



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA (FMVA) – CÂMPUS DE ARAÇATUBA

MURILO CATELANI FERRAZ

**Os riscos de estresse oxidativo sistêmico e lesão renal
associados à hiperhomocisteinemia em ratos obesos
diminuem com o consumo de chá mate (*Ilex
paraguariensis*) descafeinado**

Araçatuba

2022

MURILO CATELANI FERRAZ

**Os riscos de estresse oxidativo sistêmico e lesão renal
associados à hiperhomocisteinemia em ratos obesos
diminuem com o consumo de chá mate (*Ilex
paraguariensis*) descafeinado**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

Araçatuba

2022

F381r

Ferraz, Murilo Catelani

Os riscos de estresse oxidativo sistêmico e lesão renal associados à hiperhomocisteinemia em ratos obesos diminuem com o consumo de chá mate (*Ilex paraguariensis*) descafeinado / Murilo Catelani Ferraz. -- Araçatuba, 2022
62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Paulo César Ciarlini

1. Homocisteína. 2. Cafeína. 3. Erva-mate. 4. Refrigerantes.
5. Peroxidação de lipídeos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

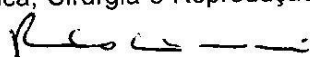
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Os riscos de estresse oxidativo sistêmico e lesão renal associados à hiperhomocisteinemia em ratos obesos diminuem com o consumo de chá mate (Ilex paraguariensis) descafeinado.

AUTOR: MURILO CATELANI FERRAZ

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP 

Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. ALDA IZABEL DE SOUZA (Participação Virtual)
FAMEZ – UFMS Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Araçatuba, 21 de fevereiro de 2022.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

Os riscos de estresse oxidativo sistêmico e lesão renal associados à hiperhomocisteinemia em ratos obesos diminuem com o consumo de chá mate (*Ilex paraguariensis*) descafeinado.

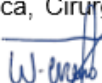
AUTOR: MURILO CATELANI FERRAZ

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP



Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA (Participação Virtual)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. ALDA IZABEL DE SOUZA (Participação Virtual)

FAMEZ – UFMS Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Araçatuba, 21 de fevereiro de 2022.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Os riscos de estresse oxidativo sistêmico e lesão renal associados à hiperhomocisteinemia em ratos obesos diminuem com o consumo de chá mate (*Ilex paraguariensis*) descafeinado.

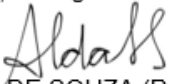
AUTOR: MURILO CATELANI FERRAZ

ORIENTADOR: PAULO CÉSAR CIARLINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba - UNESP

Prof. Dr. WAGNER LUIS FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Profa. Dra. ALDA IZABEL DE SOUZA (Participação Virtual)
FAMEZ – UFMS Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Araçatuba, 21 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a realização do trabalho. Processo nº 2019/22881-5.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado nos primeiros meses do programa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra, por todo auxílio prestado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Ciarlini, por toda dedicação, paciência, amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Wagner Luis Ferreira pela presença na banca examinadora, ensinamentos e contribuições para este trabalho.

À Prof^a Dr^a Alda Izabel de Souza e À Prof^a. Dr^a. Suely Regina Mogami Bomfim por serem parte importante da minha formação como profissional e ser humano.

À minha família, pelas lições e suporte até aqui.

Ao meu irmão e amigos, por todo o apoio incondicional, palavras de incentivo e anseios que compartilhamos sobre o futuro.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório Clínico Veterinário - FMVA/UNESP pelos longos dias de trabalho, dedicação e amizade.

A todos meu sincero e profundo obrigado!

FERRAZ, M. C. **Os riscos de estresse oxidativo sistêmico e lesão renal associados à hiperhomocisteinemia em ratos obesos diminuem com o consumo de chá mate (*Ilex paraguariensis*) descafeinado.** 2022. 62p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2022.

RESUMO

O consumo de refrigerante de cola (RC) induz obesidade em ratos e seu efeito é prevenido pelo chá mate (CM). A obesidade e a cafeína presente no RC e CM podem contribuir para hiperhomocisteinemia (HHcy) e consequente estresse oxidativo sistêmico (EOS) e doença renal (DR). Tendo isso em vista, o objetivo desse trabalho foi responder as seguintes perguntas: A obesidade e o consumo da cafeína presente no chá mate e no refrigerante de cola aumentam a concentração plasmática de homocisteína em ratos? A hiperhomocisteinemia contribui para o estresse oxidativo sistêmico e lesão renal? Desse modo, realizou-se um estudo randomizado e cego com 90 ratos Wistar tratados por 120 dias com e sem RC, CM descafeinado ou *in natura*. A concentração plasmática de homocisteína (Hcy) do grupo com obesidade foi comparada aos demais e associada a indicadores de DR (creatinina, ureia e dimetilarginina simétrica plasmáticos, densidade, microalbumina e cálcio urinários) e EOS (albumina, ácido úrico, bilirrubina total, peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total e concentração de oxidante total). As diferenças entre os grupos foram calculadas por ANOVA + pós-teste de Tukey. A associação entre HHcy e os marcadores de DR e EOS foi quantificada pelo coeficiente r de Pearson, razão de probabilidade e teste de Fisher (GraphPad Prism, v.5.1). A cafeína do CM *in natura* causou um discreto aumento da Hcy. A HHcy confirmada em ratos obesos diminuiu com o consumo de CM descafeinado ou *in natura*. Observamos correlação positiva entre HHcy, peroxidação lipídica e microalbuminúria, com risco relativo 6 vezes maior de ocorrência de HHcy em ratos com obesidade e 3 vezes maior de microalbuminúria em ratos com HHcy. A HHcy ocorre em ratos com obesidade e está associada com o EOS e DR. O CM descafeinado foi mais eficaz que a sua forma *in natura* cafeinada na prevenção da HHcy, EOS e injúria renal.

Palavras-chave: Homocisteína. Cafeína. Erva-mate. Refrigerantes. Peroxidação de lipídeos.

FERRAZ, M. C. **The risks of systemic oxidative stress and kidney damage associated with hyperhomocysteinemia in obese rats decrease with consumption of decaffeinated mate tea (*Ilex paraguariensis*)**. 2022. 62p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

The consumption of cola drinks (CD) induces obesity in rats and its effect is prevented by mate tea (MT). Obesity and caffeine present in CD and MT may contribute to hyperhomocysteinemia (HHcy) and consequent systemic oxidative stress (SOS) and kidney disease (KD). With this in mind, the aim of this work was to answer the following questions: Does obesity and the consumption of caffeine present in mate and cola tea increase the plasma concentration of homocysteine in rats? Does hyperhomocysteinemia contribute to systemic oxidative stress and kidney damage? Thus, a randomized and blind study was carried out with 90 Wistar treated for 120 days with and without CR, decaffeinated or *in natura* CM. The plasma concentration of homocysteine (Hcy) in the obese group was compared to the others and associated with indicators of KD (plasma creatinine, urea and symmetrical dimethylarginine, density, urinary microalbumin and calcium) and SOS (albumin, uric acid, total bilirubin, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and total oxidant concentration). Differences between groups were calculated by ANOVA + Tukey's post-test. The association between HHcy and DR and EOS markers was quantified by Pearson's *r* coefficient, odds ratio and Fisher's test (GraphPad Prism, v.5.1). Caffeine from CM *in natura* caused a slight increase in Hcy. HHcy confirmed in obese rats decreased with consumption of decaffeinated or *in natura* CM. We observed a positive correlation between HHcy, lipid peroxidation and microalbuminuria, with a 6-fold higher relative risk of HHcy occurrence in obese rats and a 3-fold higher relative risk of microalbuminuria in HHcy rats. HHcy occurs in obese rats and is associated with EOS and DR. Decaffeinated CM was more effective than its *in natura* caffeinated form in preventing HHcy, EOS and kidney injury.

Keywords: Homocysteine. Caffeine. Mate herb. Soda drinks. Lipid peroxidation.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA: Capacidade antioxidante;

CD: Chá mate descafeinado;

CI: Chá mate *in natura*;

CM: Chá mate;

CP: Concentração de polifenóis;

DR: Doença renal;

EOS: Estresse oxidativo sistêmico;

Hcy: Homocisteína;

HHcy: Hiperhomocisteinemia;

IL: Índice de Lee;

IMC: Índice de massa corporal;

OR: Razão de probabilidade;

RC: Refrigerante de cola;

SMDA: Dimetilarginina simétrica;

TAS: Capacidade antioxidante total do plasma;

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

TOS: Concentração total de oxidantes;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE	13
2.1	Introdução	13
2.2	Metodologia	14
2.2.1	Seleção das bases de dados	14
2.2.2	Estratégia de busca	15
2.2.3	Critérios de seleção	15
2.2.4	Classificação dos artigos	17
2.2.5	Análise estatística	23
2.3	Resultados e Discussão	23
2.3.1	A obesidade aumenta a concentração plasmática de homocisteína?	23
2.3.2	O consumo da cafeína de diversos alimentos aumenta a concentração plasmática de homocisteína?	38
2.3.3	A hiperhomocisteinemia está associada a doença renal?	40
2.3.4	A hiperhomocisteinemia está associada ao estresse oxidativo sistêmico?	41
2.4	Conclusão	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	Seleção e manutenção dos animais	43
3.2	Delineamento	43
3.3	Dimensionamento amostral, randomização, mascaramento e critérios de exclusão	43
3.4	Obtenção, caracterização físico-química e preparo do chá mate	45
3.5	Índice de Lee e Índice de massa corporal	45
3.6	Colheita e conservação das amostras	45
3.7	Análises laboratoriais	46
3.7.1	Perfil bioquímico plasmático e hematológico	46
3.7.2	Avaliação renal	46
3.7.3	Avaliação do estresse oxidativo sistêmico	47
3.8	Análise estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	A HHcy ocorre em ratos com obesidade e pode ser prevenida pelo consumo de CM	48
4.2	Associação da HHcy com o estresse oxidativo em ratos com obesidade	49

4.3 Avaliação renal de ratos com obesidade e HHcy	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido derivado do metabolismo intracelular da metionina (HOUSE et al., 1998) que desempenha importante papel em diversos processos fisiológicos do organismo (OSTRAKHOVITCH; TABIBZADEH, 2015). Este componente é considerado um oxidante, pois induz a formação de espécies reativas de oxigênio. O aumento da concentração plasmática de Hcy, chamado de hiperhomocisteinemia (HHcy), pode lesionar as células do organismo, induzir apoptose (PERNA et al., 2012) e causar disfunção do endotélio vascular (AUSTIN et al., 2004). Elevação do estresse oxidativo sistêmico (EOS) já foi relatada em ratos com HHcy (LIANG et al., 2018). A principal via de excreção da Hcy plasmática nos ratos são os rins (BOSTOM et al., 1995). Desse modo, acredita-se que a HHcy contribui para o desenvolvimento e progressão da doença renal (DR) (OSTRAKHOVITCH; TABIBZADEH, 2015). Estudos adicionais, no entanto, devem ser realizados para melhor esclarecer a relação entre HHcy, EOS e DR.

A obesidade contribui para o aumento da concentração plasmática de Hcy em humanos (KONUKÖGLÜ et al., 2003), assim como há evidências de que a ingestão contínua de cafeína pode elevar os níveis circulantes deste aminoácido (GRUBBEN et al., 2000; URGERT et al., 200) de forma dose-dependente (JACQUES et al., 2001). Todavia, pouco se conhece sobre os efeitos da cafeína e da obesidade sobre a Hcy em ratos. A obesidade é considerada um dos principais problemas mundiais para a saúde humana e animal (TRUNOVA et al., 2016; BLAND et al., 2009;), sendo que a diminuição do gasto energético devido ao sedentarismo e o consumo elevado de alimentos hipercalóricos são os principais fatores responsáveis por sua maior incidência em humanos (NIELSEN; POPKIN.,2004; SWINBURN et al., 2004).

O refrigerante de cola (RC) representa um importante componente na dieta de cafeteria humana, possuindo um elevado potencial de aumento do ganho de peso em ratos (SAMPEY et al., 2011). A obesidade induzida nesta espécie tem sido considerada adequada, pois reproduz o comportamento nutricional humano (DINIZ et al., 2008). Nosso grupo de pesquisa recentemente comprovou que o consumo de RC por 18 semanas causa obesidade em ratos Wistar e que o chá mate (CM) *in natura* ou descafeinada previne o EOS associado ao acúmulo de gordura (PEREIRA et al., 2021).

Partindo da premissa de que o acúmulo de gordura corporal e a cafeína do CM e RC potencialmente contribuem para HHcy, realizamos um estudo randomizado cego para investigar a hipótese de que a HHcy ocorre na obesidade induzida com RC em ratos e está associada ao EOS e DR. Também investigamos se o CM descafeinado é mais eficaz que a sua forma *in natura* cafeinada na prevenção da HHcy e injúria renal.

2 REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

2.1 Introdução

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido que pode ser convertido em cisteína, um importante componente estrutural de diversos tecidos, pela via hepática de sulfuração dependente da vitamina B6 (NYGARD et al., 1999). O aumento da concentração plasmática de Hcy, chamado de hiperhomocisteinemia (HHcy), pode danificar o endotélio vascular e induzir a criação de trombos a partir de dano oxidativo decorrente da formação de radicais indutores da peroxidação lipídica (JACOBSON, 2000). Este mecanismo está associado ao desenvolvimento de arteriosclerose e aponta a HHcy como um fator de risco importante para doenças cardiovasculares (FOLSON et al., 1998). A HHcy também já foi observada em pacientes com Síndrome Metabólica, obesidade mórbida (HAJER et al., 2007) e consumo crônico de cafeína (GRUBBEN et al., 2000), mesmo que estas relações ainda não estejam bem estabelecidas (VAYA et al., 2012).

A obesidade é um dos principais problemas mundiais de saúde e afeta 30% da população humana nos países desenvolvidos (TRUNOVA et al., 2016). Em outras espécies como a canina essa é a doença nutricional mais comum, acometendo até 41% da população (MCGREEVY et al., 2005; BLAND et al., 2009). O hábito de consumir café está entre os mais difundidos no mundo e, portanto, seus efeitos podem ser altamente relevantes para a saúde pública (MURSU et al., 2005). O ácido clorogênico e, principalmente, a cafeína são os componentes deste alimento responsáveis pelo aumento da Hcy plasmática (VERHOEF et al., 2002; OLTROF et al., 2001).

A cafeína é um antagonista da vitamina B6, capaz de alterar o metabolismo do folato para modular a produção de Hcy (VERHOEF et al., 2000). Outros alimentos bastante consumidos como o chá mate e o refrigerante de cola também possuem cafeína (MATSUMOTO et al., 2009; CAVAZOS et al., 1989). Todavia, não existem relatos consistentes sobre a relação entre o consumo dessas bebidas e a HHcy (RICHARD et al., 2018).

Devido a principal via de eliminação deste aminoácido do organismo, acredita-se que o efeito oxidante da HHcy contribui para o desenvolvimento e progressão da

doença renal (DR) (BOSTON et al., 1995). Estudos adicionais, no entanto, devem ser realizados para melhor esclarecer o mecanismo fisiopatológico dessa alteração (OSTRAKHOVITCH; TABIBZADEH, 2015). A DR apresenta incidência crescente em todo o mundo (GILBERTSON et al., 2005). Sua significativa mortalidade torna importante a identificação adequada dos fatores de risco associados para que medidas efetivas de prevenção possam ser instituídas (LEVI et al., 2014).

