, MPO e GSH) do fígado de camundongos Swiss e C57BL/J6 tratados por 28 dias com as doses de 1, 10 ou 100 mg/kg do óleo essencial de *B. trimera* (OEBT).

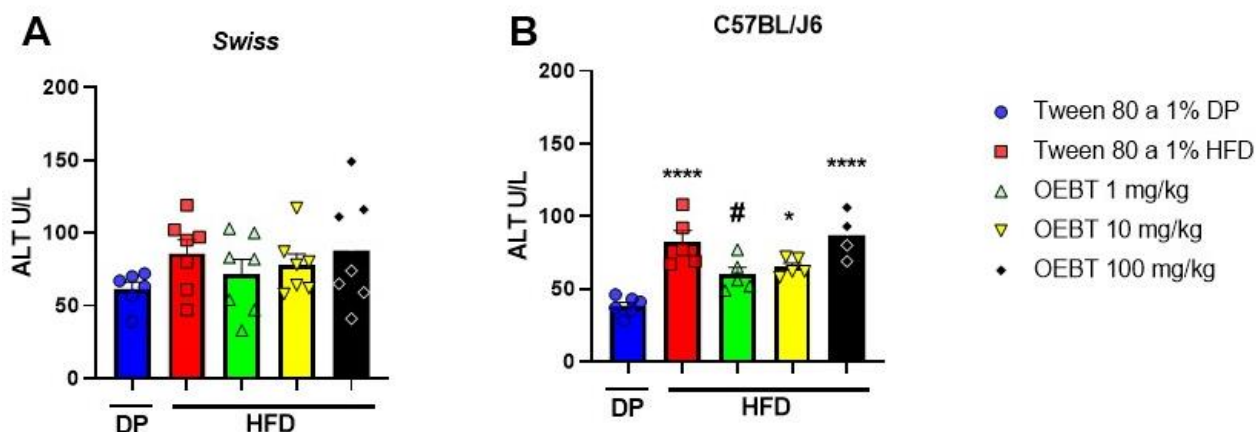
| Tratamento |          | SOD                | CAT            | MPO                | GSH              |
|------------|----------|--------------------|----------------|--------------------|------------------|
|            |          | U/g de tecido      | U/g de tecido  | U/g de tecido      | nmol/g de tecido |
| Swiss      | DP       | 0,06 ± 0,00        | 98026 ± 39887  | 1422 ± 134,1       | 116,7 ± 7,83     |
|            | HFD      | 0,09 ± 0,02        | 79602 ± 15025  | 1168 ± 120,9       | 101,4 ± 10,41    |
|            | OEBT 1   | 0,06 ± 0,01        | 124822 ± 23845 | 1699 ± 186,4       | 103,2 ± 5,39     |
|            | OEBT 10  | 0,08 ± 0,03        | 78085 ± 13952  | 1216 ± 95,15       | 128,0 ± 18,26    |
|            | OEBT 100 | 0,06 ± 0,01        | 106981 ± 16692 | 1581 ± 102,5       | 108,5 ± 14,49    |
| C57BL/J6   | DP       | 23051,00 ± 1745,00 | 217,30 ± 6,50  | 10796 ± 1627       | 105,9 ± 3,947    |
|            | HFD      | 28197,00 ± 1367,00 | 253,70 ± 10,12 | 11022,00 ± 1735,00 | 95,33 ± 6,71     |
|            | OEBT 1   | 26870,00 ± 4011,00 | 220,00 ± 16,61 | 6570,00 ± 402,70   | 97,80 ± 3,10     |
|            | OEBT 10  | 31270,00 ± 3765,00 | 230,30 ± 7,75  | 5774,00 ± 552,30   | 94,33 ± 2,84     |
|            | OEBT 100 | 26952,00 ± 1926,00 | 237,70 ± 10,76 | 6982,00 ± 995,20   | 101,50 ± 3,31    |

Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey.

. Os grupos de animais C57BL/J6 obesos e tratados com OEBT nas doses de 10 e 100 mg/Kg apresentaram aumento significativo de ALT em relação ao grupo DP. Entretanto, o grupo de animais HFD que recebeu o OEBT na dose de 1 mg/kg apresentou diminuição significativa nos níveis de ALT em relação ao grupo HFD (Fig. 5). Considerando que a ALT é uma enzima relacionada a lesão hepática, a redução dos níveis de ALT nos animais do grupo OEBT 1 é um importante indicativo da ação hepatoprotetora do OEBT sobre o fígado<sup>69</sup>.

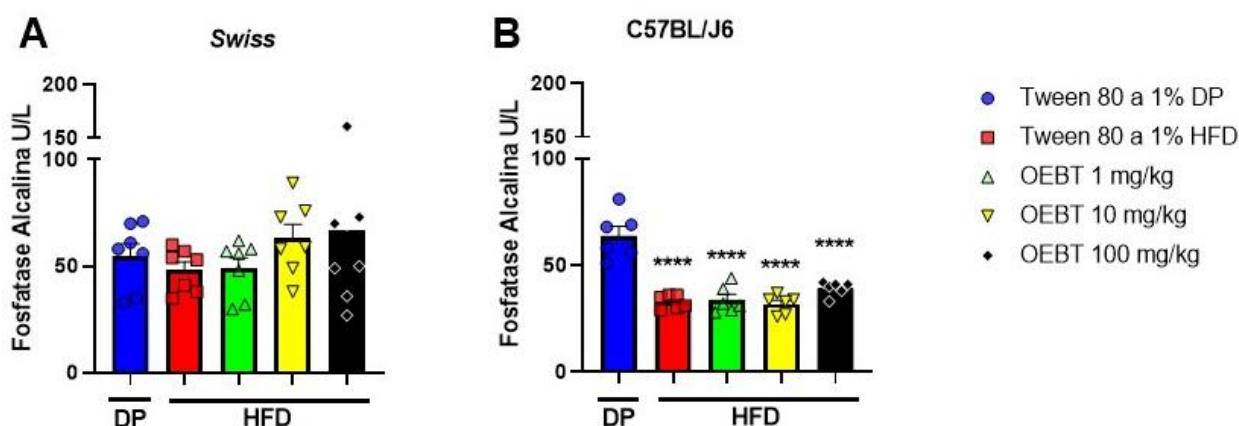


**Fig. 4:** (A) e (B) Níveis séricos de AST dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP ou %  $p < 0,05$  e %%  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo OEBT 100.



**Fig. 5:** (A) e (B) Níveis séricos de ALT dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP e # $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo HFD.

A fosfatase alcalina também é um marcador de função hepática e seus níveis são passíveis de alteração diante de um dano no tecido.<sup>71</sup> Esse parâmetro não foi alterado nos animais Swiss submetidos a HFD. Houve diminuição significativa da fosfatase alcalina em todos os grupos que receberam a HFD em relação ao grupo DP dos animais da linhagem C57BL/J6 (Fig. 6). Existe uma hipótese de que a síntese da fosfatase alcalina pode ser inibida pela presença do lipopolissacarídeo (LPS)<sup>72</sup>. O LPS é proveniente de bactérias gram-negativas presentes no intestino e o aumento dos seus níveis séricos está relacionado com o aumento da permeabilidade intestinal que ocorre no processo que envolve a obesidade<sup>72</sup>. Essa hipótese precisaria ser melhor elucidada em novos estudos que indicaram a diminuição da fosfatase alcalina em animais obesos associado a presença de LPS no intestino.



**Fig. 6:** (A) e (B) Níveis séricos de Fosfatase Alcalina dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo DP.

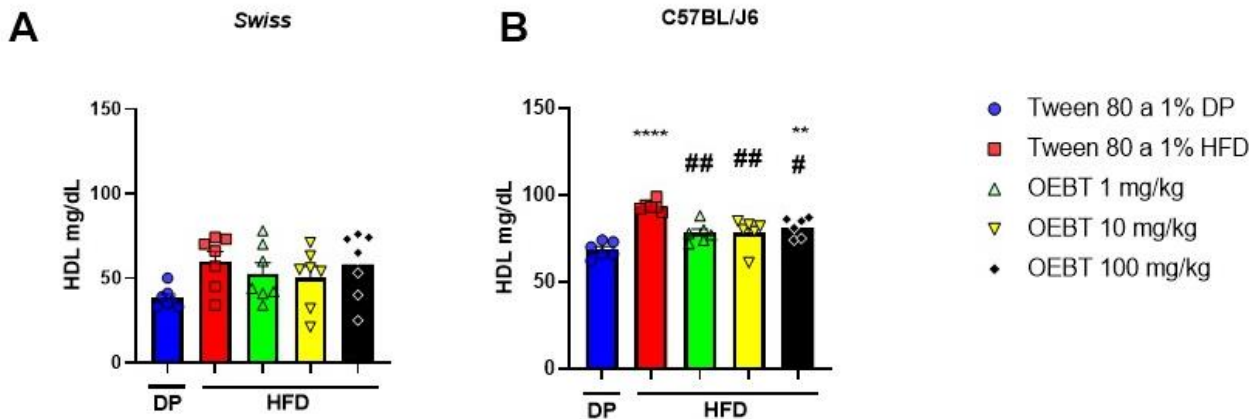
A obesidade é também fator de risco crítico para doenças cardiovasculares, que está associada à dislipidemia aterogênica. Alterações nos níveis plasmáticos de lipídios e lipoproteínas ajudam no desenvolvimento dessa morbidade grave.<sup>35</sup> Para traçar o perfil lipídico desses animais quantificamos HDL, LDL, VLDL, colesterol total e triglicérides. Na figura 7 podemos observar que na linhagem Swiss não houve alteração dos níveis de HDL nos grupos que receberam a HFD em relação ao grupo DP. Nos animais da linhagem C57BL/J6 houve aumento significativo de HDL nos grupos HFD e OE100 em relação ao grupo DP. Os grupos OE1 e 10 apresentaram diminuição significativa do HDL em relação ao grupo HFD (Fig. 7). Os níveis de triglicérides e VLDL não apresentaram alteração no grupo HFD em relação ao DP (Fig. 8 e 9).