Tendo isso em vista, o objetivo desta revisão é identificar as evidências científicas vigentes de modo a responder as seguintes perguntas: A obesidade e o consumo da cafeína presente no chá mate e no refrigerante de cola aumentam a concentração plasmática de homocisteína em ratos? A hiperhomocisteinemia contribui para o estresse oxidativo sistêmico e lesão renal?

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Seleção das bases de dados

Tabela 1 - Número de trabalhos identificados por base de dados em cada estratégia de busca utilizada no portal periódico CAPES.

Hipótese	Estratégia de busca	Período de publicação	Número de trabalhos por base de dados
A obesidade aumenta a Hcy plasmática em ratos?	"rats" AND "obesity" AND "homocysteine"	Últimos 5 anos	Web of Science: 923 Scopus (Elsevier): 808 Pub Med Central: 629 OneFile (GALE): 601
A cafeína de alimentos como o CM e RC aumentam a Hcy plasmática?	"ilex paraguariensis" OR "sugar-sweetened beverages" AND "homocysteine"	Sem restrição	Scopus (Elsevier): 506 Web of Science: 504 OneFile (GALE): 355 Pub Med Central: 343
	"caffeine" AND "homocysteine"	Últimos 10 anos	Scopus (Elsevier): 506 Web of Science: 504 OneFile (GALE): 355 Pub Med Central: 343
A HHcy contribui para EOS e DR em ratos?	"rats" AND "homocysteine" OR "kidney diseases" OR "oxidative stress" OR "SMDA"	Últimos 5 anos	Web of Science: 183.151 Scopus (Elsevier):163.788 Pub Med Central:109.316 One File (GALE):103.367

Fonte: Elaborado pelo autor. CM: chá mate; RC: refrigerante de cola; Hcy: Homocisteína; HHcy: Hiperhomocisteinemia; EOS: Estresse oxidativo sistêmico; DR: Doença renal.

As bases de dados utilizadas nesta revisão sistemática foram identificadas a partir de busca avançada no portal periódico CAPES, sendo selecionadas aquelas

com maior número de trabalhos relacionados ao tema. Os filtros utilizados foram estudos revisados por pares e publicados na língua inglesa. Os operadores booleanos AND e OR foram empregados para combinar os descritores, sendo que estes e o período de publicação variaram de acordo com a hipótese investigada (Tabela 1).

Para todas as estratégias buscadas, as bases de dados que apresentaram maior número de artigos retornados foram Web of Science, Scopus (Elsevier), OneFile (GALE) e Pub Med Central (Tabela 1).

2.2.2 Estratégia de busca

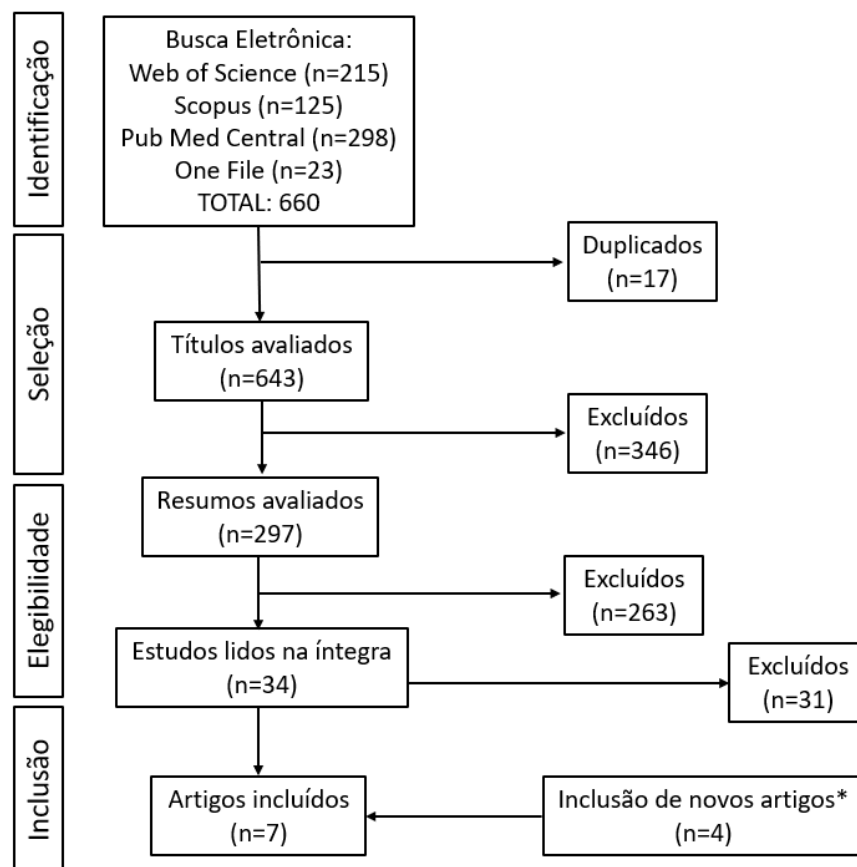
Em uma reunião de consenso, dois revisores (A e B) estabeleceram três perguntas estruturadas no formato PICO (situação, intervenção e desfecho) para seleção dos melhores descritores, sintaxe e estratégia de busca a serem empregadas em cada um dos quatro bancos de dados previamente selecionados. Uma estratégia de busca geral e adaptável às características de cada base de dados foi utilizada para identificar o maior número de estudos envolvendo HHcy e suas relações com obesidade, cafeína, EOS e DR. A pesquisa bibliográfica foi realizada às cegas no período de janeiro a novembro de 2021 por dois revisores (A e B). Devido a variação no número de artigos retornados, as estratégias de busca empregadas foram diferentes para cada hipótese e base de dados utilizadas (Tabelas 2 a 4).

2.2.3 Critérios de seleção

Toda a literatura localizada pela dupla de revisores foi exportada para o programa computacional rayyan.qcri.org (OUZZANI et al., 2016) com a finalidade de excluir as duplicatas e aplicar os critérios de inclusão e exclusão, tendo inicialmente como base o título e o resumo das publicações. De maneira geral, os critérios iniciais de inclusão consistiram em: artigos revisados por pares; do tipo ensaio clínico randomizado; publicados na língua inglesa; com tempo de publicação de até 5 a 20 anos (variando de acordo com a hipótese e base de dados (Tabelas 2 a 4)); realizados em ratos ou humanos; e com metodologia analítica e objetivos compatíveis com o intuito da revisão. Artigos de revisão, com informações insuficientes para pesquisa ou seleção amostral inadequada foram excluídos. Um terceiro revisor (C) participou de

todas as etapas supracitadas para conferir a aplicação dos critérios de seleção e resolver os conflitos quanto às inclusões e exclusões de trabalhos. Os números de artigos obtidos em cada etapa do processo de seleção de cada hipótese estão expostos nas Figura 1 a 3, de acordo com o sistema PRISMA (MOHER et al., 2009).

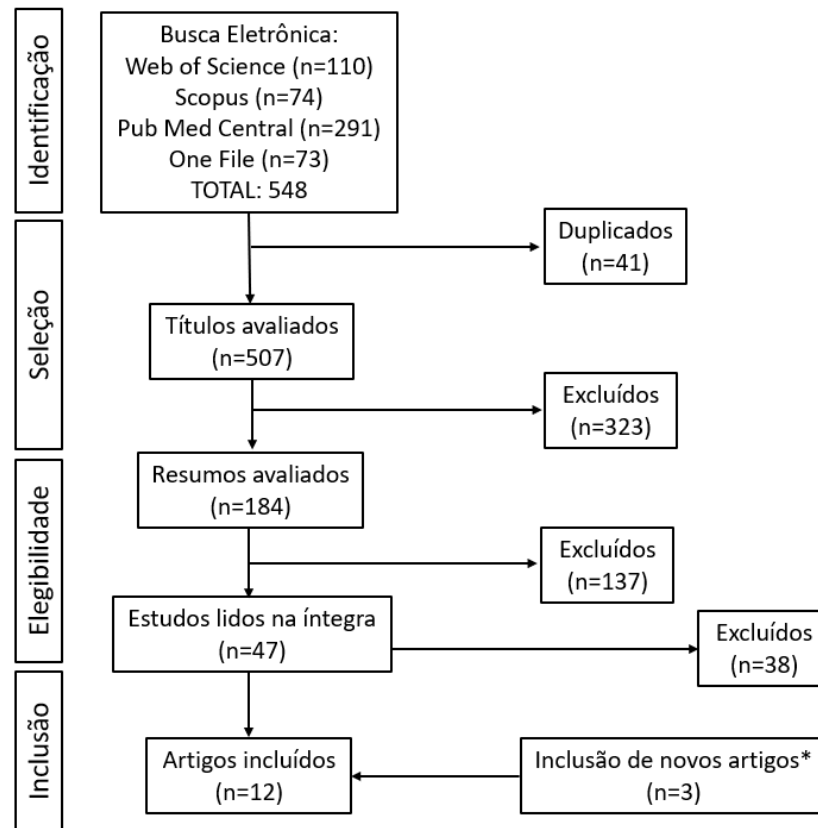
Figura 1 - Fluxograma do processo de seleção dos estudos incluídos na Revisão Sistemática referentes à relação entre a obesidade e a homocisteína plasmática.



Fonte: Elaborado pelo autor

De forma a obter uma maior quantidade de trabalhos em hipóteses onde o número final de estudos retornados foi pequeno, realizamos a leitura das referências bibliográficas dos artigos já selecionados e, a partir da avaliação dos textos completos, adicionamos ao montante final àqueles com objetivos e metodologia considerados adequados. Nesta etapa os critérios de seleção em perguntas com poucos trabalhos randomizados foram modificados para incluir também estudos transversais, retrospectivos e experimentais não randomizados.

Figura 2 - Fluxograma do processo de seleção dos estudos incluídos na Revisão Sistemática referentes à relação entre alimentos com cafeína, como o refrigerante de cola e o chá mate, e a homocisteína plasmática.



Fonte: Elaborado pelo autor

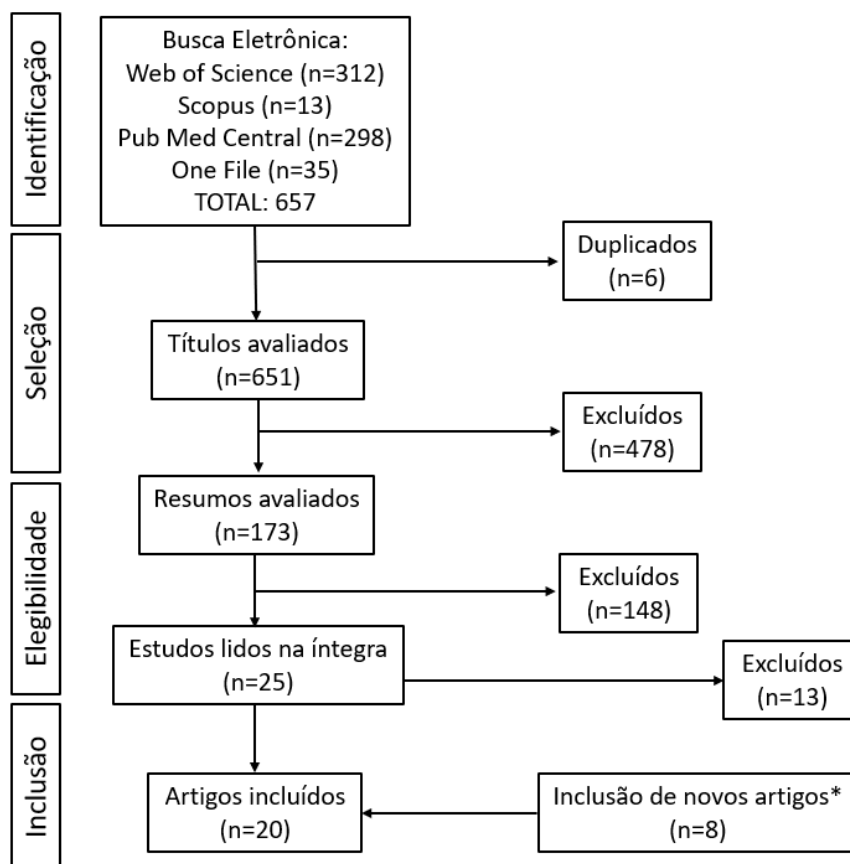
2.2.4 Classificação dos artigos

O nível de evidência científica dos estudos selecionados foi quantificado segundo a classificação de Oxford Centre for Evidence-Based Medicine (PHILLIPS et al., 2001). O escore (0-5) de qualidade (JADAD et al., 1996) foi calculado em todos os estudos experimentais selecionados, sendo considerados de baixa qualidade aqueles com valores menores que 3.

O poder do teste foi mensurado a partir do Open Epi 3.1 (DEAN et al., 2006) apenas nos trabalhos que disponibilizaram resultados de média e desvio padrão das principais variáveis estudadas. Conflitos gerados por discordâncias na classificação dos artigos também foram conferidos e solucionados pelo revisor C.

As informações e variáveis relevantes a serem analisadas dos artigos selecionados foram tabuladas em uma planilha Excel padronizada. Os dados extraídos foram os seguintes: primeiro autor e ano de publicação, tipo de estudo, nota na escala de Jadad, nível de evidência, poder do teste, tamanho amostral, tipo de população, dieta de base ou condição inicial, intervenção ou fator de exposição, duração e principais resultados.

Figura 3. Fluxograma do processo de seleção dos estudos incluídos na Revisão Sistemática referentes à relação entre hiperhomocisteinemia, estresse oxidativo sistêmico e doença renal.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2 - Estratégias de busca empregadas em cada base de dado para investigar a relação entre obesidade e homocisteína plasmática em ratos.

Base de dados	Web of Science	Scopus (Elsevier)	One File (GALE)	Pub Med Central
Estratégia de busca	(TS=(rats) AND TS=(homocysteine) OR TS=(hyperhomocysteinemia) AND TS=(obesity) OR TS=(obese) AND TS=("random allocation")). Índices: SCI-EXPANDED.	(TITLE-ABS-KEY (rats) OR TITLE-ABS-KEY (mice) AND TITLE-ABS-KEY (homocysteine) OR TITLE-ABS-KEY (hyperhomocysteinemia) AND TITLE-ABS-KEY (obesity) OR TITLE-ABS-KEY (obese)	Palavra-chave: "rats"AND Palavra-chave: "homocysteine"OR Palavra-chave: "Hyperhomocysteinemia"AND Palavra-chave: "Obesity" AND Documento completo: "randomized"	(((((rats[MeSH Terms]) OR (rats[Text Word]))) AND (homocysteine[MeSH Terms])) OR (homocysteine[Text Word])) AND (obesity[MeSH Terms]) OR (obesity[Text Word])) AND ("random allocation"[MeSH Terms]) OR ("random allocation"[Text Word]))
Critérios de inclusão	Revisão por pares; Ensaios clínicos randomizados; Últimos 5 anos. Categorias: Metabolismo Endócrino, Medicina Interna Geral e Ciências Veterinárias	Revisão por pares; Sem restrição quanto ao tipo de estudo; Últimos 20 anos.	Revisão por pares; Ensaios clínicos randomizados; Últimos 5 anos.	Revisão por pares; Ensaios clínicos randomizados; Últimos 5 anos.

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3 - Estratégias de busca empregadas em cada base de dado para investigar se o consumo de alimentos com cafeína, como o refrigerante de cola e o chá mate, aumentam a concentração plasmática de homocisteína. Para esta hipótese foram utilizadas duas estratégias por base de dados.

(Continua)

Base de dados	Web of Science	Scopus (Elsevier)	One File (GALE)	Pub Med Central
Estratégia de busca	(TS=(rats) AND TS=("Ilex paraguariensis") OR TS=("sugar-sweetened beverages") AND TS=(homocysteine)) AND TIPOS DE DOCUMENTO: (Article) Índices=SCI-EXPANDED	(TITLE-ABS-KEY (rats) OR TITLE-ABS-KEY (mice) OR TITLE-ABS-KEY (humans) OR TITLE-ABS-KEY (rat) OR TITLE-ABS-KEY (human) OR TITLE-ABS-KEY ("rattus norvegicus") AND TITLE-ABS-KEY ("Ilex paraguariensis") OR TITLE-ABS-KEY ("yerba mate") OR TITLE-ABS-KEY (decaffeinated) OR TITLE-ABS-KEY ("sugar-sweetened beverages") OR TITLE-ABS-KEY ("sugar-sweetened soft drinks") AND TITLE-ABS-KEY (homocysteine) OR TITLE-ABS-KEY (hyperhomocysteinemia))	Palavra-chave: rats AND Palavra-chave: "Ilex paraguariensis" OR Palavra-chave: "sugar sweetened beverages" AND Palavra-chave: "Homocysteine" OR Palavra-chave: "Hyperhomocysteinemia" AND Documento completo: "randomized"	(((((rats[MeSH Terms]) OR (rats[Text Word])) OR (mice[MeSH Terms]) OR (mice[Text Word])) AND ("Ilex paraguariensis"[MeSH Terms]) OR ("Ilex paraguariensis"[Text Word])) OR ("yerba mate"[Text Word])) OR ("sugar-sweetened beverages"[MeSH Terms]) OR ("sugar-sweetened beverages"[Text Word])) OR ("sugar-sweetened soft drink"[Text Word])) AND (homocysteine[MeSH Terms]) OR (homocysteine[Text Word]))
Critérios de inclusão	Revisão por pares; Ensaio clínico randomizado; Últimos 20 anos.	Revisão por pares; Sem restrição quanto ao tipo de estudo; Últimos 20 anos.	Revisão por pares; Ensaio clínico randomizado; Últimos 5 anos.	Revisão por pares; Ensaio clínico randomizado; Últimos 5 anos.

Tabela 3 - Estratégias de busca empregadas em cada base de dado para investigar se o consumo de alimentos com cafeína, como o refrigerante de cola e o chá mate, aumentam a concentração plasmática de homocisteína. Para esta hipótese foram utilizadas duas estratégias por base de dados.

(Concluído)

Base de dados	Web of Science	Scopus (Elsevier)	One File (GALE)	Pub Med Central
Estratégia de busca	(TS=(rats) OR TS=(mice) OR TS=(humans) OR TS=(rat) OR TS=(human) OR TS=("rattus norvegicus")) AND (TS=(caffeine) OR TS=("1,3,7-trimethylxanthine") OR TS=(vivarin) OR TS=(caffedrine)) AND (TS=(homocysteine) OR TS=(hyperhomocysteinemia)) Índices: SCI-EXPANDED, CPCI-S.	TITLE-ABS-KEY (rats) OR TITLE-ABS-KEY (mice) OR TITLE-ABS-KEY (humans) OR TITLE-ABS-KEY (rat) OR TITLE-ABS-KEY (human) OR TITLE-ABS-KEY ("rattus norvegicus") AND TITLE-ABS-KEY (caffeine) OR TITLE-ABS-KEY ("1,3,7-trimethylxanthine") OR TITLE-ABS-KEY (vivarin) OR TITLE-ABS-KEY (caffedrine) AND TITLE-ABS-KEY (homocysteine) OR TITLE-ABS-KEY (hyperhomocysteinemia))	Pesquisa avançada: Palavra-chave: "rats" AND Palavra-chave: "caffeine" AND Palavra-chave: "homocysteine" OR Palavra-chave: "Hyperhomocysteinemia" AND Documento completo: "randomized"	("rats"[MeSH Terms] OR "rats"[Text Word] OR "mice"[MeSH Terms] OR "mice"[Text Word] OR "humans"[MeSH Terms] OR "humans"[Text Word] OR "rat"[Text Word] OR "human"[Text Word] OR "rattus"[Text Word] OR "rattus norvegicus"[Text Word]) AND ("caffeine"[MeSH Terms] OR "caffeine"[Text Word] OR "1,3,7-trimethylxanthine"[Text Word] OR "vivarin" OR "caffedrine"[Text Word]) AND ("homocysteine"[MeSH Terms] OR "homocysteine"[Text Word])
Crítérios de inclusão	Revisão por pares; Ensaios clínicos randomizados; Sem restrição quanto ao período de publicação.	Revisão por pares; Ensaios clínicos randomizados; Últimos 20 anos.	Revisão por pares; Ensaios clínicos randomizados; Últimos 5 anos.	Revisão por pares; Ensaios clínicos randomizados; Últimos 20 anos.

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4 - Estratégias de busca empregadas em cada base de dado para investigar a relação entre hiperhomocisteinemia, estresse oxidativo sistêmico e doença renal.

Base de dados	Web of Science	Scopus (Elsevier)	One File (GALE)	Pub Med Central
Estratégia de busca	((TS=(rats) AND TS=(homocysteine) AND TS=("kidney diseases") OR TS=("symmetric dimethylarginine") OR TS=("oxidative stress") AND TS=(randomized)) Índices: SCI-EXPANDED.	TITLE-ABS-KEY (rats) AND TITLE-ABS-KEY (homocysteine) OR TITLE-ABS-KEY (hyperhomocysteinemia) AND TITLE-ABS-KEY ("renal insufficiency") OR TITLE-ABS-KEY ("kidney diseases") OR TITLE-ABS-KEY ("symmetric dimethylarginine") OR TITLE-ABS-KEY ("oxidative stress") OR TITLE-ABS-KEY ("oxidative damage") AND TITLE-ABS-KEY (randomized))	Palavra-chave: "rats"AND Palavra-chave: "Homocysteine" AND Palavra-chave: "kidney disease" OR Palavra-chave: "oxidative damage" AND Palavra-chave: "randomized" AND Tipo de documento: "Article"	((((((((((((((rats[MeSH Terms]) OR (rats[Text Word])) OR (mice[MeSH Terms])) OR (mice[Text Word])) AND (homocysteine[MeSH Terms])) OR (homocysteine[Text Word])) AND ("kidney diseases"[MeSH Terms])) OR ("kidney diseases"[Text Word])) OR ("renal insufficiency"[MeSH Terms])) OR ("renal insufficiency"[Text Word])) OR ("symmetric dimethylarginine"[MeSH Terms])) OR ("symmetric dimethylarginine"[Text Word])) OR ("oxidative stress"[MeSH Terms])) OR ("oxidative stress"[Text Word])) AND ("random allocation"[MeSH Terms])) OR ("random allocation"[Text Word]))
Critérios de inclusão	Revisão por pares; Ensaio clínico randomizado; Últimos 5 anos; Categorias: Medicina Experimental e Ciências Veterinárias	Revisão por pares; Ensaio clínico randomizado; Sem restrição quanto ao período de publicação.	Revisão por pares; Ensaio clínico randomizado; Últimos 5 anos.	Revisão por pares; Ensaio clínico randomizado; Últimos 5 anos.

Fonte: Elaborado pelo autor

2.2.5 Análise estatística

A metanálise dos dados foi realizada com auxílio do programa Review Manager (RevMan) versão 5.4.1 (COCHRANE COLLABORATION, 2020). Para tal, os resultados dos artigos selecionados foram considerados contínuos e expressos em média e desvio-padrão. A diferença de média ponderada foi calculada com intervalo de confiança de 95%, sendo 16/39 trabalhos excluídos desta etapa por não informarem os valores médios de homocisteína plasmática do grupo onde houve intervenção.

O modelo de análise utilizado foi o de efeito variável, que considera a existência de variações metodológicas entre os estudos empregados. Para a representação gráfica da metanálise foi atribuído o diagrama “forest plot” (gráfico em floresta). As inconsistências entre os trabalhos selecionados foram quantificadas pelo teste de heterogeneidade $I^2 = [(Q - df)/Q] \times 100\%$, sendo Q o qui-quadrado e df (degree of freedom) o grau de liberdade. A heterogeneidade foi classificada em não importante (0% - 40%); moderada (30% - 60%); substancial (50% - 90%) e considerável (75% - 100%) (Cochrane Collaboration, 2020).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 A obesidade aumenta a concentração plasmática de homocisteína?

Um total de 7 trabalhos foi selecionado com o intuito de avaliar se a concentração plasmática de homocisteína (Hcy) é maior em pacientes obesos ou com maior ganho de peso (Tabela 5). Durante a pesquisa bibliográfica notamos uma lacuna de conhecimento em relação a este tópico em ratos, sendo encontrados apenas 1 artigo nesta espécie que fosse adequado à metodologia proposta. A espécie predominantemente utilizada foi a humana (58,1%), seguida de camundongos (42,9%). Quanto ao tipo de estudo, houve predomínio de ensaios clínicos randomizados (28,6%) e estudos transversais (28,6%). A mesma porcentagem de trabalhos foi encontrada entre os tipos de delineamento coorte, caso controle e ensaio clínico não randomizado (14,3%). A maioria dos artigos utilizaram o índice de massa corporal (IMC) (48,9%) e a indução com dietas hipercalóricas (28,6%) como critérios de inclusão de pacientes no grupo considerado obeso.

Tabela 5. Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre obesidade e homocisteína plasmática.

(Continua)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base ou condição inicial	Intervenção ou fator de exposição	Duração	Resultados
Bieżanowska-Kopeć e Leszczyńska, 2017	Ensaio clínico randomizado	0	2B	74,58%	Ratos wistar machos adultos	42	Dieta contendo 32g/kg de metionina	5 grupos: dieta contendo 2, 4, 8, 18 ou 28 g de ácido fólico	52 dias	Grupo obeso ↑ Hcy ↑ Colesterol Ø Triglicerídeos Grupo tratado ↓ Hcy ↓ Colesterol Ø Triglicerídeos
Yun et al., 2013	Ensaio clínico randomizado	0	2B	99,9%	Camundongos machos adultos	20	Ração comercial e água <i>ad libitum</i>	Dieta hipercalórica rica em gordura do leite (21%) e açúcar (34.5%)	12 semanas	Grupo tratado ↑ Hcy plasmática ↓ Hcy hepática ↑ Peso corporal ↑ Triglicerídeos Ø Peroxidação lipídica
Vayá et al., 2012	Estudo transversal	DNP	2C	82,58%	Homens e mulheres adultos	132	Dieta convencional, não descreve restrições	Pacientes selecionados com obesidade mórbida (IMC ≥ 40 kg/m ²)	<24 horas*	Grupo obeso ↑ Hcy plasmática ↑ Leptina ↑ Triglicerídeos ↑ Creatinina ↓ Colesterol HDL
Teng et al., 2011	Ensaio clínico	0	2C	DNP	Camundongos machos adultos	36	Ração comercial contendo 1.1 g/kg de colina	Deficiência no gene Betaína-Homocisteína S-Metiltransferase	5 a 14 semanas	↓ Hcy ↓ Peso corporal
Vayá et al., 2010	Estudo caso-controle	DNP	3B	100%	Homens e mulheres adultos	276	Pacientes com sinais de infarto cerebral critogênico	Pacientes também obesos: IMC ≥ 40 kg/m ²	<24 horas*	Grupo obeso ↑ Hcy plasmática ↑ Creatinina ↑ IMC

Tabela 5 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre obesidade e homocisteína plasmática.

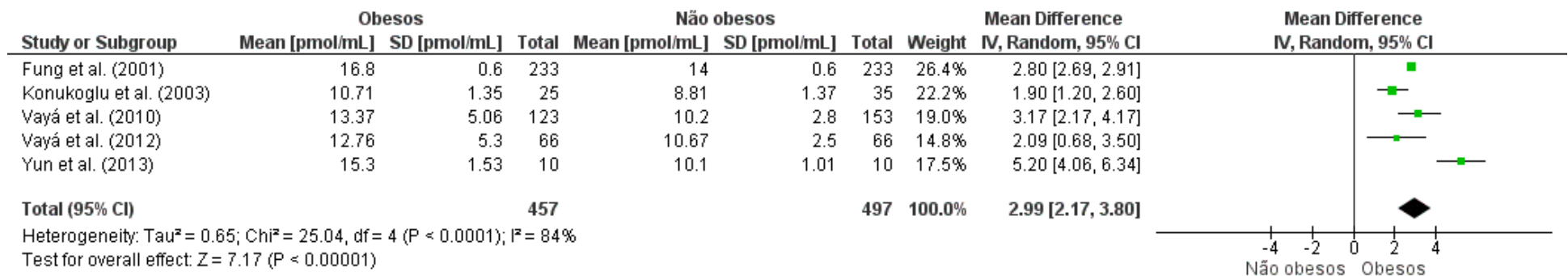
(Concluído)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base ou condição inicial	Intervenção ou fator de exposição	Duração	Resultados
Konukoglu et al., 2003	Estudo transversal	DNP	2C	100%	Homens e mulheres adultos	60	Não descreve restrições	Pacientes com IMC > 27 kg/m ²	<24 horas*	Grupo obeso ↑ Hcy plasmática ↑ Peroxidação lipídica
Fung et al., 2001	Estudo de Coorte Prospectivo	DNP	2B	100%	Homens adultos	466	-	Pacientes com histórico de sedentarismo e dieta hipercalórica	<24 horas*	↑ Hcy plasmática ↑ IMC

Fonte: Elaborado pelo autor.

N=7; Hcy: Homocisteína; IMC: Índice de massa corporal; DNP: Dados não disponíveis; * O trabalho não forneceu acompanhamento dos pacientes após estabelecer a intervenção. Ø: Ausência de alterações.

Figura 4 - Gráfico de folhas da metanálise dos dados referentes à relação entre obesidade e homocisteína (Hcy) plasmática. Para cada artigo, as linhas horizontais representam o intervalo de confiança e o quadrado o tamanho amostral. Linhas e losango deslocados à direita indicam a aceitação da hipótese. A tabela demonstra média, desvio padrão (SD) e tamanho amostral dos grupos obeso e não obeso de cada trabalho avaliado, além do grau de heterogeneidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre a homocisteína plasmática e o consumo da cafeína de diversos alimentos.