Pacientes obesos possuem um comprometimento na função do HDL como por exemplo a diminuição do estresse oxidativo endotelial e o efluxo de colesterol de fibroblastos e esse

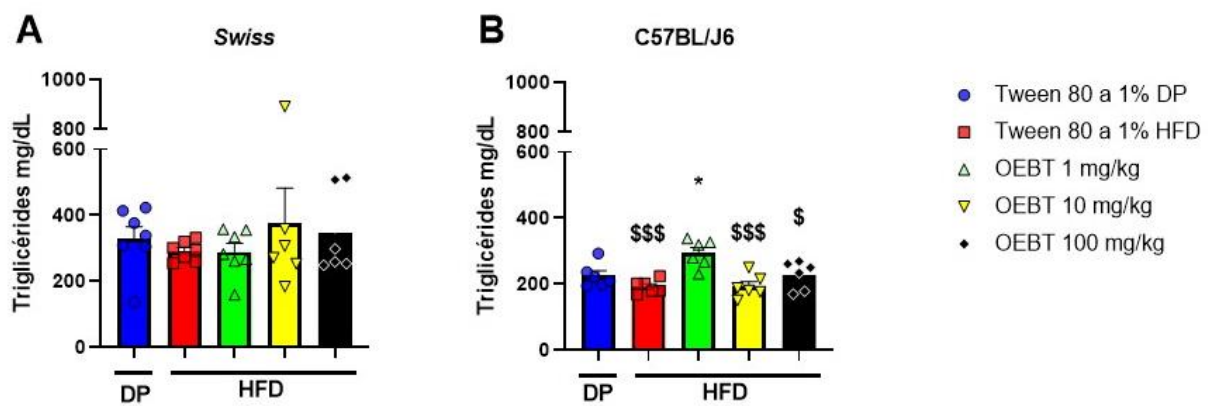
comprometimento está relacionada com o índice de massa corporal do indivíduo<sup>35</sup>. Embora altos níveis de HDL representem maior excreção de colesterol para o fígado, essa não é uma afirmativa necessariamente verdadeira. Existe a hipótese da perda do papel do HDL, que está relacionada com o comprometimento de inibidores da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) que está intimamente relacionada com a excreção dos lipídeos incorporados ao HDL para o fígado, esse comprometimento pode provocar uma sobrecarga de lipídeos no HDL, resultando no aumento de seus níveis na circulação<sup>73</sup>. Além disso, apesar do HDL ser considerado por décadas como “colesterol bom”, esse rótulo vem sendo desafiado por estudos que estão questionando a relação inversa entre HDL e doenças cardiovasculares, apontando que indivíduos com altos níveis de HDL podem ter elevação na morbidade e mortalidade da aterosclerose<sup>74-76</sup>. Além disso, um modelo com obesidade realizado em camundongos C57BL/J6 também demonstrou aumento significativo de HDL quando comparados aos animais saudáveis<sup>70</sup>. Como citado acima, nossos resultados da linhagem C57BL/J6 apontam para um aumento de HDL no grupo de animais obesos em relação ao grupo DP e diminuição nos níveis dos grupos OEBT 1 e 10 em relação ao grupo HFD. Apesar dessa diminuição do HDL nos grupos OEBT 1 e 10, não se pode afirmar que essa diminuição é benéfica, pois somente com esses dados não podemos aferir que esse HDL é ineficiente ou não, serão necessárias mais análises para confirmar a qualidade desse HDL presente nesses animais que receberam a HFD.

Além da alteração nos níveis de HDL, durante a obesidade também ocorre aumento nos níveis de LDL e colesterol total<sup>71</sup>. Em um modelo de indução de obesidade por HFD no período de oito semanas em camundongos C57BL/J6, o grupo de animais obeso apresentou esses parâmetros aumentados quando comparados ao grupo saudável.<sup>70</sup> Nossos resultados demonstram que na linhagem C57BL/J6 também houve aumento significativo dos níveis de colesterol total (47,4%) e LDL (79,8%) em todos os animais que receberam a HFD quando comparados aos animais que receberam a DP (Fig. 10 e 11), entretanto na linhagem Swiss não houve nenhuma alteração nos

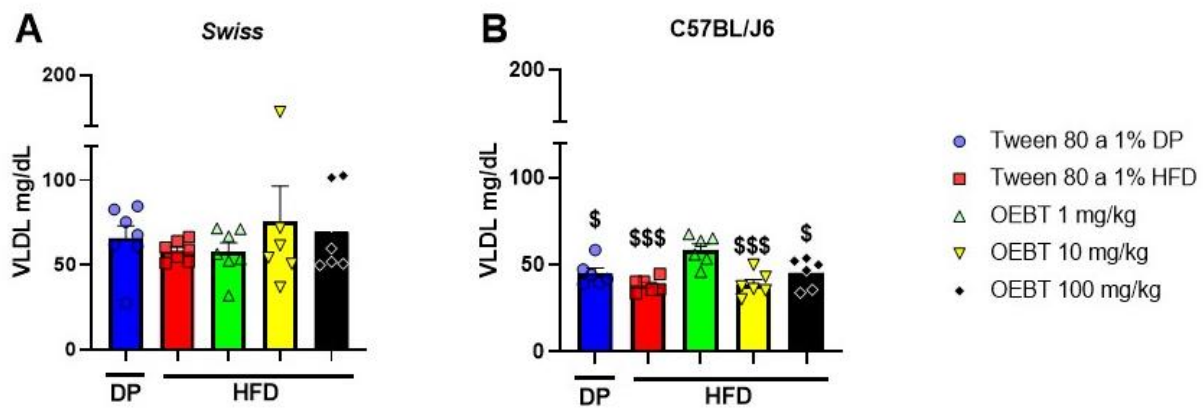
parâmetros relacionados à dislipidemia. Esses dados nos garantem que houve a instalação eficaz da dislipidemia nos camundongos C57BL/J6 e que diante desse fato o OEBT nas três diferentes doses não foi capaz de reverter esse quadro, exceto no HDL no qual o OEBT (nas doses de 1 e 10 mg/kg) reverteu o aumento, porém esses dados precisam ser melhor elucidados em estudos futuros.



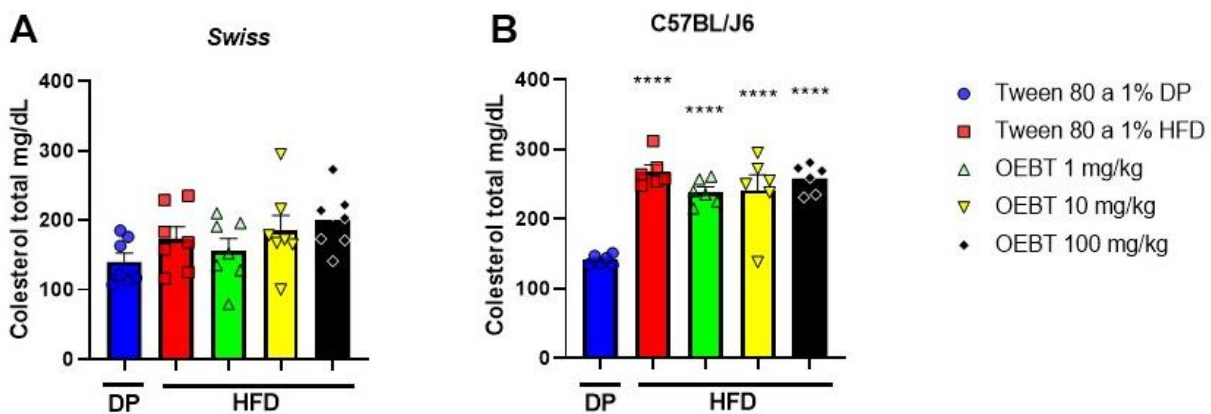
**Fig. 7:** (A) e (B) Níveis séricos de HDL dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP. #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo HFD.