(Continua)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Alzoubi et al., 2018	Ensaio clínico randomizado	0	2B	DNP	Ratos Wistar machos adultos	48	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	G2: 1.7g/ kg/ dia de L-metionina; G3: 0.3 g/L de cafeína; G4: ambos os tratamentos	4 semanas	Grupo 2: ↑ Homocisteína ↓ GPx Grupos 3 e 4: Ø Homocisteína Ø GPx
Richard et al., 2018	Estudo transversal	NC	2C	DNP	Homens e mulheres adultos e hipertensos (pressão sistólica ≥140 mmHg)	473	DNP	Consumo regular de chá verde (G1) ou preto (G2) > 125 g/erva/mês nos últimos 6 a 15 anos	<24 horas*	Grupo 1 ↑ OR HHcy Grupo 2 ↑↑ OR HHcy
Hodgson et al., 2007	Ensaio clínico randomizado	2	1B	100%	Homens e mulheres adultos não obesos (IMC < 36/KG m ²)	20	Dieta convencional, não descreve restrições	G1: Água e jejum alimentar; G2: 3 copos de chá preto (250 mL, 150 mg cafeína/dia) e jejum alimentar; G3: Água e refeição; G4: 3 copos de chá preto e refeição.	As análises foram realizadas no momento zero e 3 horas e meia após o consumo	Grupos 1 e 3 Ø Homocisteína Grupo 2 Discreto ↑ Homocisteína Grupo 4 Ø Homocisteína

Tabela 6 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre a homocisteína plasmática e o consumo da cafeína de diversos alimentos.

(Continuação)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Hodgson et al., 2006	Estudo transversal	NC	2C	DNP	Mulheres adultas	232	DNP	Pacientes com histórico de ingestão ≥ 250 mL/dia de chá verde ou preto	<24 horas*	Ø Homocisteína
Sakamoto et al., 2005	Ensaio clínico randomizado	0	2B	100%	Ratos Wistar machos adultos	48	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	G2: Dieta com 104.1 ± 17.9 mg/dl de cafeína; G3: Dieta com 122.5 ± 10.4 mg/dl de cafeína.	20 semanas	Grupo 2: Ø Homocisteína Grupo 3: Discreto $\uparrow$ Homocisteína
Mursu et al., 2004	Ensaio clínico randomizado	0	2B	31,11%	Homens adultos	43	Dieta convencional, não descreve restrições	G1: sem café; G2: 3 copos (450 mL); G3: 6 copos (900 mL);	3 semanas	Grupo 2: Ø Homocisteína Grupo 3: Ø peroxidação lipídica Discreto $\uparrow$ Homocisteína
Hodgson et al., 2003	Ensaio clínico randomizado	0	2B	9,65%	Homens e mulheres adultos	22	Restrição de alimentos contendo cafeína (chás, café, cola, chocolate)	1250 mL chá preto/dia (5 copos com 2 g de folha de chá em 250 mL de água quente)	4 semanas	Grupo 1: Ø Homocisteína Grupo 2: Ø Homocisteína

Tabela 6 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre a homocisteína plasmática e o consumo da cafeína de diversos alimentos.

(Concluído)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Strandhagen et al., 2003	Ensaio clínico randomizado	1	2B	38,49%	Homens e mulheres adultos	120	Dieta convencional, sem incluir alimentos contendo cafeína em fases de abstinência	F1: Abstinência de café; F2: 600 ml de café + 200 mg ácido fólico/dia; F3: Abstinência de café; F4: 600 ml de café/dia + 40 mg piridoxina/dia.	4 semanas por fase	Fase 1: ↓ Homocisteína Início fase 2: ↑ Homocisteína Final fase 2 e fase 3: ↓ Homocisteína Fase 1: ↑ Homocisteína
Verhoef et al., 2002	Ensaio clínico randomizado	1	2B	32,56%	Homens e mulheres adultos	48	Dieta convencional, não descreve restrições	Cápsulas de 870 mg de cafeína/dia	2 semanas	Grupo tratado: ↑ Homocisteína
Christensen et al., 2001	Ensaio clínico randomizado	1	1B	90%	Homens e mulheres adultos	191	Pacientes com histórico de ingestão regular de cafeína.	G1: Jejum; G2: 1 a 3 copos de café/dia (175-525 mL); G3: 4 copos/dia (>700 mL)	6 semanas	Grupo 1: ↓ Homocisteína ↓ Colesterol Grupos 2 e 3: Ø Homocisteína Ø Colesterol
Grubben et al., 2000	Ensaio clínico randomizado	0	2B	27,17%	Homens e mulheres adultos	64	Dieta convencional, não descreve restrições	1 L/dia de café não filtrado	2 semanas	Grupo tratado: ↑ Homocisteína
Urgert et al., 2000	Ensaio clínico randomizado	0	2B	35,47%	Homens e mulheres adultos	36	Dieta convencional, não descreve restrições	1 L/dia de café filtrado (70 g)	4 semanas	Grupo tratado: ↑ Homocisteína

Fonte: Elaborado pelo autor

N=12; GPx: glutathione peroxidase; SOD: superóxido dismutase; OR HHcy: risco relativo de desenvolvimento de hiperhomocisteinemia; NC: Não convém; DNP: Dados não disponíveis; * o trabalho não acompanhou os pacientes após a intervenção; Ø: Ausência de alterações.

Tabela 7 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre hiperhomocisteinemia e doença renal.

(Continua)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Gao et al., 2020a	Ensaio clínico randomizado	0	2B	DNP	Ratos Wistar machos adultos	32	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	G1: Controle; G2: HHcy induzida por 10 mL/dia de homocisteína diluída a 2%; G3: hipertensos; G4: HHcy + hipertensos.	12 semanas	Grupo 2 ↑ Homocisteína Grupos 2 e 3 ↑ Peroxidação lipídica ↑ Microalbuminúria ↓ SOD ↓ TFG Grupo 4 ↑ Homocisteína ↑↑ Peroxidação lipídica ↑↑ Microalbuminúria ↓↓ SOD ↓↓ TFG
Gao et al., 2020b	Ensaio clínico randomizado	0	2B	100%	Ratos Wistar machos adultos com hipertensão espontânea	32	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	G1: HHcy induzida por 10 mL/dia de homocisteína diluída a 2%; G2: HHcy + 0,4 mg/kg/dia de ácido fólico.	12 semanas	Grupo 1 ↑ Homocisteína ↑ Peroxidação lipídica ↑ Microalbuminúria ↓ TFG Grupo 2 ↓ Homocisteína ↓ Peroxidação lipídica ↓ Microalbuminúria ↑ TFG

Tabela 7- Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre hiperhomocisteinemia e doença renal.

(Continuação)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Zhang et al., 2020	Ensaio clínico randomizado	0	2B	DNP	Ratos machos adultos	15	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	HHcy induzida por dieta contendo 2,5% de metionina	24 semanas	↑ Proteínas de envelhecimento renal (p53, p21 e p16) ↑ Ureia ↓ TFG ↑ Estresse nitrativo
Kuang et al., 2017	Caso-controle	NC	3B	100%	Homens e mulheres adultos	450	Pacientes hipertensos (pressão sistólica > 130 mmHg)	Pacientes com microalbuminúria (RMCU entre 30 a 300 µg/mg).	<24 horas*	↑ Homocisteína ↑ Creatinina - Correlação positiva entre homocisteína e RMCU
Ye et al., 2016	Estudo transversal	NC	2C	100%	Homens e mulheres adultos	1048	Pacientes com histórico de doença renal crônica (TFG < 60 mL/min/1.73 m ² por mais de 3 meses)	G1: Controle; G2: Pacientes com HHcy (>15 µmol/L);	<24 horas*	↓ TFG ↑ Creatinina ↑ Ureia ↑ Proteinúria
Cohen et al., 2015	Estudo transversal	NC	2C	DNP	Homens e mulheres adultos	16477	Pacientes com histórico de hiperuricemia (> 7,0 mg/mL)	G1: Controle; G2: Pacientes com HHcy (>15 µmol/L);	<24 horas*	Grupo 2 ↓ TFG ↑ Ácido úrico - Correlação positiva entre HHcy e hiperuricemia

Tabela 7 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre hiperhomocisteinemia e doença renal.

(Continuação)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Magné et al., 2015	Ensaio clínico	0	2C	100%	Ratos Wistar machos adultos	16	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Bólus de 3g/kg de metionina	6 horas	↑ Homocisteína ↓ SMDA
Yun et al., 2015	Caso-controle	NC	3B	99,4%	Homens e mulheres adultos	379	Pacientes hipertensos (pressão sistólica > 140 mmHg)	G1: Sem doença renal (RMCU <30g/g); G2: Estágio inicial de doença renal (RMCU entre 30 a 300 g/g).	<24 horas*	Grupo 2 ↑ Homocisteína ↓ TFG - Correlação positiva entre homocisteína e RMCU
Wang et al., 2015	Estudo transversal	NC	2C	DNP	Homens e mulheres adultos	110	Pacientes hipertensos (pressão sistólica > 140 mmHg)	Pacientes com HHcy (>10 µmol/L);	<24 horas*	↑ Creatinina ↑ Ureia ↑ Ácido úrico
Levi et al., 2014	Estudo Coorte	NC	2B	100%	Homens e mulheres adultos	3602	Pacientes sem histórico de doença renal (TFG > 60 ml/min/ 1.37 m ²)	G1: Controle; G2: Pacientes com HHcy (>15 µmol/L).	<24 horas*	Grupo 2 ↓ TFG - Correlação positiva entre HHcy e risco relativo de DRC

Tabela 7 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre hiperhomocisteinemia e doença renal.

(Concluído)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Wang et al., 2008	Estudo transversal	NC	2C	DNP	Homens e mulheres adultos	408	-	G1: Controle; G2: Histórico de 1 doença vascular; G3: Histórico de 2 ou 3 doenças vasculares.	<24 horas*	- Correlação positiva entre homocisteína e creatinina; - Ausência de correlação entre homocisteína e SMDA; - Correlação negativa entre homocisteína e TFG.
Li et al., 2002	Ensaio clínico	0	2C	100%	Ratos adultos	14	G1 e 2: Dieta pobre em sódio (0,4%) G3 e 4: Dieta rica em sódio (8%)	G2 e 4: 1 g/kg/dia de metionina para indução de HHcy	6 semanas	Grupo 1 Ø Homocisteína Ø Proteinúria Grupos 2 e 3 ↑ Homocisteína ↑ Proteinúria Grupo 4 ↑↑ Homocisteína ↑↑ Proteinúria

Fonte: Elaborado pelo autor

N=12; SOD: Superóxido dismutase (SOD); TFG: Taxa de filtração glomerular; SMDA: Dimetil arginina simétrica; TFEB: Fator de transcrição genético EB; RMCU: Relação microalbumina/creatinina urinária; DRC: Doença renal crônica; HHcy: hiperhomocisteinemia; NC: Não convém; DNP: Dados não disponíveis; * o trabalho não forneceu acompanhamento dos pacientes após estabelecer a intervenção; Ø: Ausência de alterações.

Tabela 8 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre hiperhomocisteinemia e estresse oxidativo sistêmico.

(Continua)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Oliveira et al., 2019	Ensaio clínico randomizado	3	1B	100%	Homens e mulheres adultos	49	Pacientes positivos para HIV	Programa de exercício combinado	16 semanas	↓ Homocisteína ↓ Peroxidação lipídica
Liang et al., 2018	Ensaio clínico randomizado	0	2B	DNP	Ratos machos adultos	60	Uremia induzida por 250/mg/ kg/dia de adenina intragástrica nos primeiros 28 dias	HHcy induzida por 0.06 µmol/ g/dia de homocisteína subcutânea	54 dias	Grupo tratado: ↑ Peroxidação lipídica ↑ TNF-α ↑ IL-6 ↑ Permeabilidade e lesão intestinal
Cui et al., 2017	Ensaio clínico randomizado	0	2B	DNP	Ratos machos adultos	28	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	G1: Controle; G2: Dieta hipercalórica (DH) e deficiente de ácido fólico (0.2 mg/kg) G3: DH com 2.1 mg/kg de ácido fólico G4: DH suplementada com ácido fólico (4.2 mg/kg).	12 semanas	Grupo 2 ↑ Homocisteína ↑ Peroxidação lipídica ↓ TAC Grupos 3 e 4 ↓ Homocisteína Ø Peroxidação lipídica ↑ TAC

Tabela 8 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre hiperhomocisteinemia e estresse oxidativo sistêmico.

(Continuação)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Huo et al., 2017	Ensaio clínico randomizado	0	2B	100%	Ratos machos adultos	12	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	Dieta rica em metionina (3%)	48 semanas	Grupo tratado: ↑ Homocisteína ↑ Peroxidação lipídica
Boyacioglu et al., 2014	Ensaio clínico randomizado	0	2B	100%	Ratos Wistar machos adultos	24	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	G1: Controle; G2: HHcy induzida por 1g/kg/dia de metionina; G3: HHcy + vitamina C (150 mg/kg/dia)	28 dias	Grupo 2 ↑ Homocisteína ↑ Peroxidação lipídica ↓ TAC Grupo 3 ↑ Homocisteína ↓ Peroxidação lipídica ↑ TAC
Kolling et al., 2011	Ensaio clínico	0	2C	DNP	Ratos Wistar adultos de ambos os sexos	21	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	G1: Controle; G2: 0.3–0.6 µmol/g/dia de homocisteína subcutânea; G3: homocisteína + 0.011 µmol/g/dia de folato.	28 dias	Grupo 2 ↓ TAC ↑ Homocisteína ↑ Peroxidação lipídica Grupo 3 Ø TAC ↓ Homocisteína Ø Peroxidação lipídica

Tabela 8 - Características dos estudos incluídos na Revisão Sistemática para investigar a relação entre hiperhomocisteinemia e estresse oxidativo sistêmico.

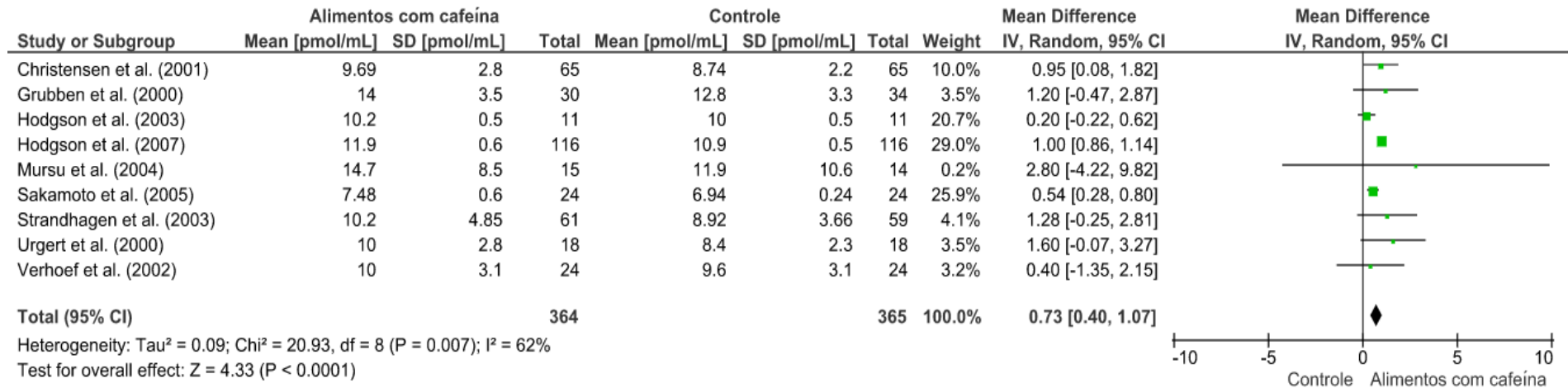
(Concluído)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Pontos Escala de Jadad	Nível de evidência	Poder do teste	População	Tamanho Amostral	Dieta de base	Intervenção	Duração	Resultados
Matté et al., 2009	Ensaio clínico	0	2C	99,53%	Ratos Wistar adultos	96	Ração convencional e água <i>ad libitum</i>	HHcy induzida por 0.6 a 1.2 $\mu\text{mol/g/dia}$ de homocisteína subcutânea	3 semanas	↑ Homocisteína ↑ Peroxidação lipídica ↓ TAC
Racek et al., 2005	Ensaio clínico randomizado	0	2B	96,75%	Homens e mulheres adultos	100	Pacientes com histórico Hcy > 15 $\mu\text{mol/L}$	G1: folato 5 mg/dia; G2: vitamina E 500 mg/dia; G3: vitamina E + folato	2 meses	Grupos 1, 2 e 3: ↓ Homocisteína ↓ Peroxidação lipídica ↑ TAC

Fonte: Elaborado pelo autor

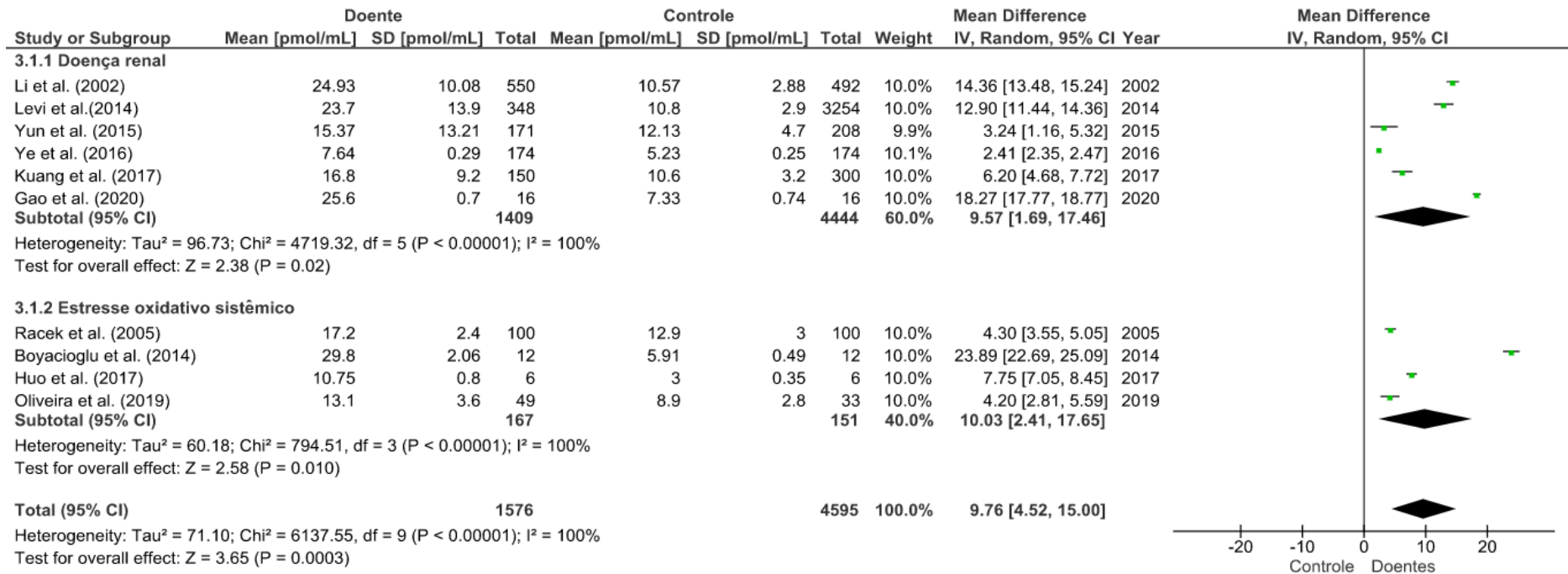
N=8; IL-6: Interleucina-6; TNF- α : Fator de necrose tumoral; TAC: Capacidade antioxidante total; HHcy: hiperhomocisteinemia; NC: Não convém; DNP: Dados não disponíveis; Ø: Ausência de alterações.

Figura 5. Gráfico de folhas da metanálise dos dados referentes à relação entre a homocisteína (Hcy) plasmática e o consumo da cafeína de diversos alimentos. Para cada artigo, as linhas horizontais representam o intervalo de confiança e o quadrado o tamanho amostral. Linhas e losango deslocados à direita indicam aceitação da hipótese. A tabela demonstra média, desvio padrão (SD) e tamanho amostral dos grupos controle e tratados de cada trabalho avaliado, além do grau de heterogeneidade.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6. Gráfico de folhas da metanálise dos dados referentes à relação entre hiperhomocisteinemia (HHcy), estresse oxidativo sistêmico (EOS) e doença renal (DR). Para cada artigo, as linhas horizontais representam o intervalo de confiança e o quadrado o tamanho amostral. Linhas e losangos deslocados à direita indicam aceitação da hipótese de que a HHcy contribui para o EOS e DR. A tabela demonstra média, desvio padrão (SD) e tamanho amostral dos grupos controle e doentes de cada trabalho avaliado, além do grau de heterogeneidade.



Fonte: Elaborado pelo autor

Em 71,43% dos casos houve aumento da concentração plasmática de Hcy em pacientes que obtiveram maiores IMC, triglicerídeos, colesterol, leptina e peso corporal. Resultados semelhantes foram observados por 28,6% dos autores, ao constatarem que dietas com baixas calorias reduzem a Hcy circulante. Não houve discordância de conclusões entre os trabalhos (Tabela 5).

Embora existam estudos favoráveis à nossa hipótese, estes são de pouca qualidade científica. A totalidade dos ensaios clínicos avaliados apresentou baixa nota em relação a escala de Jadad (<3), demonstrando falhas de mascaramento e descrição do processo de randomização em suas metodologias (Tabela 5). O nível de evidência dos estudos em sua maioria variou de mediano a baixo, sendo que 85,7% apresentaram nota 2C ou 2B e 14,3% nota 3B. O poder do teste foi $> 80\%$ em 71,43% dos artigos selecionados, indicando boa confiabilidade nas decisões quanto a probabilidade de erros nos testes de hipóteses empregados (Tabela 5).

O gráfico em folhas (Figura 4) demonstra a diferença da média ponderada da concentração plasmática de Hcy nos estudos que a relacionaram com a obesidade. O deslocamento dos traços representativos de cada trabalho para a direita, a área de aceitação da hipótese, e a ausência de interseção entre eles e a linha central nos permitem constatar o consenso da literatura avaliada em relação ao tema: A Hcy plasmática é maior em ratos e humanos obesos. A metanálise dos dados ($p < 0,00001$) corrobora com esta informação. O grau de heterogeneidade (84%) pode ser classificado como substancial ou considerável, apontando a existência de variações metodológicas consistentes entre os artigos selecionados.

2.3.2 O consumo da cafeína de diversos alimentos aumenta a concentração plasmática de homocisteína?

Durante a pesquisa bibliográfica observamos uma deficiência de conhecimento em relação às consequências do consumo da cafeína do refrigerante de cola e do chá mate na concentração plasmática de Hcy em ratos Wistar e humanos, não sendo encontrado nenhum trabalho relacionado a esse tema. Quando buscamos outros alimentos cafeinados obtivemos um total de 12 artigos. Nestes, os mais estudados foram o café (46,7%), seguido do chá preto (33,3%), das cápsulas de cafeína (25%)

e do chá verde (16,7%) (Tabela 6). Alguns trabalhos associaram mais de uma dessas intervenções.

Houve predomínio de ensaios clínicos randomizados (83,3%), seguidos de estudos transversais (16,7%). Nenhum trabalho com outro tipo de metodologia foi selecionado. Dentre estes experimentos, 83,3% foram realizados em humanos. Apenas 16,7% utilizaram ratos, demonstrando que a literatura em relação ao tema nesta espécie ainda é escassa.

A totalidade dos ensaios clínicos randomizados avaliados apresentou baixa nota em relação a escala de Jadad (<3), sendo que 60% obtiveram nota zero, 30% nota 1 e 10% nota 2. O nível de evidência constatou qualidade moderada dos trabalhos, sendo que 66,7% apresentaram nota 2B e 16,7% nota 1B ou 2C. O poder do teste foi menor do que 80% na maioria dos artigos (66,7%), indicando baixa confiabilidade da análise estatística por eles realizada. Apenas 33,3% dos estudos obtiveram poder do teste maior do que 80%.

Dentre os estudos que avaliaram o consumo de cápsulas de cafeína, cerca de 50% não observaram aumento da Hcy plasmática. Estes trabalhos, no entanto, apresentam menor nota na escala de Jadad e mesmo nível de evidência em relação aos outros 50% que constataram esse aumento. O consumo de chá verde não elevou a Hcy plasmática na maioria dos artigos (75%). O único trabalho selecionado (25%) que observou maior concentração de Hcy circulante em humanos após a ingestão de chá verde possui baixo nível de evidência (2C), não é um ensaio clínico e não forneceu dados para o cálculo do poder do teste.

A ingestão de chá preto não aumentou a concentração plasmática de Hcy em 50% dos estudos. Elevações desse oxidante foram observadas em experimentos de qualidade semelhante (25%). O artigo de Hodgson et al. (2007) foi o melhor qualificado em nossa revisão sistemática para avaliar a relação entre a Hcy e o consumo da cafeína de diversos alimentos, obtendo nota 2 na escala de Jadad, 100% de poder de teste e nível de evidência 1B. Estes autores constataram apenas um discreto aumento de Hcy plasmática em humanos após ingestão de chá preto em jejum. Dentre os estudos com café, todos observaram aumento deste oxidante na circulação, sendo que em 33,3% destes trabalhos a elevação foi apenas discreta. Os artigos que estabeleceram aumento significativo de Hcy plasmática após consumo deste alimento

(66,7%) foram classificados como de melhor qualidade e utilizaram maiores tempos de administração, sugerindo que a HHcy está associada ao consumo crônico de café.

As diferenças das médias ponderadas da concentração plasmática de Hcy nos estudos que a relacionaram com o consumo de alimentos contendo cafeína está representada em um diagrama de folhas (Figura 5). Mesmo com o deslocamento dos trabalhos para a área de aceitação da hipótese, a interseção entre os traços representativos de 77,8% dos artigos avaliados e a linha média central demonstra que na maioria dos estudos utilizados para a metanálise não houve aumento significativo da Hcy plasmática após o consumo de cafeína. Estes resultados demonstram divergência de opiniões entre os autores, com tendência à rejeição da hipótese. Apenas 22,2% dos trabalhos aceitaram a hipótese. Estes, no entanto, possuem maior qualidade científica, intervalo de confiança mais estreito e tamanho amostral mais representativo. Os alimentos utilizados pelos autores que constataram aumento da Hcy plasmática após consumo de cafeína foram o café e o chá preto.

Mesmo na presença de dados conflitantes, o cálculo da metanálise ($p < 0,0001$) e o deslocamento do losango para a direita no gráfico (Figura 5) indicam aceitação da hipótese. Desse modo, podemos inferir que o consumo da cafeína do chá preto ou do café contribui para HHcy. Teorizamos que este aumento é mais discreto do que o promovido pela obesidade. O grau de heterogeneidade (62%) pode ser classificado como substancial e aponta a existência apenas moderada de variações metodológicas entre os trabalhos avaliados mesmo com a utilização de diferentes intervenções.

2.3.3 A hiperhomocisteinemia está associada a doença renal?

Um total de 12 trabalhos foi selecionado com o objetivo de avaliar se existe relação entre HHcy e doença renal (DR). Houve predomínio de estudos transversais (33,3%), seguido por ensaios clínicos randomizados (25%), caso controle (16,7%), ensaios clínicos não randomizados (16,7%) e coorte (8,3%). A totalidade dos artigos analisados apresentou baixa qualidade científica, sendo que 100% dos ensaios clínicos obtiveram nota zero na escala de Jadad e nível de evidencia 2C (50%), 2B (33,3%) ou 3B (16,7%). O poder do teste foi maior que 80% em 58,33% dos estudos escolhidos, indicando confiabilidade moderada dos testes estatísticos utilizados. Desse modo, é possível inferir que delineamentos experimentais de boa qualidade e voltados ao tema em questão são escassos na literatura.

Os humanos foram a espécie predominantemente estudada (58,3%), seguidos dos ratos Wistar (41,7%). Dentre os principais parâmetros empregados para o diagnóstico de DR, os de maior destaque foram a taxa de filtração glomerular (TFG) e a creatinina plasmática. Ambos foram mensurados em 50% dos trabalhos, sendo observado azotemia e diminuição da TFG em todos eles. A concentração plasmática de ureia, a razão microalbumina/creatinina urinária e a quantidade total de proteínas na urina foram estudadas, respectivamente, em 25%, 25% e 16,7% dos artigos. Aumentos desses parâmetros foram observados em todos os casos de HHcy. As proteínas do envelhecimento renal e o risco relativo de DR foram avaliados cada um em apenas 1 trabalho (8,3%), também apresentando elevações proporcionais à Hcy plasmática.

De forma geral, a grande maioria (83,3%) dos autores aponta que a HHcy favorece o desenvolvimento de DR. A metanálise dos dados ($p < 0,00001$) corrobora com esta informação (Figura 6). Dois estudos (16,7%) obtiveram resultados contrários ao relacionar a Hcy e a dimetil arginina simétrica (SDMA) plasmáticas. Ambos, no entanto, foram considerados de menor qualidade se comparados aos que estabeleceram relação entre HHcy e DR. Outro fator importante é o tempo de duração do experimento, que foi menor do que 1 dia nestes 2 trabalhos. Teorizamos que com maior tempo de HHcy alterações na dinâmica da SDMA poderiam ser visualizadas. . O grau de heterogeneidade foi de 100%, demonstrando variações consideráveis na metodologia dos artigos selecionados.

2.3.4 A hiperhomocisteinemia está associada ao estresse oxidativo sistêmico?

Para avaliar a relação entre HHcy e estresse oxidativo sistêmico (EOS) foram escolhidos 8 artigos. Dentre eles, a maioria é composta por ensaios clínicos randomizados (75%), seguidos de ensaios clínicos não randomizados (25%). Quanto a qualidade científica, 87,5% destes trabalhos apresentaram nota zero na escala de Jadad e nível de evidência 2B (71,3%) ou 2C (28,6%). Um estudo (12,5%) foi considerado de boa qualidade ao ser classificado com nota 3 e nível de evidência 1B. O poder do teste foi maior que 80% em 62,5% dos artigos selecionados, indicando confiabilidade moderada na análise estatística por eles empregada. A principal espécie utilizada nesses experimentos foram os ratos Wistar (75%), seguidos dos humanos (25%).

Todos os trabalhos que avaliaram o EOS na HHcy mensuraram a peroxidação lipídica, existindo aumento deste parâmetro em 100% deles. A capacidade antioxidante total (TAC) foi estudada por 62,5% dos autores e diminuiu em todos os casos, demonstrando maior exposição dos grupos experimentais a oxidantes. Estes resultados demonstram consenso de opinião entre os autores de que a HHcy aumenta o desequilíbrio oxidativo e EOS.