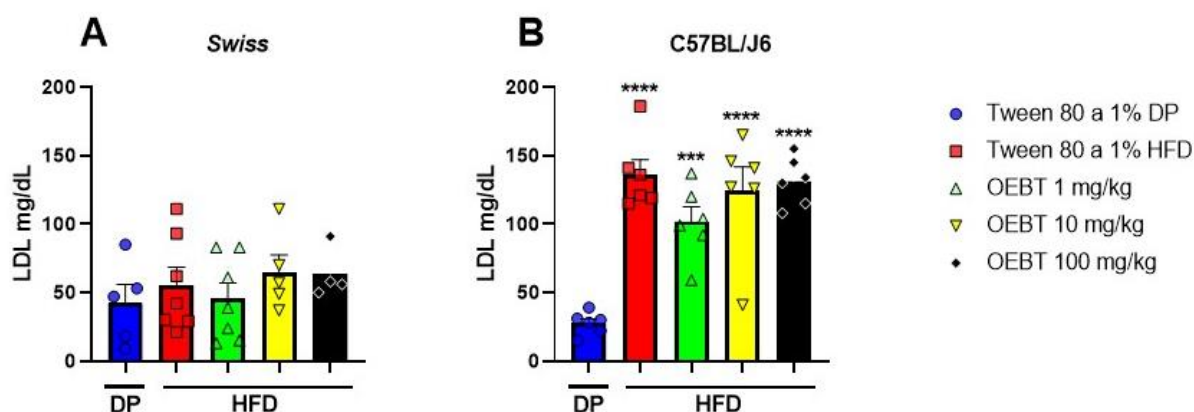
**Fig. 8:** (A) e (B) Níveis séricos de Triglicérides dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DP e \$ $p < 0,05$ ; \$\$\$ $p < 0,001$  quando comparado ao grupo OEBT 1.



**Fig. 9:** (A) e (B) Níveis séricos de VLDL dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \$p<0,05 e \$\$\$p<0,001 quando comparado ao grupo OEBT 1.



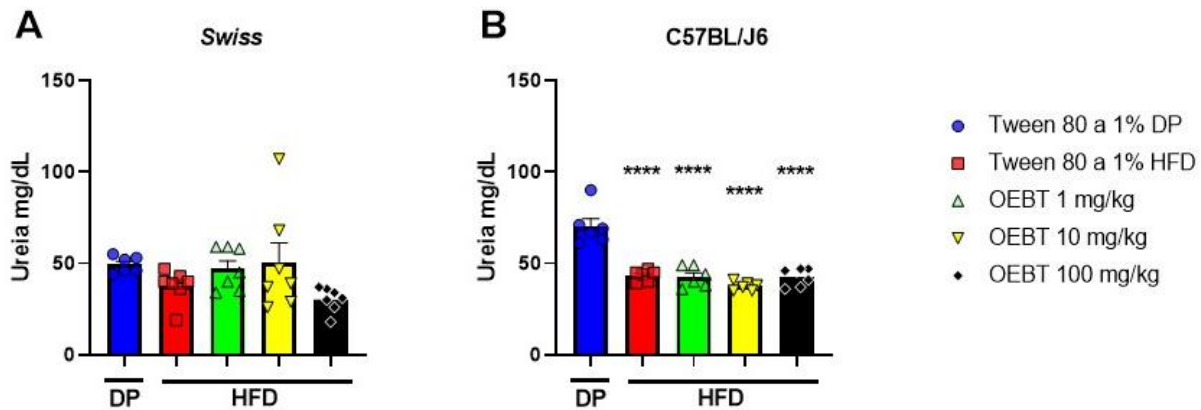
**Fig. 10:** (A) e (B) Níveis séricos de Colesterol total dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*\*p < 0,0001 quando comparado ao grupo DP.



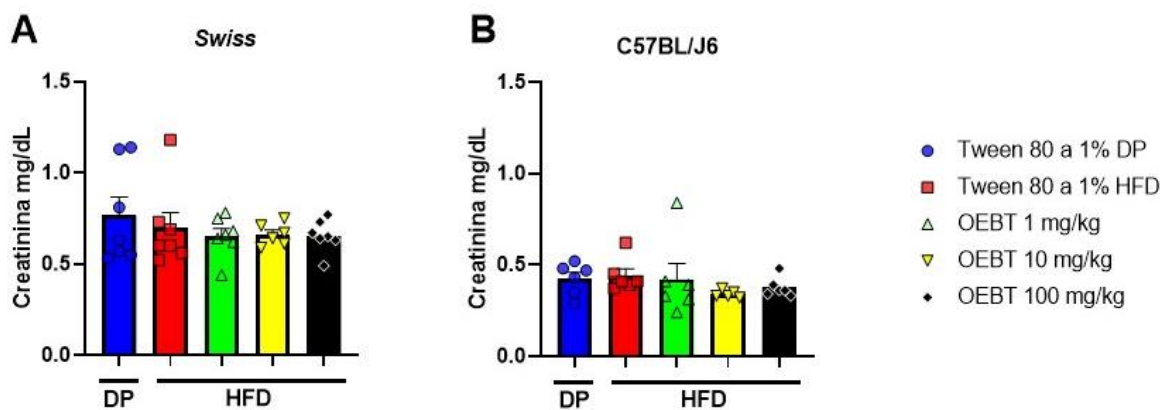
**Fig. 11:** (A) e (B) Níveis séricos de LDL dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n=9-11$ ) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , quando comparado ao grupo DP.

Com o intuito de avaliar a função renal dos diferentes grupos, nós dosamos os níveis de uréia e creatinina dos camundongos das duas linhagens estudadas. Quanto aos níveis de uréia, podemos observar diminuição significativa de 38,24% nos níveis séricos nos animais HFD em relação aos animais DP da linhagem C57BL/J6, porém essa alteração não foi observada nos animais da linhagem Swiss (Fig. 12). Os níveis de creatinina não se apresentaram alterados em nenhum dos grupos avaliados nas duas linhagens (Fig. 13). A uréia é sintetizada no fígado que remove a amônia proveniente da desaminação de aminoácidos e a converte em uréia. Após sua síntese a uréia se difunde a partir dos hepatócitos para os fluídos corporais para depois ser excretada pelos rins<sup>77</sup>. A diminuição dos níveis de uréia precisa de avaliações mais específicas para compreender a relação entre a baixa produção e excreção da ureia atrelado ao alto consumo de dieta hiperlipídica.





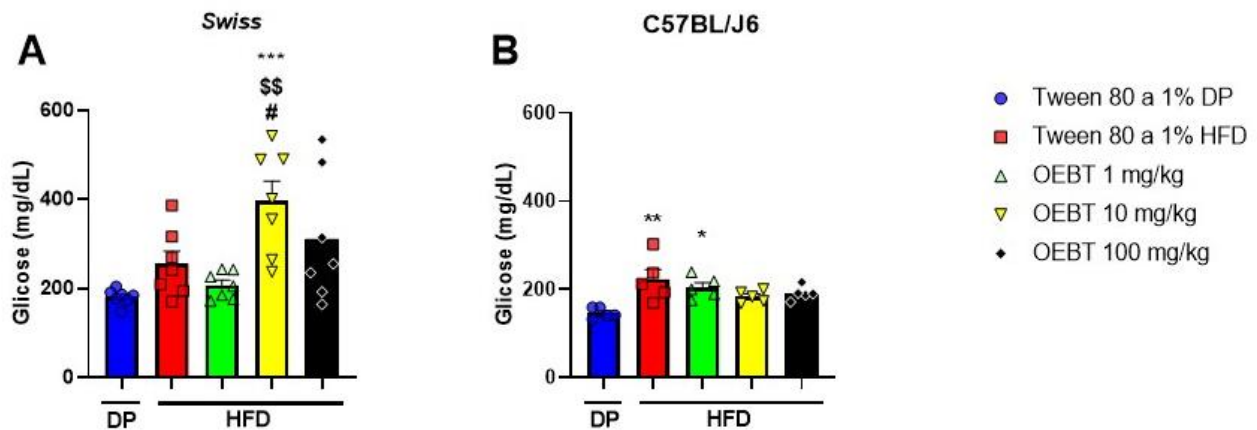
**Fig. 12:** (A) e (B) Níveis séricos de uréia dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*\*\*\*p < 0,0001 quando comparado ao grupo DP.



**Fig. 13:** (A) e (B) Níveis séricos de Creatinina dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre os grupos DP, HFD, OEBT 1, 10 e 100 nas duas linhagens Swiss e C57BL/J6.