O diagrama em folhas (Figura 6) apresenta a diferença da média ponderada da concentração plasmática de Hcy nos estudos que a relacionaram com EOS. A metanálise dos dados ($p < 0,00001$), o deslocamento dos traços representativos de cada trabalho e dos losangos para a direita e a ausência de interseção entre eles e a linha central demonstra aceitação da hipótese por parte da literatura selecionada. Tendo isso em vista, confirmados que a HHcy altera a dinâmica dos marcadores de EOS de modo a favorecer a ocorrência de desequilíbrios oxidativos. O grau de heterogeneidade (100%) foi classificado como considerável, apontando a existência de variações metodológicas acentuadas entre os trabalhos avaliados.

2.4 Conclusão

A obesidade e o consumo crônico da cafeína do café e do chá preto aumentam a concentração plasmática de homocisteína. Como consequência, a hiperhomocisteinemia contribui para o desenvolvimento de estresse oxidativo sistêmico e lesão renal em ratos e humanos. Identificamos, no entanto, uma lacuna de conhecimento científico ao observarmos ausência de trabalhos que relacionassem homocisteína com obesidade em ratos ou com a ingestão dos alimentos cafeinados chá mate e refrigerante de cola em qualquer espécie. Adicionalmente, constatamos discordância entre os autores em diversos aspectos e baixa qualidade metodológica dos artigos investigados em quase sua totalidade. Tais informações demonstram pouca confiabilidade dos resultados já vigentes na literatura sobre o tema e evidenciam a necessidade de realização de estudo mais robusto e de maior rigor científico para esclarecer os pontos de interesse. Diante deste cenário, acreditamos ser necessário realizar um ensaio clínico randomizado cego para averiguar se na obesidade induzida em ratos com RC a HHcy realmente está associada ao EOS e DR e pode ser prevenida pelo consumo de CM descafeinado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Um estudo experimental controlado, randômico e cego foi realizado conforme protocolo certificado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal local (FOA 00545-2017).

3.1 Seleção e manutenção dos animais

O grupo amostral utilizado foi composto por 90 *Rattus norvegicus albinus* machos de linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP/Campus de Araçatuba, São Paulo, Brasil. Todos mantidos em gabinete com ambiente controlado ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa entre $55\pm 10\%$, ciclo claro-escuro de 12h/12h, em número de três por gaiola e com livre acesso à água e ração comercial (Presence® - Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil) por sete dias para aclimação.

3.2 Delineamento

Após o período de aclimação, os ratos foram aleatoriamente submetidos a seis diferentes tratamentos: Grupo controle C (n=15), tratados apenas com a dieta de base; CD (n=15), tratados com chá mate descafeinado; CI (n=15), tratados com chá mate *in natura* (não descafeinado); RC (n=15), tratados com refrigerante de cola; RC+CD (n=15), tratados com refrigerante de cola + chá mate descafeinado; RC+CI (n=15), tratados com refrigerante de cola + chá mate *in natura*. A dieta de base, comum a todos os grupos, foi constituída do mesmo lote de ração comercial (Labina, Purina Brasil®) e água mineral *ad libitum*.

Os grupos CD, CI, RC+CD e RC+CI receberam por 120 dias, a partir de sonda orogástrica, chá mate na dose de 20 mg/kg/dia. Esta dose é equivalente ao consumo humano de 2 xícaras de chá mate por dia (MATSUMOTO et al., 2009). Os ratos dos demais grupos foram submetidos ao mesmo procedimento de sondagem gástrica, substituindo o chá mate por água mineral. Os grupos RC, RC+CD e RC+CI receberam, no mesmo período, Coca-Cola® *ad libitum*. Um mesmo lote de Coca-Cola® tradicional e CM foi utilizado durante todo o experimento.

3.3 Dimensionamento amostral, randomização, mascaramento, critérios de inclusão e exclusão

O Open Epi 3.1 (DEAN; SULIVAN, 2006)) foi utilizado para calcular o tamanho amostral considerando um poder de teste de 0,80, valores médios e desvios padrão de Hcy e marcadores obtidos em estudo piloto e de literatura (LIMA et al., 2014) que empregaram a mesma espécie e metodologia analítica deste trabalho. A partir da mesma ferramenta foi realizada a randomização e divisão dos 90 ratos em seis grupos homogêneos quanto ao peso ($420 \pm 9,75$ g) e idade (4 meses). Ao final do processo de experimentação todos os ratos foram identificados de maneira que só o coordenador da pesquisa pudesse diferenciá-los, garantido que toda a colheita e análise laboratorial das amostras provenientes dos mesmos fossem realizadas às cegas. Os parâmetros do hemograma e perfil bioquímico do grupo controle dentro do intervalo de referência descrito para ratos Wistar hípidos (LIMA et al., 2014) foram utilizados para confirmação do estado de hígidez dos animais durante o estudo.

Tabela 1. Comparação dos valores médios e desvios padrão do peso, índice de Lee e índice de massa corporal de ratos Wistar controle (C); tratados por 120 dias com refrigerante de cola (RC), chá mate *in natura* (CI), chá mate descafeinado (CD); RC + CI e RC + CD.

Grupos	Tamanho amostral (n)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Índice de Lee	Índice de Massa Corporal
C	11	416,4 $\pm$ 10,34	520,5 $\pm$ 9,70	297,9 $\pm$ 9,26	0,69 $\pm$ 0,04
RC	11	434,3 $\pm$ 8,68	565,3 $\pm$ 8,55*	306,5 $\pm$ 9,50*	0,74 $\pm$ 0,06*
CI	12	416,9 $\pm$ 10,17	509,3 $\pm$ 8,79 [#]	299,9 $\pm$ 8,90	0,71 $\pm$ 0,04
CD	13	438,5 $\pm$ 9,80	516,8 $\pm$ 7,96 [#]	299,6 $\pm$ 7,96	0,71 $\pm$ 0,05
RC + CI	11	423,3 $\pm$ 6,70	548,3 $\pm$ 7,16	302,3 $\pm$ 4,59	0,73 $\pm$ 0,03
RC + CD	12	422,4 $\pm$ 7,44	536,8 $\pm$ 9,25	299,3 $\pm$ 9,12	0,72 $\pm$ 0,05

Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de Tukey, *p<0,05 quando comparado ao grupo C; [#]p<0,05 quando comparado ao grupo RC.

Ao final do experimento 4 dos 15 ratos que consumiram RC foram excluídos por não atender os critérios de obesidade definidos por índice de Lee > 300 e índice de massa corporal > 0,73 g/m² (NOVELI et al., 2007; BERNARDIS; PATTERSON, 1968). Utilizando os mesmos critérios, todos ratos dos demais grupos foram considerados não obesos, sendo excluídos 16 por apresentarem amostras impróprias para análises.

Ao final do estudo foram constituídos seis grupos com no mínimo 11 repetições (Tabela 1).

3.4 Obtenção, caracterização físico-química e preparo do chá mate

Os lotes de erva-mate *in natura* e descafeinado foram fornecidos pelo Laboratório de Operações Unitárias da Faculdade de Engenharia – PUCRS, Porto Alegre, Brasil. As amostras da erva-mate foram cedidas pela empresa Baldo S.A. (São Mateus do Sul/Paraná) e não sofreram nenhum processo de industrialização.

O teor de cafeína da erva-mate *in natura* foi de 2,1% e após extração supercrítica, este valor foi reduzido para 0,05%, atendendo à legislação ($<0,1\%$) para produto descafeinado (CASSEL et al., 2010). Após a extração da cafeína a concentração total de polifenóis obtida pelo método de Folin-Ciocalteau (TAGA et al., 1970) foi apenas discretamente menor (105,48 vs 117,5 mg de ácido gálico/g de chá) e a capacidade antioxidante total mesurada pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (BENZIE; STRAIN, 1996) foi discretamente maior (637 vs 781 $\mu\text{mol/g}$ de chá). Ambos os chás foram preparados diariamente por infusão das folhas secas em água destilada a temperatura de 80°C por 20 minutos (GAO et al., 2020a), imediatamente antes da administração (PEREIRA et al., 2017).

3.5 Índices de Lee (IL) e massa corporal (IMC)

O peso corporal de todos animais foi mensurado diariamente com auxílio de balança digital previamente calibrada. Os Índices de Lee (BERNARDIS; PATTERSON, 1968) e índice de massa corporal (NOVELI et al., 2007) foram calculados semanalmente.

3.6 Colheita e conservação das amostras biológicas

Ao término do tratamento, os ratos em jejum alimentar (12 horas) e hídrico (6 horas) foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg m.c.) para realização da punção cardíaca. O sangue obtido (8 mL) foi transferido para tubos heparinizados e centrifugado a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C para obtenção do plasma. Amostras de urina foram coletadas por cistocentese e processadas em até 2 horas após a

coleta. O plasma heparinizado e uma alíquota de urina de cada animal permaneceram armazenados em freezer (-80°C) e protegidos da luz até o momento das análises laboratoriais.

3.7 Análises laboratoriais

3.7.1 Perfil bioquímico plasmático e hematológico

Todas as análises bioquímicas foram realizadas em duplicata em analisador bioquímico automatizado (BS-200 Chemistry Analyzer, Mindray Bio-Medical Electronics Co, Germany) previamente calibrado com calibrador comercial e controles de níveis I e II (Bio Systems, Barcelona, Spain). Utilizando conjunto de reativos comerciais (BioSystems, Barcelona, Spain), a concentração plasmática de ureia foi determinada pelo método enzimático UV; creatinina pelo método cinético (picrato alcalino); albumina pelo método do verde de bromocresol; colesterol pelo método enzimático (oxidase/peroxidase); triglicerídeos pelo método enzimático (glicerol fosfato oxidase/peroxidase); ácido úrico pelo método enzimático (uricase/peroxidase); e bilirrubina total pelo método sulfaníliodiazotado. Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C e conforme as orientações dos fabricantes.

O hemograma completo foi realizado com auxílio de um Contador Automatizado (BC-2800 Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical ElectronicsCo. Nanshan, China) e leitura em microscópio óptico de esfregaço sanguíneo corado com Panótico® para contagem diferencial de leucócitos (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

3.7.2 Avaliação renal

Para avaliar lesão e função renal, além da mensuração de ureia e creatinina supracitada, foi mensurada a densidade urinária por refratometria e o cálcio urinário pelo método colorimétrico da cresoltaleína complexona. A microalbumina urinária e a concentração plasmática de SMDA forma mesuradas pelo método ELISA, utilizando kits comerciais My Byosource® (Southern California, San Diego, USA) espécie específicos para ratos e leitora automática de microplacas (Readwell Touch, Robonik PVT LTD, Thane, India).

3.7.3 Avaliação do estresse oxidativo sistêmico

Adicionalmente às determinações das concentrações plasmáticas dos antioxidantes endógenos (albumina, bilirrubina total e ácido úrico) conforme metodologia supracitada, foi quantificada a capacidade antioxidante total do plasma (TAC) pelo método colorimétrico de inibição de formação de cátion de ABTS® (2,2'-Azino ácido dietilbezotiazolinossulfônico) (EREL, 2004). A concentração de oxidantes total (TOC) no plasma foi obtida pelo método Xylenol Orange (EREL, 2005). A peroxidação lipídica foi mensurada a partir da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando reagente comercial (TBARS Assay Kit, ZeptoMetrix Corporation, USA). A concentração plasmática de homocisteína foi avaliada pelo método ELISA–Competitivo espécie específico para ratos (Express Biotech International, Frederick, MD, USA), segundo as recomendações do fabricante.

3.8 Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Para detectar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos foram aplicados a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey. Para estimar a correlação entre as variáveis foi calculado o coeficiente r de Pearson. As associações entre obesidade, HHcy, DR e EOS foram determinadas pelo teste de Fisher, sendo empregados para tal valores de referência obtidos em estudo piloto e da literatura (LIMA et al., 2014; NOVELI et al., 2007; BERNARDIS; PATTERSON, 1968). O software GraphPad Prism (versão 5.1, GraphPad Software, Inc.) foi utilizado para o cálculo da razão de probabilidade (OR) e realização de toda a análise estatística.

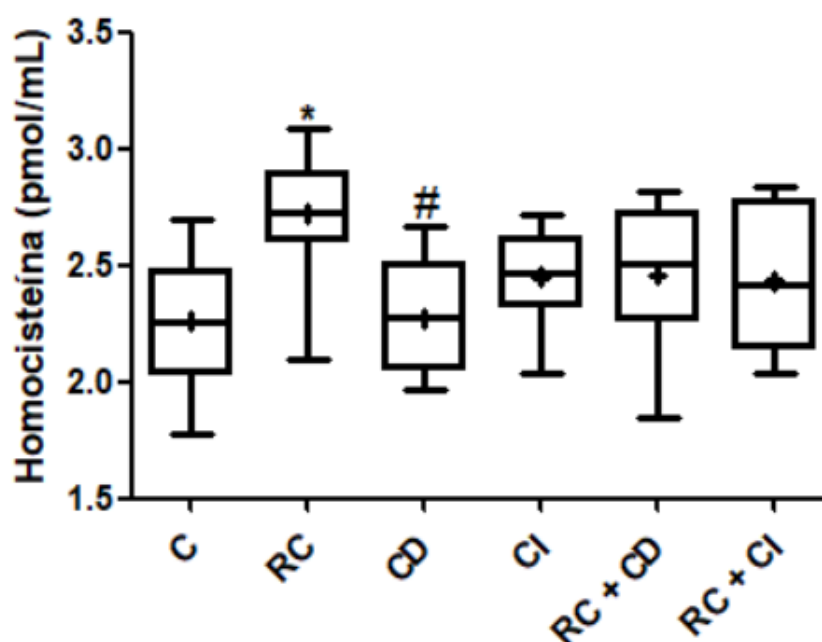
4 RESULTADOS

4.1 A HHcy ocorre em ratos com obesidade e pode ser prevenida pelo consumo de CM

A concentração plasmática média de Hcy ($2,724 \pm 0,26$ pmol/mL) foi significativamente ($p=0,0015$) maior no grupo com obesidade induzida por consumo de RC e a HHcy não foi observada em ratos que consumiram RC juntamente com CI e CD (Figura 1). A concentração plasmática de Hcy de ratos que consumiram CD foi significativamente ($p=0,0015$) menor quando comparada ao do grupo obeso, diferença não observada naquele que consumiu CI (Figura 1).

Embora a associação e a correlação entre Hcy e os indicadores de obesidade não tenham sido significativas ($p>0,05$), o cálculo da razão de probabilidade (OR) revelou chances seis vezes maiores de HHcy em ratos com obesidade.

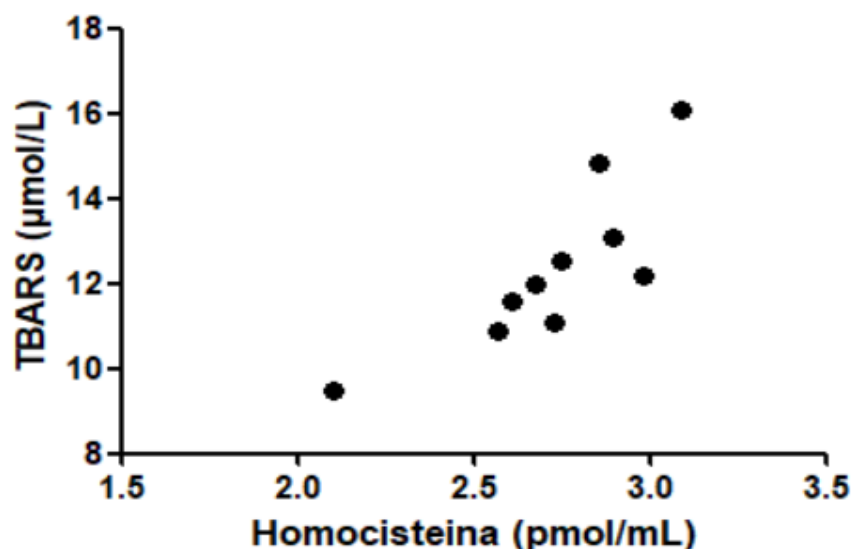
Figura 1 - Comparação da concentração plasmática de homocisteína de ratos Wistar controle (C), obesos tratados com refrigerante de cola (RC), não obesos tratados com chá mate descafeinado (CD), chá mate *in natura* (CI) e refrigerante de cola + chá mate descafeinado (RC + CD) ou *in natura* (RC + CI). Box plot & Wisker com respectivos quartis (Q1, Q2 e Q3), valores máximos e mínimos. + Representa média e a linha a mediana. * e # representam diferenças significativas (ANOVA + pós-teste de Tukey, $p<0,05$) em relação ao grupo C e RC, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Associação da HHcy com o estresse oxidativo em ratos com obesidade

Figura 2 - Correlação entre a homocisteína e a peroxidação lipídica (TBARS) plasmáticas em ratos Wistar com obesidade ($r=0,820$; $p=0,0036$).



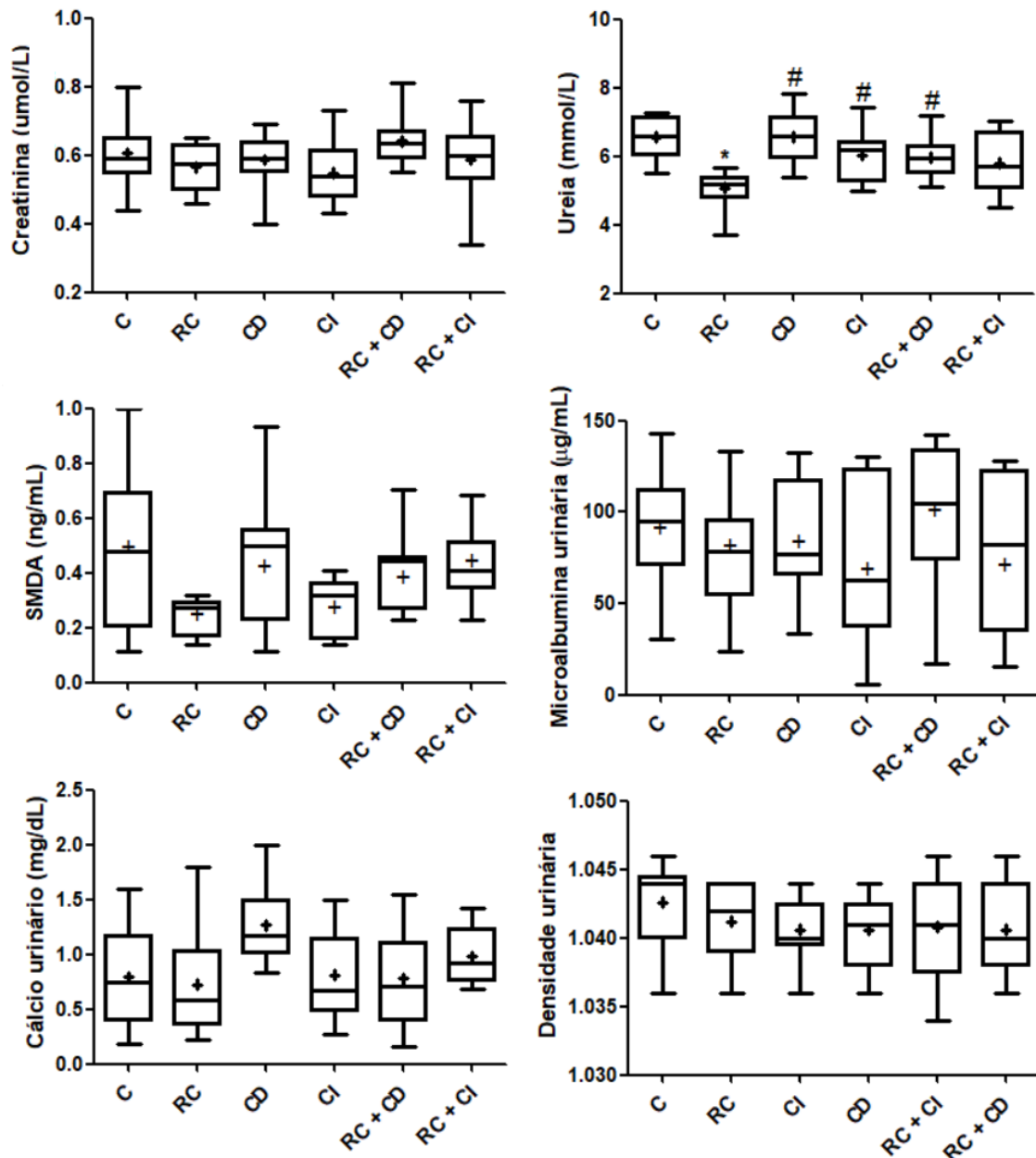
Fonte: Elaborado pelo autor

Uma vez confirmado que a HHcy ocorre em ratos com obesidade, investigamos a associação entre a Hcy e os demais marcadores de estresses oxidativo sistêmico analisados. Embora a Hcy seja um oxidante, no grupo com obesidade não observamos correlação significativa ($p>0,05$) com os principais antioxidantes plasmáticos (albumina, ácido úrico, bilirrubina), TAC e TOC, exceto com TBARS plasmático (Figura 2).

4.3 Avaliação renal de ratos com obesidade e HHcy

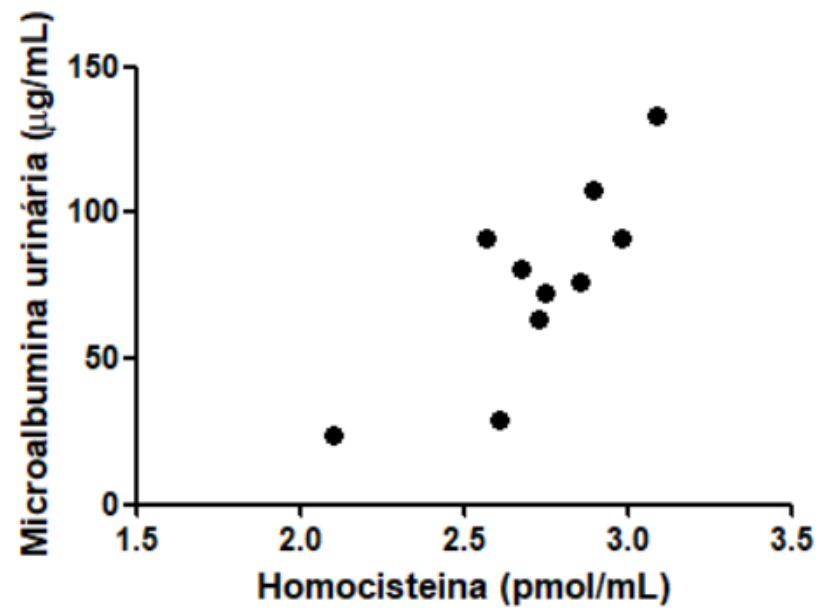
Dentre todas as associações entre Hcy e os parâmetros utilizados para avaliação renal, apenas identificamos uma forte correlação positiva ($r=0,802$; $p=0,0052$) com a microalbumina urinária (Figura 3). O cálculo da OR estima que ratos com HHcy possuem chances aproximadamente três vezes maiores de desenvolver microalbuminúria. Não observamos alterações plasmáticas significativas de SMDA, creatinina, microalbumina, cálcio e densidade urinários em nenhum grupo, exceto a ureia que diminuiu significativamente ($p<0,001$) nos ratos com obesidade (Figura 4).

Figura 3 - Avaliação renal. Comparação das concentrações plasmáticas de creatinina, ureia e dimetilarginina simétrica (SMDA), microalbumina, cálcio e densidade urinários de ratos Wistar controle (C), obesos tratados com refrigerante de cola (RC), não obesos tratados com chá mate descafeinado (CD), chá mate *in natura* (CI) e refrigerante de cola + chá mate descafeinado (RC + CD) ou *in natura* (RC + CI). Box plot & Wisker com respectivos quartis (Q1, Q2 e Q3), valores máximos e mínimos. + Representa média e a linha a mediana. * e # representam diferenças significativas (ANOVA + pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) em relação ao grupo C e RC, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 - Análise da correlação entre homocisteína plasmática e microalbuminúria em ratos Wistar com obesidade ($r=0,802$; $p= 0,0052$).



Fonte: Elaborado pelo autor

5 DISCUSSÃO

O aumento da concentração plasmática de Hcy em humanos (KONUKÖGLÜ et al., 2003), também foi descrito na obesidade de camundongos induzida por dieta hipercalórica rica em gordura do leite e açúcar (YUN et al., 2013), porém não em ratos. Considerando que há diferenças metabólicas entre estas três espécies e provavelmente entre os protocolos de indução da obesidade, nós quantificamos Hcy plasmática de ratos obesos após a ingestão de RC por 120 dias. Os resultados obtidos confirmam a nossa hipótese inicial de que a obesidade induzida por RC também causa HHcy em ratos, corroborando com as observações em humanos (KONUKÖGLÜ et al., 2003) e camundongos (YUN et al., 2013) .

Nós escolhemos o RC para induzir a obesidade, pois é uma bebida muito rica em energia, cada vez mais ingerida pela população e associada à obesidade (NIELSEN; POPKIN, 2004; SWINBURN et al., 2004). Consideramos também o fato de que não só a obesidade tem sido associada à HHcy, mas também a ingestão contínua de cafeína (GRUBBEN et al., 2000; URGERT et al., 2000), que aumenta a Hcy plasmática de forma dose-dependente (JACQUES et al., 2001) e a partir do consumo crônico de café em humanos (BECH, 2011; URGERT et al., 2000). Por outro lado, pouco se sabe sobre o efeito da cafeína do RC e CI sobre os níveis de Hcy. Em humanos o tema é controverso, uma vez que há evidência de que o consumo de chá verde aumenta os riscos de HHcy (RICHARD et al., 2018) e o mesmo não ocorre com o consumo de chá preto (HODGSON et al., 2007). Buscando contribuir para o melhor entendimento dessa relação, nós investigamos os efeitos da cafeína do RC e CI sobre a Hcy.

Nós verificamos que apesar da presença de cafeína no CI, o aumento de Hcy foi discreto quando comparado aos dos ratos obesos que consumiram RC. Estes resultados se assemelham aos de ratos Wistar machos que consumiram 14 mg/dia de cafeína por 20 semanas e igualmente não apresentaram aumento significativo da Hcy plasmática (SAKAMOTO et al., 2005). Diferença significativa na Hcy plasmática foi descrita em humanos após elevado consumo (870 mg/dia por 2 semanas) de cafeína (VERHOEF et al., 2002). Nossos ratos utilizaram uma dosagem terapêutica (20 mg/kg/dia) num período de 120 dias, sugerindo que o consumo moderado CI, apesar de conter cafeína, promove apenas um discreto aumento de Hcy plasmática em ratos.

Também verificamos que a concentração plasmática de Hcy de ratos que consumiram CD, porém não CI, é menor quando comparada ao grupo com obesidade após indução com RC. O conjunto desses resultados é uma evidência de que o acúmulo de gordura corporal é a principal fonte de HHcy em ratos com obesidade e que a cafeína presente na RC contribui em menor escala para o aumento da Hcy plasmática.

É aceito que dietas com baixa gordura reduzem os níveis de Hcy circulante em humanos (BECH, 2011). Nós comprovamos que o aumento da Hcy em ratos com obesidade não ocorre quando o RC é consumido juntamente com CI e CD. Estes resultados confirmam nossa hipótese inicial de que a obesidade induzida por RC causa HHcy em ratos e que esta pode ser melhor prevenida pelo consumo de CM descafeinado. Diante de tais resultados, é importante agora comprovar se este mesmo efeito fitoterapêutico do CM se reproduzirá em indivíduos com obesidade não induzida ou induzida com outros protocolos.

A HHcy tem sido associada a causa e ao agravamento de EOS em camundongos e humanos (GLESBY et al., 2009), porém não em ratos. Já a atividade oxidante da Hcy está relacionada à cronicidade e alterações na peroxidação lipídica em ratos (HUO et al., 2018; LIANG et al., 2018). Nossos resultados corroboram com estas evidências, uma vez que confirmam que também há correlação entre Hcy e TBARS em ratos com obesidade.

Outros estudos estabelecem associação entre HHcy e lesão renal (GAO et al., 2020a; KUMAR et al., 2017; GAO et al., 2013) e a consideram a HHcy como um fator de risco importante para nefropatias por alterar a estrutura e função dos néfrons (ZHANG et al., 2020). A concentração plasmática de SMDA é um excelente biomarcador de função renal (SHIMIZU-TOKIWA et al., 2002) por representar a taxa de filtração glomerular (TOTO, 1994; WEBER; ZANTEN, 1991), sendo já registrado aumento concomitante de SMDA e Hcy plasmáticas em humanos com doença renal crônica (WANG et al., 2008), porém não no presente estudo. Dentre todos marcadores de lesão e função renal analisados neste trabalho, apenas observamos uma diminuição significativa de ureia plasmática nos ratos com obesidade. Esta alteração pode ser explicada pelo fato de que a obesidade induzida por dietas de cafeteria diminui a utilização hepática de aminoácidos e, portanto, a síntese de ureia (BARBER et al., 1985). Embora a DR não tenha sido detectada em ratos obesos com HHcy, foi possível estabelecer uma correlação entre a Hcy plasmática e a

microalbumina urinária. É muito provável que a lesão renal seja um achado dependente do tempo de obesidade e grau de HHcy. Esta alteração tem sido relatada nos estágios mais crônicos das nefropatias em ratos (PERNA et al., 2012) e possui correlação com a progressão da doença e diminuição da função renal (LONG; NYE, 2016). Corroborando com esta hipótese, nosso cálculo da OR sugere que o aumento da Hcy plasmática é um fator de risco para DR, uma vez que estima que ratos com HHcy possuem três vezes mais chances de apresentar microalbuminúria.

6 CONCLUSÃO

Em síntese, nós confirmamos parcialmente nossas hipóteses, concluindo que:

1. Em ratos com obesidade induzida pelo consumo de RC o principal responsável pela HHcy é o acúmulo de gordura e não a cafeína.
2. O aumento do oxidante Hcy em ratos com obesidade contribui para o estresse oxidativo, tendo a HHcy uma correlação direta com a peroxidação lipídica e maior chance de ocorrência de microalbuminúria.
3. O consumo do CM reduz os malefícios da HHcy em ratos com obesidade, sendo mais efetivo em sua forma descafeinada devido ao discreto aumento na Hcy plasmática promovido pela cafeína do CM *in natura*.