A obesidade é um importante fator de risco na patogênese do diabetes tipo 2 que é caracterizada por uma resistência à captação de glicose estimulada pela insulina e descompensação do metabolismo sistêmico da glicose<sup>29</sup>. O excesso do acúmulo do tecido adiposo pode desencadear uma resposta inflamatória do tecido levando a produção de adipocinas pró-inflamatórias que gera inflamação e esse processo esta intimamente ligada ao desenvolvimento da resistência à insulina<sup>3,4,78</sup>. Estudos descreveram que o aumento dos níveis de glicose e insulina no sangue em jejum, assim como um retardo na metabolização da glicose são importantes indicadores relacionados a resistência à insulina e outras alterações sistêmicas do metabolismo da glicose<sup>29</sup>.

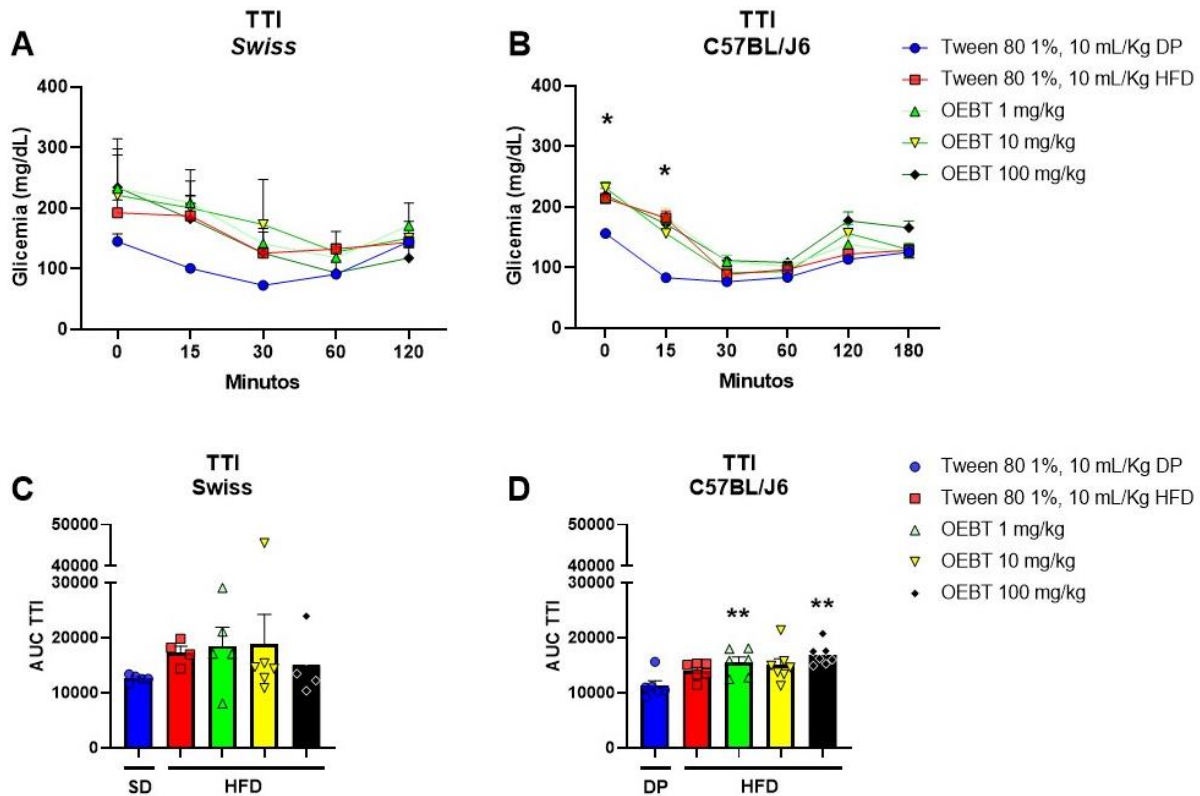
Em nossos resultados, observamos que a glicemia em jejum dos animais C57BL/J6 aumentou significativamente nos grupos HFD e OEBT 1 quando comparados ao grupo DP (Fig. 14). Na linhagem Swiss foi observado aumento significativo da glicemia em jejum do grupo OEBT 10 em relação aos grupos DP e HFD, porém não houve diferença entre os grupos HFD e DP (Fig. 14).



**Fig. 14:** (A) e (B) Níveis séricos de Glicose dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparado ao grupo DP, \$\$  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo OEBT 1 e #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo HFD.

Esses resultados indicam que esse aumento da glicemia em jejum pode indicar um possível quadro de resistência à insulina na linhagem C57BL/J6. Além disso, em nosso trabalho submetemos os camundongos Swiss e C57BL/J6 a testes de tolerância à insulina (TTI) e à glicose (TTG) a fim de caracterizar uma possível resistência à insulina causada pela ingestão de dieta rica em lipídeos. Os testes foram realizados na nona semana de indução, antes de iniciarmos os tratamentos e também após o período de tratamento.

O TTI e TTG são testes úteis para caracterizar o fenótipo metabólico e avaliar as possíveis alterações no metabolismo de glicose e monitorar o níveis de glicose após estímulo (insulina ou glicose), esse monitoramento é um tipo de leitura facilmente acessível e muito utilizado em diferentes estudos<sup>29</sup>. Nos resultados do TTI realizado antes do período de tratamento observamos que os animais da linhagem Swiss não apresentaram nenhum aumento significativo na glicemia durante o período de duas horas após a administração da insulina e também não houve diferença na área sob a curva (AUC) dessa resposta glicêmica (Fig. 15). Entretanto, nos animais da linhagem C57BL/J6 foi observado aumento significativo na glicemia no grupo HFD em relação ao grupo DP nos tempos zero (que indica a glicemia de jejum) e 15 minutos após a administração da insulina, indicando uma possível resistência à insulina (Fig. 15).

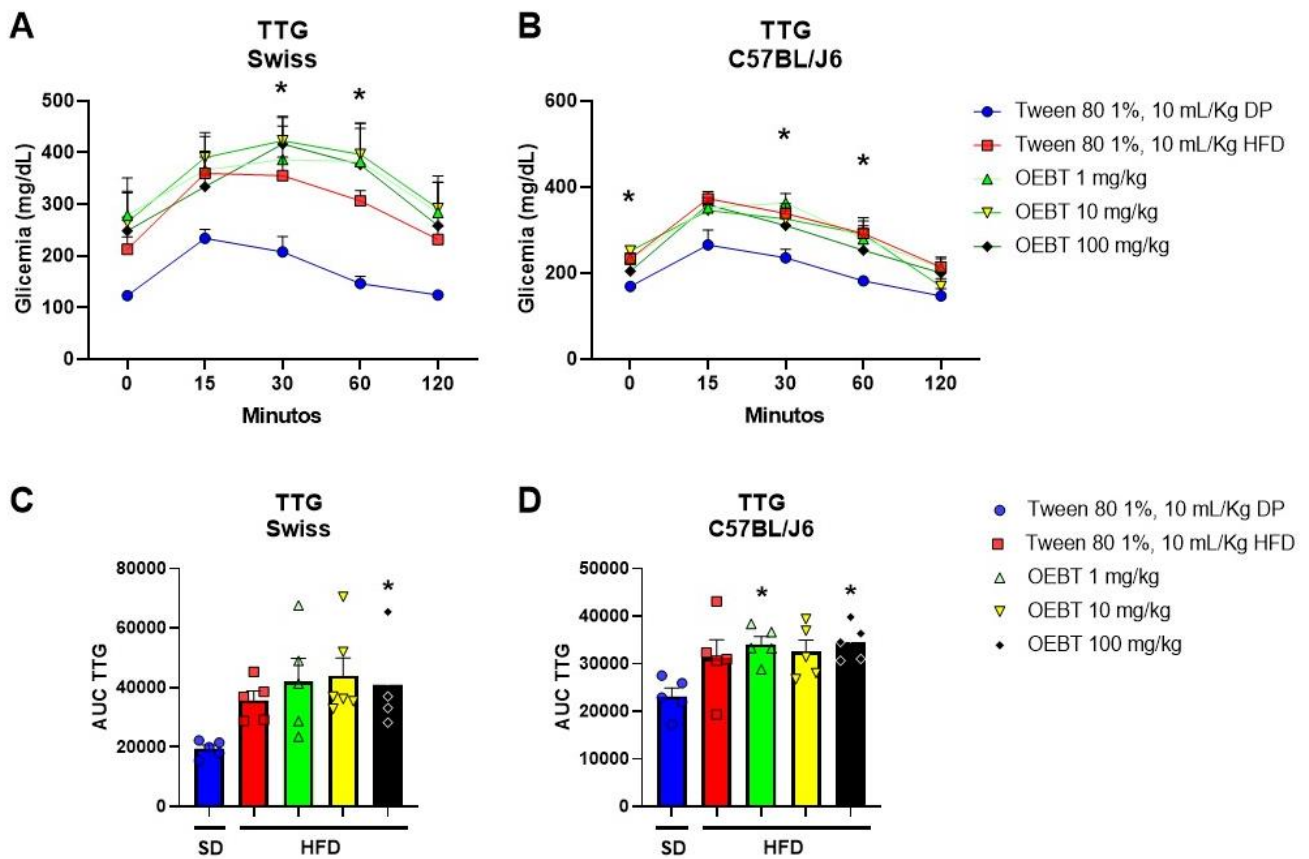


**Fig. 15:** TTI Pré-tratamento - (A) e (B) Glicemia dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente, no período de 120 minutos. (C) e (D) AUC dos camundongos Swiss e C57BL/J6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n=9-11$ ) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey ou ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo DP.

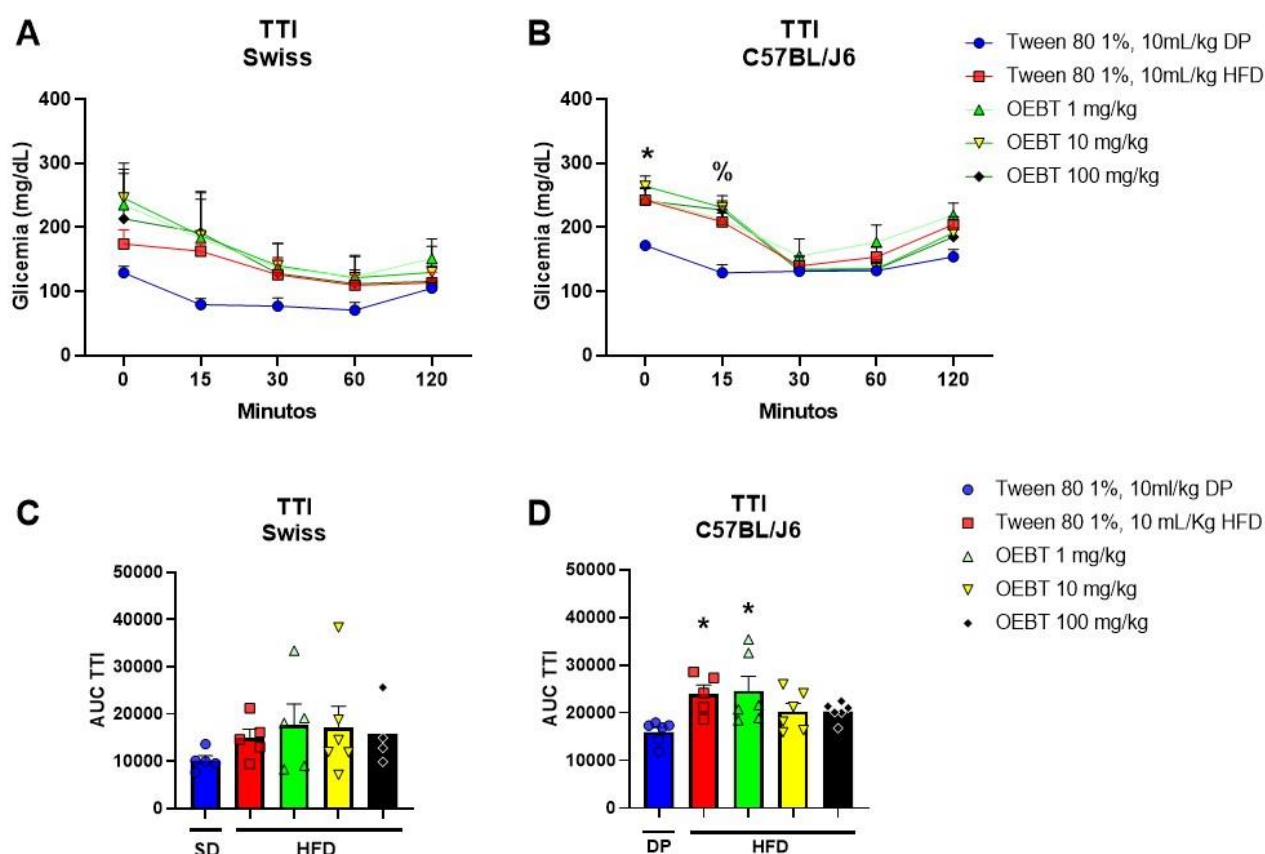
Apesar de termos observado aumento na glicemia dos camundongos C57BL/J6 obesos nos tempos zero e 15 minutos, quando realizamos o cálculo de área sob a curva, que leva em consideração a variação da glicemia por todo o período avaliado, não foi observado o aumento do perfil glicêmico no grupo HFD em relação ao DP. Levando em consideração o período de oito semanas, que equivale a pouco mais que a metade do tempo de indução de obesidade não foi o período suficiente para a instalação do quadro de resistência à insulina.

No TTG podemos observar que na linhagem Swiss houve aumento significativo da glicemia em 30 minutos nos animais do grupo OEBT 100 quando comparados ao grupo DP. Também houve aumento significativo da glicemia do grupo de animais HFD, em 60 minutos, quando comparados ao grupo DP (Fig. 16). Apesar disso, no resultado da AUC foi constatado somente aumento significativo da glicemia no grupo OEBT 100, quando comparado ao grupo DP (Fig. 16). Na linhagem C57BL/J6 houve aumento significativo da glicemia no tempo zero nos grupos HFD e OEBT 10 em relação ao grupo DP. No tempo 30 minutos houve aumento significativo nos grupos HFD e OEBT 1 comparados ao grupo DP e no tempo 60 minutos observamos aumento significativo no grupo HFD em relação ao grupo DP (Fig. 16). No resultado de AUC observamos aumento significativo da glicemia nos grupos OEBT 1 e OEBT 100 em relação ao grupo DP (Fig.16).

Assim como no TTI pré-tratamento, sugerimos que o tempo de indução não tenha sido suficiente para causar resistência à insulina, e consequente comprometimento da metabolização da glicose. Após o tratamento de 28 dias e completadas as 12 semanas de indução de obesidade, realizamos novamente os testes TTI e TTG. Nos resultados de TTI da linhagem Swiss não observamos nenhuma alteração da glicemia entre todos os grupos durante duas horas após a administração de insulina e também nenhuma diferença significativa nos resultados de AUC (Fig. 17). Em contrapartida na linhagem C57BL/J6 observamos no tempo zero aumento significativo na glicemia basal dos grupos HFD, OEBT (doses de 1, 10, e 100 mg/kg) em relação ao grupo DP (Fig.17, B). No tempo de 15 minutos observamos aumento significativo na glicemia dos grupos OEBT nas doses de 1 e 100 mg/kg em relação ao grupo DP (Fig. 17, B). No resultado de AUC do TTI observamos aumento significativo da glicemia dos grupos HFD e OEBT na dose de 1mg/kg em relação ao grupo DP (Fig. 17).



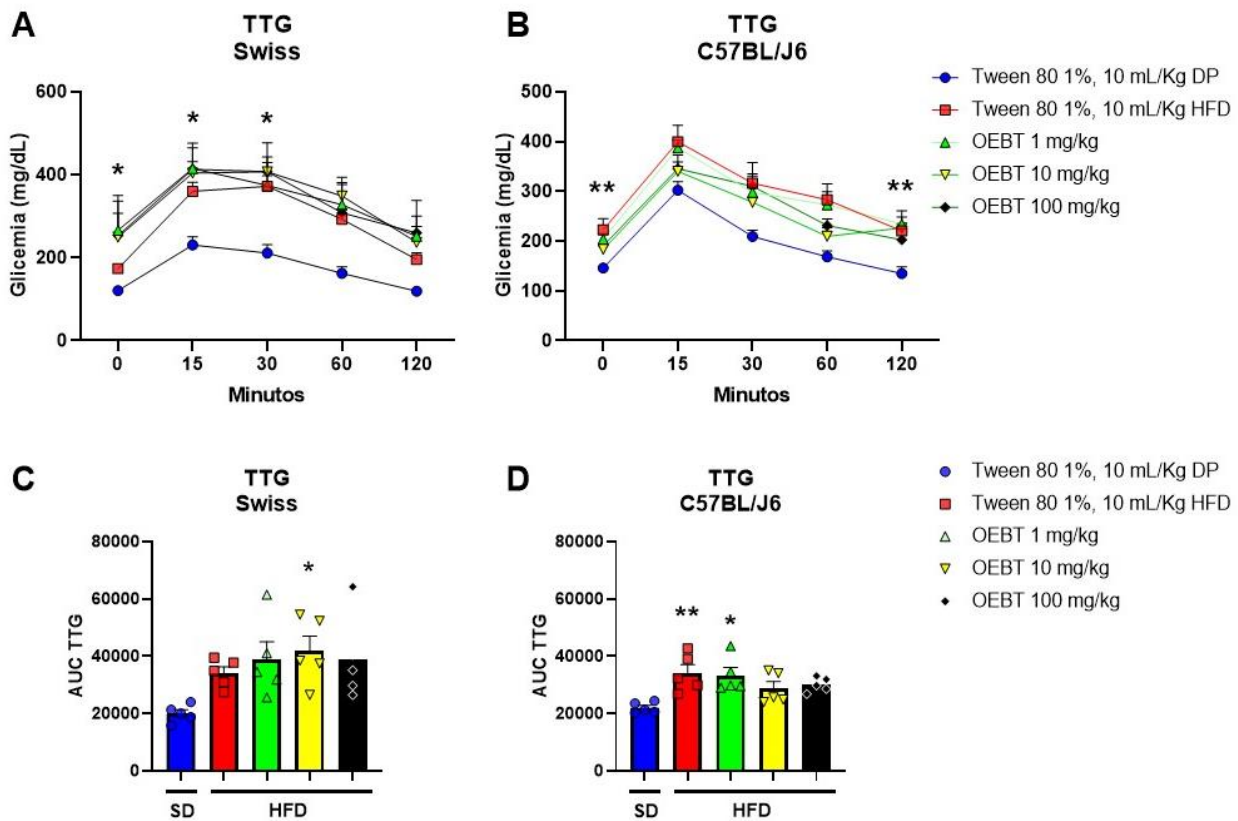
**Fig. 16:** TTG Pré-tratamento - (A) e (B) Glicemia dos camundongos *Swiss* e *C57BL/J6*, respectivamente, no período de 120 minutos. (C) e (D) AUC dos camundongos *Swiss* e *C57BL/J6*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n=9-11$ ) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey ou ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DP.



**Fig. 17:** TTI Pós-tratamento - (A) e (B) Glicemia dos camundongos *Swiss* e *C57BL/J6*, respectivamente no período de 120 minutos. (C) e (D) AUC dos camundongos *Swiss* e *C57BL/J6*. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n=9-11$ ) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey ou ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo DP ou % $p < 0,05$  quando comparados os grupos OEBT 1 e 100 em relação ao grupo DP.

No teste de TTG pós-tratamento observamos na linhagem *Swiss* aumento significativo da glicemia no tempo zero no grupo HFD em relação ao grupo DP (Fig. 18). No tempo de 15 minutos houve aumento significativo da glicemia no grupo OEBT (10 mg/Kg) em relação ao grupo DP e essa mesma diferença se manteve no tempo de 30 minutos (Fig. 18). No resultado de AUC do TTG foi observado aumento significativo da glicemia no grupo OEBT (10 mg/Kg) em relação ao grupo DP, porém nenhuma diferença foi observada entre os grupos HFD e DP (Fig. 18). Nos animais da linhagem *C57BL/J6* observamos aumento significativo da glicemia dos grupos OEBT (1 e 10 mg/Kg)

em relação ao grupo DP no tempo zero e aumento no grupo HFD em relação ao grupo DP no tempo de 120 minutos (Fig. 18, B). No resultado de AUC do TTG observamos aumento significativo da glicemia nos grupos HFD e OEBT (1mg/kg) em relação ao grupo DP (Fig. 18, D).



**Fig. 18:** TTG Pós-tratamento - (A) e (B) Glicemia dos camundongos Swiss e C57BL/J6, respectivamente no período de 120 minutos. (C) e (D) AUC dos camundongos Swiss e C57BL/J6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=9-11) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey ou ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \*p < 0,05 e \*\*p < 0,01, quando comparado ao grupo DP.

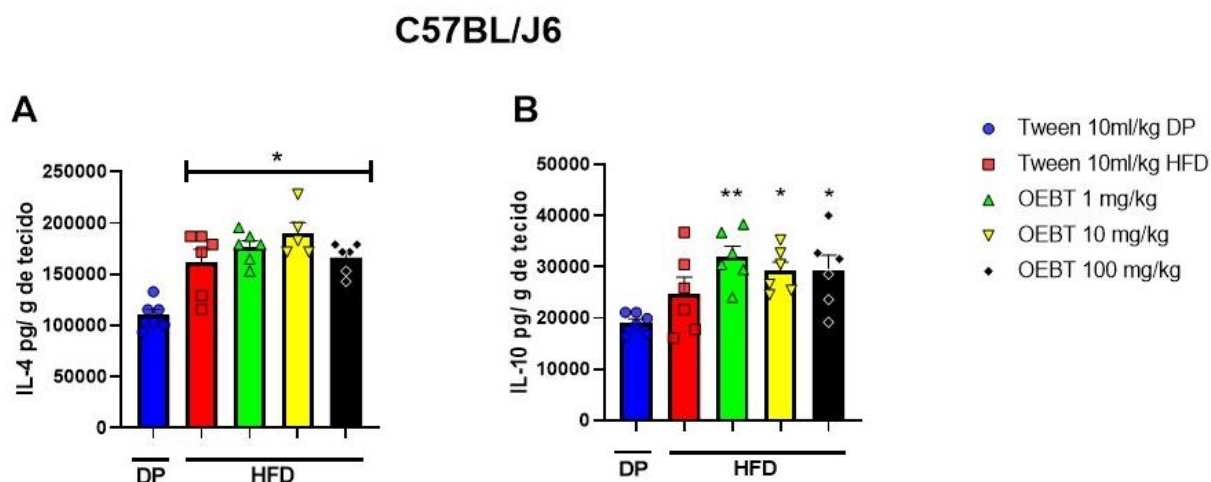
A ausência de alterações dos grupos HFD e DP nos resultados de AUC do TTI e TTG na linhagem Swiss pode nos indicar que a HFD ofertada para esses animais durante 12 semanas não foi capaz de causar resistência à insulina. Já nos grupos HFD e DP da linhagem C57BL/J6 observamos diferenças no TTI e TTG o que nos garante que esses animais estão resistentes à insulina. Apesar dos



grupos OEBT (10 e 100 mg/Kg) não terem apresentado nenhuma diferença estatística em relação ao grupo DP, a ausência da diminuição significativa desses grupos em relação ao grupo HFD faz com que não possamos garantir que o tratamento com o OEBT foi capaz de reverter esse quadro de resistência à insulina.

Diante de todos os parâmetros avaliados podemos observar uma evidente diferença de resposta a mesma HFD entre as linhagens Swiss e C57BL/J6. A exposição de um animal a dietas ricas em calorias muitas vezes não é o suficiente para a instalação de um quadro obesogênico, fatores como a predisposição genética são muitas vezes limitantes no desenvolvimento da obesidade<sup>79</sup>. Modelos monogênicos não mimetizam fielmente o que ocorre em humanos e por isso são reservados para estudos de mecanismos mais específicos, já os modelos poligênicos, com as linhagens C57BL/J6, C3H/HeJ, Swiss (SWR/J) e Swiss-Webster (A/J) são muito empregados, porém cada linhagem responde de maneira diferente à mesma indução<sup>80,81</sup>. Dessa forma avaliamos nesse estudo que a linhagem Swiss não foi adequada para a instalação das alterações metabólicas no modelo de indução de obesidade proposto. Os resultados apresentados demonstram que alterações importantes como hiperglicemia, resistência à insulina, alterações de parâmetros bioquímicos e dislipidemia não resultaram em alterações importantes nos animais obesos dessa linhagem. Em contrapartida a linhagem C57BL/J6 apresentou alterações relevantes, tais como a alteração na massa corporal, índice de adiposidade, dislipidemia, alteração nos níveis de uréia e resistência à insulina, que nos garantem um modelo mais fiel para o estudo das disfunções metabólicas causadas pela obesidade. Considerando esse ponto, nos debruçamos a análise do possível efeito antiobesogênico do OEBT nos camundongos obesos da linhagem C57BL/J6. Para melhor elucidar as alterações nos mediadores anti-inflamatórios na obesidade e o possível efeito do OEBT nessas alterações, avaliamos as citocinas IL-4 e IL-10.

Durante a obesidade alterações na sinalização inflamatória conhecida como inflamação crônica de baixo grau afeta diferentes tecidos do organismo, principalmente o tecido adiposo<sup>26</sup>. O processo inflamatório desencadeado na obesidade mobiliza uma resposta celular inata responsável pelo desenvolvimento do quadro de resistência à insulina<sup>26</sup>. Em nosso estudo, demonstramos que após 12 semanas, camundongos da linhagem C57BL/J6 alimentados com HFD apresentaram um quadro de resistência à insulina e hiperglicemia (Fig. 17 e 18) esse quadro pode estar diretamente relacionado alterações da mediação inflamatória durante a obesidade. A fim de elucidar a sinalização anti-inflamatória em nossos modelos foi realizada a quantificação de IL-4 e IL-10 (Fig. 19) no tecido adiposo (TA) nos camundongos C57BL/J6 após as 12 semanas de indução de obesidade e tratamento com OEBT em três diferentes doses. Na figura 19 é possível observar aumento significativo nos níveis de IL-4 no TA de animais HFD quando comparados com os animais DP. Esse aumento de IL-4 no TA de camundongos obesos é diferente do perfil encontrado na literatura, que aponta redução nos níveis de IL-4 no TA devido a oferta de HFD em animais<sup>82</sup>. A IL-4 é principalmente produzida e expressa por eosinófilos atuando na manutenção da homeostase de glicose e como papel regulador no perfil fenotípico de macrófagos residentes no tecido adiposo<sup>82,83</sup>. Além disso, Bolus *et al.* (2018)<sup>84</sup> demonstraram que os eosinófilos atuam de forma diferenciada através do tempo e em diferentes tecidos durante a obesidade, podendo ser um fator para o remodelamento do tecido ou até mesmo ter um papel de reestabelecimento da homeostasia do microambiente. Tal estudo poderia explicar nossos resultados, pois os altos níveis de IL-4 podem estar relacionados com a tentativa de um restabelecimento da função metabólica do TA nesse período de tratamento.



**Fig. 19:** (A) e (B) IL-4 e IL-10 do Tecido adiposo (TA) dos camundongos C57BL/J6, respectivamente, tratados por 28 dias. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=5-7) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo DP.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por Tregs<sup>85</sup>. A regulação positiva de IL-10 sob condições de HFD está relacionada com a polarização de macrófagos do tipo M2 que contribuem para reduzir a inflamação e melhorar a sensibilidade à inulina<sup>85</sup>. Choi, *et al.* (2020)<sup>85</sup> sugeriram que a presença de macrófagos do tipo M2, Tregs e eosinófilos no TA branco pode contribuir para a transformação do TA branco em TA marrom. O TA marrom é um local chave para a produção de calor em mamíferos e já foi alvo para promover a perda de peso. O aumento da atividade desse TA marrom é essencial para o tratamento da obesidade e de doenças metabólicas<sup>85</sup>. Na figura 19 podemos observar que houve um aumento significativo de IL-10 nos grupos obesos que receberam o OEBT nas três diferentes doses, em relação ao grupo HFD. Esse aumento indica que o OEBT nas três diferentes doses possui ação anti-inflamatória podendo contribuir, através da IL-10, para a transformação do TA branco em marrom e consequentemente ativando a via termogênica.

A *B. trimera* é utilizada na forma de chá para perda de peso na medicina popular, além disso possui efeito anti-inflamatório e hepatoprotetor<sup>40,86</sup>. O óleo essencial da *B. trimera* é característico por conter principalmente acetato de carquejila (65,1%), ledol (7,7%) e carquejol (6,2%) na sua

composição<sup>39</sup>. Estudos realizados em ratos diabéticos demonstraram que a fração aquosa dessa planta possui ação hipoglicêmica<sup>36</sup>. Também foi demonstrado que o extrato metanólico da *B. trimera* apresentou diminuição da massa corporal de ratos obesos e diminuição dos níveis de colesterol desses animais tratados por 35 dias<sup>36</sup>. Nós observamos que os animais tratados com OEBT na dose de 1 mg/kg durante 28 dias, foi capaz de reverter o aumento de HDL causado pela ingestão da HFD. No entanto ainda são necessários mais estudos para avaliar o mecanismo que ela age e se ela possui algum efeito benéfico na obesidade. Também observamos a eficácia do OEBT na dose de 1 mg/kg na proteção do fígado contra lesão celular através da diminuição de ALT. Além disso, o OEBT nas três diferentes doses testadas apresentou uma ação anti-inflamatória através do aumento de IL-10 no TA.

## CONCLUSÃO

Em resumo, até o momento, foi possível concluir que a linhagem Swiss não é eficaz no modelo proposto para a instalação de uma inflamação metabólica causada pela ingestão de uma dieta hiperlipídica diferentemente da linhagem C57BL/J6 que foi capaz de desenvolver além de alterações morfológicas, dislipidemia, resistência à insulina e também alterações na produção de citocinas anti-inflamatórias. O tratamento dos animais com o OEBT, na dose de 1 mg/Kg apresentou ação benéfica no fígado através da diminuição dos níveis de ALT e também pela ação anti-inflamatória do óleo, nas três doses testadas, em decorrência do aumento da IL-10 no TA epididimal desses animais.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO World Health Organization. (2019). Available at: <https://www.who.int/>.
2. Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilancia em Saúde. *VIGITEL BRASIL 2010 inear capital r região UF Tend . linear UF. Vigitel* (2011).
3. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
4. Reilly, S. M. & Saltiel, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 633–643 (2017).
5. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
6. Olefsky, J. M. & Glass, C. K. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annual Review of Physiology* **72**, (2010).
7. White, U. & Ravussin, E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. *Diabetologia* **62**, 17–23 (2019).
8. Rocha, V. Z. & Folco, E. J. Inflammatory Concepts of Obesity. *Int. J. Inflam.* **2011**, 1–14 (2011).
9. Berg, A. H. & Scherer, P. E. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **96**, 939–949 (2005).
10. Shoelson, S. E. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **116**, 1793–1801 (2006).
11. Wensveen, F. M.*et al.*The ‘Big Bang’ in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose

tissue inflammation. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2446–2456 (2015).

12. Doherty, T. A. At the Bench: Understanding group 2 innate lymphoid cells in disease. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 455–467 (2015).
13. Moro, K. *et al.* Innate production of T H 2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit + Sca-1 + lymphoid cells. *Nature* **463**, 540–544 (2010).
14. Singh, P. *et al.* Differential effects of leptin on adiponectin expression with weight gain versus obesity. *Int. J. Obes.* **40**, 266–274 (2016).
15. Grunfeld, C. *et al.* Search for mediators of the lipogenic effects of tumor necrosis factor: potential role for interleukin 6. *Cancer Res.* **50**, 4233–4238 (1990).
16. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. Tumor necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. *J. Clin. Invest.* **80**, 184–190 (1987).
17. Lackey, D. E. & Olefsky, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 15–20 (2016).
18. Lumeng, C. N., *et al* Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* **56**, 16–23 (2007).
19. Herck, M. A. V. *et al.* The differential roles of T-cells in non-alcoholic fatty liver disease and obesity. *Front. Immunol.* **10**, 82 (2019).
20. Parkin, J. *et al.* (2001) An overview of the immune system. *Nursing standard (Royal College of Nursing (Great Britain))*. **23**, (2001).
21. Chehimi, M., Vidal, H. & Eljaafari, A. Pathogenic role of IL-17-producing immune cells in

obesity, and related inflammatory diseases. *J. Clin. Med.* **6**, 68 (2017).

22. Winer, S. *et al.* Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy: CD4<sup>+</sup> T cells control glucose homeostasis. *Nat. Med.* **15**, 921–929 (2009).
23. Cipolletta, D. Adipose tissue-resident regulatory T cells: Phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. *Immunology* **142**, 517–525 (2014).
24. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **112**, 1821–1830 (2003).
25. Strissel, K. J. *et al.* Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**, 2910–2918 (2007).
26. Wu, H. & Ballantyne, C. M. Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity. *Circ. Res.* 1549–1564 (2020). doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315896
27. Hotamisligil, G. S. *et al.* Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**, 2409–2415 (1995).
28. Hotamisligil, G. S. *et al.* Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4854–4858 (1994).
29. 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**, 1–12 (2018).
30. Ahmed, B., Sultana, R. & Greene, M. W. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed. Pharmacother.* **137**, 111315 (2021).

31. Deprince, A., Haas, J. T. & Staels, B. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease. *Mol. Metab.* **42**, 101092 (2020).
32. Uchida, N. S. *et al.* Hepatoprotective effect of citral on acetaminophen-induced liver toxicity in mice. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2017**, 1–9 (2017).
33. Liu, D. *et al.* Dietary supplementation of apple phlorizin attenuates the redox state related to gut microbiota homeostasis in C57BL / 6J mice fed with a high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.* **69**, 198–221 (2020).
34. Prasun, P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1866**, 165838 (2020).
35. Stadler, J. T. & Marsche, G. Obesity-related changes in high-density lipoprotein metabolism and function. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–28 (2020).
36. De Souza Marinho Do Nascimento, D. *et al.* *Baccharis trimera* (Less.) DC exhibits an anti-adipogenic effect by inhibiting the expression of proteins involved in adipocyte differentiation. *Molecules* **22**, 1–16 (2017).
37. Palatty, P. L. & Saldanha, E. Pharmacotherapy for weight management. *J. Assoc. Physicians India* **60**, 34–40, 45 (2012).
38. Souza, S. De, Pereira, L. & Souza, A. Estudo da atividade antiobesidade do extrato metanólico de *Baccharis trimera* (Less.) DC. *Rev. Bras.* **93**, 27–32 (2012).
39. Besten, M. A. *et al.* Chemical composition of volatiles from male and female specimens of *Baccharis trimera* collected in two distant regions of southern brazil: a comparative study using chemometrics. *Quim. Nova* **36**, 1096–1100 (2013).



40. dos Reis Lívero, F. A. *et al.* Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **389**, 985–998 (2016).
41. Cercato, L. M., White, P. A. S., Nampo, F. K., Santos, M. R. V. & Camargo, E. A. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? *J. Ethnopharmacol.* **176**, 286–296 (2015).
42. Bueno, G. *et al.* The essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC improves gastric ulcer healing in rats through modulation of VEGF and MMP-2 activity. *J. Ethnopharmacol.* **271**, 113832 (2021).
43. Waterman, P. G. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 594 (1996).
44. Krawisz, J. E., Sharon, P. & Stenson, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* **87**, 1344–1350 (1984).
45. Winterbourn, C. C. *et al.* The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.* **85**, 337–341 (1975).
46. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology.* **105**, 121–126 (1984).
47. Faure, P. & Lafond, J.-L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. in *Analysis of Free Radicals in Biological Systems* 237–248 (Birkhäuser Basel, 1995). doi:10.1007/978-3-0348-9074-8\_17
48. Wang, C.-Y. & Liao, J. K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance.

*Methods in molecular biology.* **821**, (2012)

49. Sugama, J., *et al.*. Enteropeptidase inhibition improves obesity by modulating gut microbiota composition and enterobacterial metabolites in diet-induced obese mice. *Pharmacol. Res.* 105337 (2020). doi:10.1016/j.phrs.2020.105337
50. Poon, K. Behavioral feeding circuit: dietary fat-induced effects of inflammatory mediators in the hypothalamus. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 1–12 (2020).
51. Lai, Y. S. *et al.* Mass-spectrometry-based serum metabolomics of a C57BL/J6J mouse model of high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease development. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 7873–7884 (2015).
52. Sladek, C. D. *et al.*. The “metabolic sensor” function of rat supraoptic oxytocin and vasopressin neurons is attenuated during lactation but not in diet-induced obesity. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **310**, R337–R345 (2016).
53. Grasa-López, A. *et al.* *Undaria pinnatifida* and fucoxanthin ameliorate lipogenesis and markers of both inflammation and cardiovascular dysfunction in an animal model of diet-induced obesity. *Mar. Drugs* **14**, 148 (2016).
54. Lutz, T. A. & Woods, S. C. Overview of animal models of obesity. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 1–22 (2012). doi:10.1002/0471141755.ph0561s58
55. Barrett, P., Mercer, J. G. & Morgan, P. J. Preclinical models for obesity research. *DMM Dis. Model. Mech.* **9**, 1245–1255 (2016).
56. Sharma, B. R. *et al.*. *Caulerpa okamurae* extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and prevents high-fat diet-induced obesity in C57BL/J6 mice. *Nutr. Res.* **47**, 44–52 (2017).

57. Baldassano, S. *et al.* Glucagon-like peptide-2 treatment improves glucose dysmetabolism in mice fed a high-fat diet. *Endocrine* **54**, 648–656 (2016).
58. Prior, R. L. *et al.* Whole berries versus berry anthocyanins: Interactions with dietary fat levels in the C57BL/J6J mouse model of obesity. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 647–653 (2008).
59. Townsend, K. L., Lorenzi, M. M. & Widmaier, E. P. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocrine* **33**, 176–188 (2008).
60. Buettner, R. *et al.* Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. *J. Mol. Endocrinol.* **36**, 485–501 (2006).
61. Pomplun, D. *et al.* Reduced expression of mitochondrial frataxin in mice exacerbates diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6377–6381 (2007).
62. Cinti, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res.* **46**, 2347–2355 (2005).
63. van der Heijden, R. A. *et al.* High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/J6j mice. *Aging (Albany. NY).* **7**, 256–268 (2015).
64. Shoelson, S. E. *et al.* Inflammation and insulin resistance find the latest version : Review series Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* **116**, 1793–1801 (2006).
65. Glass, Christopher K. & Olefsky, J. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metabolism* **15**, 635–645 (2014).
66. Sheedfar, F., *et al.* Liver diseases and aging: friends or foes? *Aging Cell.* **6**, 950–954 (2013).

doi:10.1111/accel.12128

67. Ohara, R. *et al.* *Terminalia catappa* L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Ethnopharmacol.* **256**, 112793 (2020).
68. Henao-mejia, J. *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature.* **7384**, 179-185 (2012).
69. Panteghini, M. & Bais, R. Serum Enzymes. in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (eds. Rifai, N., Horvath, A. R. & Wittwer, C. T.) 404–434 (Elsevier, 2018).
70. Zhang, Y. *et al.* Function Insoluble dietary fiber derived from brown seaweed *Laminaria japonica* ameliorate obesity-related features via modulating gut microbiota. *Food & Function.* **2**, 587-601 (2020).
71. Wu, Y., Sun, H., Yi, R., Tan, F. & Zhao, X. Anti-obesity effect of Liupao tea extract by modulating lipid metabolism and oxidative stress in high-fat-diet-induced obese mice. *J Food Sci.* **1**, 215-222 (2020).
72. Bentala, H. *et al.* Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock* **18**, 561–566 (2002).
73. Xiang, A. S. & Kingwell, B. A. Rethinking good cholesterol: a clinicians' guide to understanding HDL. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **7**, 575–582 (2019).
74. Golomb, B. A., Dang, T. T. & Criqui, M. H. Peripheral arterial disease: morbidity and mortality implications. *Circulation* **114**, 688–699 (2006).

75. Van der Steeg, W. A. *et al.* High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for cardiovascular risk. The IDEAL and EPIC-Norfolk Studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 634–642 (2008).
76. Qi, Y. *et al.* Cholesterol-overloaded HDL particles are independently associated with progression of carotid atherosclerosis in a cardiovascular disease-free population: A community-based cohort study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 355–363 (2015).
77. Guyton, A. C. & Hall, J. E. *Tratado de fisiologia médica.* (2017).
78. Guzik, T. J. *et al.* The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc. Res.* **113**, 1009–1023 (2017).
79. West, D. B. *et al.* Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **262**, R1025-1032 (1992).
80. Surwit, R. S. *et al.* Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* **44**, 645–651 (1995).
81. Leibowitz, S. F. *et al.* Phenotypic profile of SWR/J and A/J mice compared to control strains: Possible mechanisms underlying resistance to obesity on a high-fat diet. *Brain Res.* **1047**, 137–147 (2005).
82. Calco, G. N., Fryer, A. D. & Nie, Z. Unraveling the connection between eosinophils and obesity. *J. Leukoc. Biol.* **108**, 123–128 (2020).
83. Wu, D. *et al.* Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science.* **332**, 243–247 (2011).

84. Bolus, W. R., Kennedy, A. J. & Hasty, A. H. Obesity-induced reduction of adipose eosinophils is reversed with low-calorie dietary intervention. *Physiol. Rep.* **22**, e13919 (2018).
85. Choi, E. W. *et al.* Fas mutation reduces obesity by increasing IL-4 and IL-10 expression and promoting white adipose tissue browning. *Sci. Rep.* **10**, 1–14 (2020).
86. Cercato, L. M., *et al.* A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? *Journal of Ethnopharmacology* **176**, 286-296 (2015).

## ANEXO 1: PROTOCOLO Nº 1056-CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



## Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Ação antiobesogênica do óleo essencial da *Baccharis trimera* em camundongos Swiss machos", Protocolo nº **1156-CEUA**, sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

|                      |                                                                                  |                         |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Finalidade:          | ( ) Ensino                                                                       | (x) Pesquisa Científica |
| Vigência do Projeto: | Início: 20/5/2019                                                                | Término: 1/3/2021       |
| Espécie/linhagem:    | Camundongo Swiss                                                                 |                         |
| Nº de animais:       | 160                                                                              |                         |
| Peso:                | 30g                                                                              | Idade: 4-6 semanas      |
| Sexo:                | macho                                                                            |                         |
| Origem               | CPPA - Centro de Pesquisa e Produção de Animais.<br>Unesp-Câmpus de Botucatu/SP. |                         |

Botucatu, 10 de maio de 2019.

Prof. Assoc. Wellerson Rodrigo Scarano  
Coordenador da CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA  
Instituto de Biociências da Unesp - Câmpus de Botucatu  
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250 - Distrito de Rubião Júnior - CEP 18618-689 Botucatu/SP  
Tel 14 3880 0851 mail: sedta@ibb.unesp.br