REFERÊNCIAS

- Alzoubi KH, Mhaidat NM, Obaid EA, Khabour OF. Caffeine Prevents Memory Impairment Induced by Hyperhomocysteinemia. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2018; 66(2): 222–228.
- Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death & Differentiation*. 2004; 11(S1): S56–S64.
- Barber T, Vina JR, Vina J, Cabo J. Decreased urea synthesis in cafeteria-diet-induced obesity in the rat. *Biochemical Journal*. 1985; 230(3): 675–681.
- Bech BH. What advice should be given to pregnant mothers on caffeine consumption? In *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 6(3):259-272.
- Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239(1): 70–76.
- Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *The Journal of Endocrinology*. 1968; 40(4): 527–528.
- Biezanowska-Kopeć R, Leszczyńska T. Effect of High Methionine and Folic Acid Diet on the Level of Homocysteine and Lipid Profile in Experimental Rats. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2017; 67(3): 219–224.
- Bland IM. et al. Dog obesity: Owner attitudes and behaviour. *Preventive Veterinary Medicine*. 2009; 92 (4), 333–340.
- Bostom A, Brosnanb JT, Hallb B, Nadeau MR, Selhub J. Net uptake of plasma homocysteine by the rat kidney in vivo. In *Atherosclerosis*. 1995; 116.
- Boyacioglu M, Sekkin S, Kum C, Korkmaz D, Kiral F, Yalinkilinc HS, Ak MO, Akar F. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2014; 66(9–10): 407–413.
- Cassel E, Vargas RMF, Brun GW, Almeida DE, Cogoi L, Ferraro G, Filip R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis*. *St Hil. Journal of Food Engineering*. 2010; 100(4): 656-661.
- Cavazos RNC, Rivera LZ, Torres DNE. Determinación de fósforo y cafeína en bebidas de cola. *Educación Química*. 1989; 1(0).
- Christensen B, Annhild M, Lars R, Sverre L, Dag ST. Abstention from filtered coffee reduces the concentrations of plasma homocysteine and serum cholesterol – a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001. 74:302-7.

Cohen E, Levi A, Vecht-Lifshitz SE, Goldberg E, Garty M, Krause I. Assessment of a possible link between hyperhomocysteinemia and hyperuricemia. *Journal of Investigative Medicine*. 2015. 63(3); 534–538.

Cui S, Li W, Lv X, Wang P, Huang G, Gao Y. Folic acid attenuates homocysteine and enhances antioxidative capacity in atherosclerotic rats. 2017.

Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, 3.1, 2006.

Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FRF, Almeida FQA, Galhardi CM, Filho JLVBN, Mani F, Novelli ELB. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *International Journal of Cardiology*. 2008; 124(1): 92–99.

Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004; 37(4): 277–285.

Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*. 2005; 38(12): 1103–1111.

Folsom R, Nieto FJ, McGovern PG, Tsai MY, Malinow MR, Eckfeldt HJ, et al. Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphism, and B vitamins: the Atherosclerosis Risk in Communities. *ARIC study Circulation* 1998;98:204–10.

Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, Hu FB. Association between dietary patterns and plasma biomarkers obesity and cardiovascular disease risk. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 73:61-7.

Gao N, Zhang Y, Lei L, Li L, Cao P, Zhao X, Lin L, Xu R. Low doses of folic acid can reduce hyperhomocysteinemia-induced glomerular injury in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research*. 2020a; 43(11), 1182–1191.

Gao N, Zhang Y, Li L, Lei L, Cao P, Zhao X, Lin L, Xu R. Hyperhomocysteinemia-Induced Oxidative Stress Aggravates Renal Damage in Hypertensive Rats. *American Journal of Hypertension*. 2020b; 33(12), 1127–1135.

Gao H, Liu Z, Qu X, Zhao Y. Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein receptor gene expression in hyperlipidemic rats. *Fitoterapia*, 2013; 84(1): 264–272.

Gilbertson DT, Liu J, Xue JL, et al. Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(12):3736–41.

Glesby MJ, Hoover DR, Raiszadeh F, Lee I, Shi Q, Milne G, Sanchez SC, Gao W, Kaplan RC, Morrow JD, Anastos K. Oxidant stress in HIV-infected women from the Women's Interagency HIV Study. *Antiviral Therapy*. 2009; 14(6): 763–769.

Grubben MJ. et al. Unfiltered coffee increases plasma homocysteine concentrations in healthy volunteers: a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000; 71 (2), 480–484.

Hajer GR, van der Graaf Y, Olijhoek JK, Verhaar MC, Visseren FL. SMART Study Group, Levels of homocysteine are increased in metabolic syndrome patients but are not associated with an increased cardiovascular risk, in contrast to patients without the metabolic syndrome. *Heart*. 2007; 93, 216–220.

Hodgson JM, Puddey IB, van Bockxmeer FM, Burke V. Acute effects of tea on fasting and non-fasting plasma total homocysteine concentrations in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 2007; 97(5): 842–845.

Hodgson JM, Devine Phd A, Puddey IB, Beilby J, Princemd RL. Drinking tea is associated with lower plasma total homocysteine in older women. In *Asia Pac Journal of Clinic Nutrition*. 2006; 15(2).

Hodgson JM, Burke V, Beilin LJ, Croft KD, Puddey IB. Can black tea influence plasma total homocysteine concentrations? In *American Journal of Clinic Nutrition*. 2003;77: 1-3.

House JD, Brosnan ME, Brosnan JT. Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia. *Kidney International*. 1998 Nov; 54(5): p. 1601– 1607.

Huo Y, Wu X, Ding J, Geng Y, Qiao W, Ge A, Guo C, Lv J, Bao H, Fan W. Vascular Remodeling, Oxidative Stress, and Disrupted PPAR γ Expression in Rats of Long-Term Hyperhomocysteinemia with Metabolic Disturbance. *PPAR Research*. 2018. p.1-9.

Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 73(3): 613–621.

Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1182–4.

Jadad AR. et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Controlled clinical trials*. 1996; 17(1): p. 1–12.

Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ, Wyse ATS. Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: Prevention by folic acid. *Cardiovascular Toxicology*. 2011; 11(1): 67–73.

Konukoğlu D, Serin Ö, Ercan M, Turhan MS. Plasma homocysteine levels in obese and non-obese subjects with or without hypertension; its relationship with oxidative stress and copper. *Clinical Biochemistry*. 2003; 36(5): 405–408.

Kuang ZM, Wang Y, Feng SJ, Jiang L, Cheng WL. Association between plasma homocysteine and microalbuminuria in untreated patients with essential hypertension: A case-control study. *Kidney and Blood Pressure Research*. 20017, 42(6), 1303–1311.

Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutrition and Metabolism*. 2017; 14(1): 1–12. .

Levi A, Cohen E, Levi M, Goldberg E, Garty M, Krause I. Elevated serum homocysteine is a predictor of accelerated decline in renal function and chronic kidney disease: A historical prospective study. *European Journal of Internal Medicine*. 2014; 25(10), 951–955.

Liang S, Liu S, Liu H, He X, Sun L, Chen L, Wei M, Gao F, Jiang H. Homocysteine aggravates intestinal epithelial barrier dysfunction in rats with experimental uremia. *Kidney and Blood Pressure Research*. (2018); 43(5): 1516–1528.

Li N, Chen YF, Zou AP. Implications of Hyperhomocysteinemia in Glomerular Sclerosis in Hypertension. 2002.

Lima NDS, Franco JG, Peixoto-Silva N, Maia LA, Kaezer A, Felzenszwalb I, de Oliveira E, de Moura EG, Lisboa PC. *Ilex paraguariensis* (yerba mate) improves endocrine and metabolic disorders in obese rats primed by early weaning. *European Journal of Nutrition*. 2014; 53(1): 73–82.

Long Y, Nie J. Homocysteine in Renal Injury. *Kidney Diseases*. 2016; 2(2): 80–87.

Magné J, Huneau JF, Borderie D, Mathé V, Bos C, Mariotti F. Plasma asymmetric and symmetric dimethylarginine in a rat model of endothelial dysfunction induced by acute hyperhomocysteinemia. *Amino Acids*. 2015; 47(9), 1975–1982.

Matsumoto RLTT, Bastos DHM, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky W, Ribeiro ML, Carvalho PO. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009; 57(5): 1775-80.

Matté C, Stefanello FM, Mackedanz V, Pederzolli CD, Lamers ML, Dutra-Filho CS, dos Santos MF, Wyse ATS. Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2009; 27(4): 337–344.

McGreevy PD. et al. Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved. *The Veterinary record*. 2005; 156(22), 695–702.

Moher D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Medicine*. 2009; 6 (7).

Mursu J, Voutilainen, S, Nurmi T, Alfthan G, Virtanen JK, Rissanen TH, Happonen P, Nyyssönen K, Kaikkonen J, Salonen R, Salonen JT. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine concentrations: A clinical trial. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 38(4), 527–534.

Nielsen SJ, Popkin BM. Changes in beverage intake between 1977 and 2001. *American Journal of Preventive Medicine*. 2004 Out; 27(3):205–210.

Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AAH, Cicogna AC, Filho N. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*. 2007; 41: 111-119.

Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Brattström L, Ueland PM. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Int Medicine*. 1999;246:425–54

Oliveira VH, Troncon Rosa F, Wiechmann S, Maria Serraglio Narciso A, Webel AR, Marta Franzói de Moraes S, Deminice R, Hugo Fernando Oliveira V, Lilian Wiechmann S, Webel A, Author C. Homocysteine-lowering exercise effect is greater in hyperhomocysteinemic people living with HIV: A randomized clinical trial. 2019.

Olthof MR, Hollman PC, Zock PL, Katan MB. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 73:532–538.

Ostrakhovitch EA, Tabibzadeh S. Homocysteine in Chronic Kidney Disease. In *Advances in Clinical Chemistry*. 2015; 72: pp.77–106.

Ouzzani M. et al. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*. 2016; 5:(1), 1–10.

Pereira AAF. Uso do chá mate (*Ilex paraguariensis*) descafeinado na prevenção do dano oxidativo e das alterações ósseas em ratos Wistar obesos. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Araçatuba, p. 436. 2021.

Perna AF, Sepe I, Lanza D, Pollastro RM, de Santo NG, Ingrosso D. Hyperhomocysteinemia in Chronic Renal Failure: Alternative Therapeutic Strategies. *Journal of Renal Nutrition*. 2012; 22(1): 191–194.

Philips B. et al. Evidence-based medicine levels of evidence. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine, 2001.

Racek J, Rusňáková H, Trefil L, Siala KK. The Influence of Folate and Antioxidants on Homocysteine Levels and Oxidative Stress in Patients with Hyperlipidemia and Hyperhomocysteinemia. *Physiol. Res*. 2005; 54, 87–95.

Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 5.4.1, The Cochrane Collaboration, 2020.

Richard C, razo-Arvizu DR, Wang W. The association between tea consumption and hyperhomocysteine in Chinese hypertensive patients. *American Journal of Hypertension*. 2018.

Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, Takahashi K, Nakao K, Izumi H. Relationship of coffee consumption with risk factors of atherosclerosis in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2005; 49(3): 149–154.

Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity*. 2011; 19(6): 1109–1117.

Shimizu-Tokiwa A, Kobata M, Kobayashi N, Shou I, Funabiki K, Fukui M, Horikoshi S, Shirato, I, Saito K, Tomino Y. Serum Cystatin C Is a More Sensitive Marker of Glomerular Function than Serum Creatinine. In *Nephron*. 2002; 92.

Stockham SL, Scott MA. Fundamentos de patologia clínica veterinária. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

Strandhagen E, Landaas S, Thelle DS. Folic acid supplement decreases the homocysteine increasing effect of filtered coffee. A randomised placebo-controlled study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 57(11): 1411–1417.

Swinburn BA, Caterson I, Seidell JC, James WPT. Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public health nutrition*. 2004 Feb; 7(1A): 123-46.

Taga SM, Miller E, Pratt D. Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants. In *Adv. Organometry Chemistry*. 1970; 53(18).

Teng YW, Ellis JM, Coleman RA, Zeisel SH. Mouse betaine-homocysteine S-methyltransferase deficiency reduces body fat via increasing energy expenditure and impairing lipid synthesis and enhancing glucose oxidation in white adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(20):16187–16198.

Toto RD. Renal insufficiency due to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Mineral and Electrolyte Metabolism*. 1994; 20(4): 193–200.

Trunova VA, Sidorina A, Zvereva V, Churin B, Starkova E, Sorokoletov DS. Content of bioelements in the lungs and liver in rats with alimentary obesity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2016; 33: 95–99.

Urgert R, Trinette VV, Peter LZ, Martin BK. Heavy coffee consumption and plasma homocysteine: a randomized controlled trial in healthy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000. 72:1107-10.

Vayá A, Rivera L, Hernández-Mijares A, de La Fuente M, Solá E, Romagnoli M, Alis R, Laiz B. Homocysteine levels in morbidly obese patients. Its association with waist circumference and insulin resistance. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2012; 52(1), 49–56.

Vayá A, Ejarque I, Tembl J, Corella D, Laiz B. Hyperhomocysteinemia, obesity and cryptogenic stroke. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2010; 47(1): 53–58.

Verhoef P, Pasma WJ, Van Vliet T, Urgert R, Katan MB. Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002; 76:1244–1248.

Wang J, Sim AS, Wang XL, Salonikas C, Moriatis M, Naidoo D, Wilcken DEL. Relations between markers of renal function, coronary risk factors and the occurrence and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2008; 197(2), 853–859.

Wang B, Lin L, Zhao C. Related factors of serum uric acid in patients with primary hypertension and hyperhomocysteinemia. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2016; 38(3), 312–316.

Weber JA, van Zanten AP. Interferences in Current Methods for Measurements of Creatinine. In *CLINICAL CHEMISTRY*. 1991; 37(5).

Ye Z, Zhang Q, Li Y, Wang C, Zhang J, Ma X, Peng H, Lou T. High prevalence of hyperhomocysteinemia and its association with target organ damage in chinese patients with chronic kidney disease. *Nutrients*. 2016; 8(10).

Yun L, Xu R, Li G, Yao Y, Li J, Cong D, Xu X, Zhang L. Homocysteine and the C677T gene polymorphism of its key metabolic enzyme MTHFR are risk factors of early renal damage in hypertension in a Chinese han population. *Medicine (United States)*; 2015;94(52).

Yun KU, Ryu CS, Oh JM, Kim CH, Lee KS, Lee CH, Lee HS, Kim BH, Kim SK. Plasma homocysteine level and hepatic sulfur amino acid metabolism in mice fed a high-fat diet. *European Journal of Nutrition*. 2013; 52(1): 127–134.

Zhang S, Zhang Y, Zhang X, Luo C, Cao Y, Ji D, Yan W, Xue K, Chai J, Dai H, Wang W. Nitrate Stress-Related Autophagic Insufficiency Participates in Hyperhomocysteinemia-Induced Renal Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL LOCAL



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



**CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Eficácia do chá mate (*Ilex paraguariensis*) descafeinado no controle de estresse oxidativo, obesidade e lesão óssea em ratos Wistar"**, Processo FOA nº 00545-2017, sob responsabilidade de Paulo Cesar Ciarlini apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Julho de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Dezembro de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 31 de Janeiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Efficacy of decaffeinated tea (*Ilex paraguariensis*) in the control of oxidative stress, obesity and bone lesion in Wistar rats"**, Protocol FOA nº 00545-2017, under the supervision of Paulo Cesar Ciarlini presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 05, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 31, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 31, 2020.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator