



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**POLLYANNA ALVES SECUNDO WHITE**

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE ABAJERU  
(*Crhysobalanus icaco*) SOBRE O PESO CORPORAL,  
ADIPOSIDADE E SENSIBILIDADE À INSULINA DE  
CAMUNDONGOS OBESOS**

**ARACAJU  
2010**

**POLLYANNA ALVES SECUNDO WHITE**

**EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE ABAJERU  
(*Crhysobalanus icaco*) SOBRE O PESO  
CORPORAL, ADIPOSIDADE E SENSIBILIDADE  
À INSULINA DE CAMUNDONGOS OBESOS**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Luciana Catunda Brito

**ARACAJU**

**2010**

POLLYANNA ALVES SECUNDO WHITE

EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DE ABAJERU  
(*Crhysobalanus icaco*) SOBRE O PESO CORPORAL,  
ADIPOSIDADE E SENSIBILIDADE À INSULINA  
DE CAMUNDONGOS OBESOS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-  
Graduação em Medicina da Universidade  
Federal de Sergipe como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências da  
Saúde.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos  
Universidade Federal de Sergipe – Orientador

---

1º Examinador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva  
Universidade de São Paulo/SP

---

2º Examinador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo  
Universidade Federal de Sergipe – DFS/UFS

PARECER

---

---

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

White, Pollyanna Alves Secundo

W587e Efeitos do extrato aquoso de abajeru (*chrysobalanus icaco*) sobre o peso corporal, adiposidade e sensibilidade à insulina de camundongos obesos / Pollyanna Alves Secundo White. – Aracaju, 2011.  
49 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

Orientador(a): Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos.

1. *Chrysobalanus icaco* (*Chrysobalanaceae*) 2. Extrato aquoso 3. Obesidade 4. Resistência à insulina 5. Camundongos 6. Pesquisa experimental 7. Botânica sistemática 8. Plantas medicinais I. Título.

CDU 582:616.4-056.257

**Aos meus pais.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me concedido a oportunidade e por ter me dado forças e me guiado por todo esse caminho;

À minha família, em especial minha mãe, pelo amor incondicional, apoio e incentivo;

Ao orientador Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos e à co-orientadora Profa. Dra. Luciana Catunda Brito, pelos ensinamentos, encorajamento e amizade;

Aos professores Dr. Enilton Aparecido Camargo, Dr. Anderson Carlos Marçal, Dr. Waldecy de Lucca Junior, pelos ensinamentos, colaboração, paciência e amizade;

Aos alunos colaboradores Jéssica Maria Dantas Araújo, Luana Mendonça Cerato, Lucas Andrade Souza, Andréa Fraga Soares e Ana Paula Oliveira Barbosa, por toda dedicação e amizade;

Aos amigos queridos e aos colegas do LAFAC pelo apoio, incentivo e amizade, em especial Luana e Tharciano, grandes companheiros durante toda essa jornada;

A CAPES pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

**WHITE, PAS. Efeitos do extrato aquoso de abajeru (*Crhysobalanus icaco*) sobre o peso corporal, adiposidade e sensibilidade à insulina de camundongos obesos. 2011. 51p. Dissertação (Pós-graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.**

## **RESUMO**

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo. A localização anatômica desse tecido, mais especificamente sua distribuição abdominal (visceral), tem papel primordial no desenvolvimento da resistência à insulina, que atua como um ponto chave ligando a obesidade ao desenvolvimento de diversas outras doenças crônico-degenerativas. Dessa forma, pesquisas acerca de novas terapêuticas que possam promover benefícios sobre o desenvolvimento e tratamento da obesidade e de suas comorbidades se fazem necessárias. Este estudo teve como propósito verificar o potencial do extrato aquoso das folhas do *Chrysobalanus icaco* (EACI) sobre a redução de peso e tecido adiposo, bem como avaliar seu efeito sobre a sensibilidade à insulina em camundongos obesos. Para tanto, foram utilizados 34 camundongos *Swiss* divididos em 4 grupos que receberam dieta padrão (DP), dieta padrão e EACI (DPE), dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica associada ao EACI (DHE), o qual foi colocado na água de beber dos animais durante as 4 últimas semanas de um período total de 14 semanas em que eles receberam as respectivas dietas. Ao final do experimento foram avaliados consumo, peso corporal, peso dos coxins adiposos, glicemia, lipídios séricos, sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. Os resultados obtidos mostram que o grupo DH apresentou aumento significativo de massa corpórea ( $p < 0,001$ ), dos coxins adiposos ( $P < 0 0001$ ), da eficiência energética ( $p < 0,0001$ ) e da glicemia ( $p < 0,05$ ), além de maior área sob a curva obtido no teste de tolerância à insulina ( $p < 0,05$ ). Após tratamento por 4 semanas, no grupo DHE, o EACI possibilitou menor ganho de peso ( $p < 0,05$ ), normalização da glicemia ( $p < 0,05$ ) e da sensibilidade à insulina ( $p < 0,05$ ), apesar do consumo de dieta hiperlipídica. Com relação ao tecido adiposo houve pouca influência do extrato e nenhum efeito sobre os lipídios séricos e tolerância à glicose. Dessa forma, os dados indicam que foi validado um modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica associado à resistência insulínica e que o

extrato foi capaz de normalizar a glicemia, sensibilidade à insulina e ainda promover menor ganho de peso nos animais obesos.

Palavras-chave: camundongos, *chrysobalanus icaco*, obesidade, resistência à insulina.



**WHITE, PAS. Efeitos do extrato aquoso de abajeru (*Crhysobalanus icaco*) sobre o peso corporal, adiposidade e sensibilidade à insulina de camundongos obesos. 2011. 51p. Dissertação (Pós-graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.**

## **ABSTRACT**

Obesity is characterized by excessive accumulation of fat in the body. The anatomical location of the tissue, more specifically its abdominal (visceral) distribution, plays a major role in the development of insulin resistance, which acts as a key point linking obesity to the development of several other chronic diseases. Thus, research on new therapies that may positively affect the development and treatment of obesity and its co morbidities are needed. This study aimed at investigating the potential of aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* leaves (EACI) on the loss of weight and adipose tissue, and assessing its effects on insulin sensitivity in obese mice. Therefore, we used 34 *Swiss* mice divided into four groups which received a standard diet (SD), standard diet plus EACI (DPE), high-fat diet (HFD) and high-fat diet plus EACI (DHE), which was mixed to the drinking water of animals during the last 4 weeks of a total of 14weeks in which they received their diets. At the end of the experiment consumption, body weight, weight of fat pads, blood glucose, serum lipids, insulin sensitivity and glucose tolerance were evaluated. The results showed that the HC group had significant higher body mass ( $p < 0,001$ ), fat pads ( $p < 0,0001$ ), feed efficiency ( $p < 0,0001$ ) and blood glucose levels ( $p < 0,05$ ), besides higher area under curve ( $p < 0,05$ ) on the insulin tolerance test. After the 4<sup>th</sup> week of treatment, in the HAD group, the EACI promoted less weight gain ( $p < 0,05$ ), blood glucose ( $p < 0,05$ ) and insulin sensitivity ( $p < 0,05$ ) normalization, despite the high-fat diet intake. Regarding the adipose tissue there was little effect caused by the extract and no effect on the serum lipids and glucose tolerance. Thus, the data indicates that a model of high-fat induced obesity associated with insulin resistance was validated and that the extract was capable of normalizing the blood glucose levels and insulin sensitivity and still prevented the weight gain in the obese animals.

Keywords: mice, *chrysobalanus icaco*, obesity, insulin resistance.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Classificação internacional do IMC de acordo com a OMS.....	2
Tabela 2 - Espécies de plantas medicinais utilizadas no tratamento de roedores obesos e seus efeitos.....	12
Tabela 3 – Composição das dietas padrão e hiperlipídicas .....	17
Tabela 4 – Médias $\pm$ E.P.M. dos valores de peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo e eficiência energética.....	24
Tabela 5 - Médias $\pm$ E.P.M. dos valores de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL .....	30
Tabela 6 - Médias $\pm$ E.P.M. dos pesos em gramas dos coxins periepididimal, perirenal, retroperitoneal, soma dos coxins e índice de adiposidade.....	31
Figura 1 - Consumo de água ou EACI e de ração.....	21
Figura 2 – Evolução de massa corpórea.....	22
Figura 3 - IPITT (teste de tolerância à insulina intraperitoneal).....	26
Figura 4 - IPGTT (teste de tolerância à glicose intraperitoneal).....	28
Figura 5 – Glicemia.....	29
Figura 6 – Peso do músculo gastrocnêmio.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGs – Ácidos graxos

AGLs – Ácidos graxos livres

ASC – Área sob a curva

BDNF – Gene do fator neurotrófico derivado do cérebro

C/EBP $\alpha$  – Proteína amplificadora ligante ao Ccaat

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E.P.M. – Erro padrão da média

EACI – Extrato aquoso de *chrysobalanus icaco*

eNOS – Óxido nítrico sintase

ET-1 – Endotelina 1

GLUT4 – Transportadores de glicose subtipo 4

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HIV-1 – Vírus da imunodeficiência humana sub-categoria 1

HOMA – Modelo de avaliação da homeostase

ICAM-1 – *Intra-celular adhesion molecule 1*

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IMC – Índice de massa corpórea

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MCP1 – Proteína quimioatratadora de monócitos 1

MC4R – Receptor 4 da melanocortina

NHANES – *National Health and Nutrition Examination Surveys*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAI-1 – Inibidor 1 do ativador de plasminogênio

PCR – Proteína C reativa

PDK-1 – *Phosphoinositide dependent kinase 1*

PI 3 quinase – Fosfatidilinositol 3 quinase

PKB – Proteína quinase B

PKC – Proteína quinase C

PKD – Proteína quinase D

POF – Pesquisa de orçamento familiar  
POMC – Proopiomelanocortina  
PPAR $\gamma$ 2 – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama 2  
RBP4 – *Retinol-binding protein 4*  
RCQ – Relação cintura quadril  
RI – Resistência à insulina  
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro  
TA – Tecido adiposo  
TAIP – Tecido adiposo intraperitoneal  
TARP – Tecido adiposo retroperitoneal  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
TTIP – Teste de tolerância à insulina intraperitoneal  
TTGIP – Teste de tolerância à glicose intraperitoneal  
TZDs – Tiazolidinedionas  
SNC – Sistema nervoso central  
UNICAMP – Universidade de Campinas  
VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule 1*

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
1.1 Obesidade .....	1
1.2 Métodos de diagnóstico .....	2
1.3 Prevalência .....	3
1.4 Etiologia da obesidade .....	3
1.5 Distribuição do tecido adiposo .....	4
1.6 Tecido adiposo como órgão endócrino .....	5
1.6.1 Leptina .....	6
1.6.2 TNF- $\alpha$ .....	6
1.6.3 Adiponectina .....	7
1.6.4 PAI-1 .....	7
1.6.5 Resistina .....	7
1.7 Obesidade relacionada à resistência insulínica .....	8
1.7.1 Sinalização da insulina .....	8
1.7.2 Causas da resistência à insulina .....	9
1.7.3 Consequências da resistência à insulina .....	9
1.8 Obesidade e inflamação .....	10
1.9 Tratamento da Obesidade .....	11
1.9.1 Produtos naturais no tratamento da obesidade .....	11
1.9.1.1 Chrysobalanus icaco .....	13
2. Objetivos .....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
3. Materiais e métodos .....	16
3.1 Material botânico .....	16
3.1.1 Preparação do extrato .....	16
3.2 Métodos .....	16
3.2.1 Animais para experimentação .....	16
3.2.1.1 Condições experimentais .....	16
3.2.2 Dietas experimentais .....	17
3.2.3 Suplementação com o EACI .....	17

3.3 Delineamento do estudo.....	18
3.4 Avaliação do consumo alimentar, ingesta líquida e evolução ponderal dos animais.....	18
3.5 Análise da sensibilidade à insulina, tolerância à glicose e glicemia.....	18
3.5.1 TTIIP (teste de tolerância à insulina intraperitoneal.....)	18
3.5.2 TTGIP (teste de tolerância à glicose intraperitoneal.....)	19
3.5.3 Glicemia.....	19
3.6 Determinação dos lipídios.....	19
3.7 Retirada dos coxins adiposos e músculo gastrocnêmio.....	19
3.8 Análises estatísticas.....	20
4. Resultados.....	21
5. Discussão.....	33
6. Conclusões.....	39
7. Perspectivas.....	40
8. Referências.....	41
9. Anexos.....	50
9.1 Anexo - A.....	50
9.2 Anexo – B.....	51

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

Ao longo da história, os seres humanos evoluíram em um ambiente de escassez, no qual altos níveis de atividade física eram necessários para sobreviver e obter alimento. Os mecanismos fisiológicos centravam-se em evitar a perda de peso e não o ganho. As habilidades de conservação e de armazenamento de energia eram fundamentais à sobrevivência. Com o passar do tempo, o mundo moderno se transformou em um ambiente com variedades de alimentos baratos, fartos, palatáveis e de alta densidade energética, assim como de avanços tecnológicos criados para diminuir a atividade física, o que resultou numa forte e constante propensão à promoção do balanço energético positivo e consequentemente obesidade (HILL; CATENACCI; WYATT, 2009).

A obesidade pode ser definida como uma síndrome multifatorial que consiste em alterações fisiológicas, bioquímicas, metabólicas, anatômicas, além de alterações psicológicas e sociais, caracterizada pelo aumento de tecido adiposo e de peso corporal (ANGELIS, 2003). É um importante fator de risco para diversos tipos de doenças que levam à má qualidade de vida, morbidade considerável e morte prematura (HILL; CATENACCI; WYATT, 2009).

As comorbidades associadas à obesidade podem ser classificadas em quatro áreas principais. A primeira diz respeito aos problemas cardiovasculares, dentre eles a hipertensão, acidente vascular cerebral e doença arterial coronariana. A segunda área está relacionada a condições associadas à resistência insulínica. A terceira corresponde a certos tipos de câncer, principalmente os relacionados a hormônios (endometrial, ovariano, mama, colo do útero e prostático) e do intestino grosso. A quarta, por sua vez, refere-se às colecistopatias (OMS, 2004). Dentre essas doenças, destaca-se a associação entre diabetes e obesidade, uma vez que estimativas apontam que cerca de 80 a 90% dos indivíduos diabéticos são obesos e o risco está diretamente associado ao aumento do índice de massa corporal (SARTORELLI; FRANCO, 2003).

Outras condições debilitantes também podem estar presentes na obesidade, como dificuldades respiratórias, problemas músculo-esquelético crônicos, disfunções de pele e infertilidade. Outrossim, problemas psicológicos também estão associados, como a

discriminação, preconceito, insatisfação com a forma corpórea e distúrbios alimentares (OMS, 2004).

## 1.2 Métodos de diagnóstico

Para o diagnóstico da obesidade podem-se estabelecer basicamente dois tipos de classificação: o quantitativo e o qualitativo. O quantitativo se refere à massa corpórea ou à massa do tecido adiposo; o qualitativo se refere à distribuição de gordura corporal ou à presença de adiposidade visceral (MANCINI, 2006).

Um dos métodos quantitativos mais utilizados na prática clínica é o Índice de Massa Corpórea (IMC), que é o principal método utilizado para classificação graduada da obesidade. O IMC é um método simples que fornece a medida mais útil, embora grosseira, da obesidade em relação à população. É obtido pelo quociente do peso (kg), pelo quadrado da estatura (m) (OMS, 2004).

**Tabela 1: Classificação Internacional do IMC de acordo com a OMS.**

Classificação	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	
	Principais pontos de corte	Pontos de corte adicionais
Variação Normal	18.50 - 24.99	18.50 - 22.99
		23.00 - 24.99
Pré-obeso	25.00 - 29.99	25.00 - 27.49
		27.50 - 29.99
Obeso	≥30.00	≥30.00
Obeso grau I	30.00 - 34.99	30.00 - 32.49
		32.50 - 34.99
Obeso grau II	35.00 - 39.99	35.00 - 37.49
		37.50 - 39.99
Obeso grau III	≥40.00	≥40.00

Fonte: WHO.

Embora o IMC seja uma importante ferramenta para diagnóstico nutricional em populações, não diferencia a ampla variação na distribuição de gordura corpórea e pode não indicar o grau de gordura ou riscos de saúde associados em diferentes indivíduos e populações (OMS, 2004).

Quanto aos métodos qualitativos, os mais utilizados são a medida da circunferência abdominal e a relação cintura-quadril (RCQ). Estes também são recursos de simples execução e baixo custo, que podem fornecer um correlato mais



prático da distribuição de gordura abdominal e relação saúde-doença associados. A ressonância magnética e a tomografia computadorizada também são citadas na literatura, porém, são muito pouco utilizadas por seu custo oneroso (MANCINI, 2006).

### **1.3 Prevalência**

A obesidade é um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo, e está avançando de forma rápida e progressiva, sem diferenciar raça, sexo, idade ou nível social, de modo a ser considerada uma epidemia (REPETTO; RIZZOLLI; BONATTO, 2003). Os dados mais precisos sobre as mudanças nas taxas de obesidade e sobrepeso, ao longo do tempo, são provenientes da Pesquisa Americana sobre Saúde e Nutrição (*National Health and Nutrition Examination Surveys - NHANES*). Os dados do NHANES revelam que a prevalência da obesidade se manteve constante de 1960 a 1980, aumentando a partir daí, tanto para homens como para mulheres, em todas as faixas etárias e grupos raciais e étnicos estudados. De acordo com o NHANES 1999-2000, cerca de 64% da população norte-americana está acima do peso ou obesa (HILL; CATENACCI; WYATT, 2009).

No Brasil, os resultados da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2008-2009 revelaram o aumento da frequência de excesso de peso e obesidade a partir dos 5 anos de idade, independente dos grupos de renda e regiões do país. Na faixa etária entre 10 a 19 anos, o excesso de peso atinge cerca de 21,7% dos meninos e rapazes, e, 19,4% das meninas e moças. Entre a população adulta, esses dados são mais alarmantes, nos homens o excesso de peso passou para 50,1% e entre as mulheres para 48%.

### **1.4 Etiologia da obesidade**

As causas do aumento da obesidade no mundo ainda não estão suficientemente esclarecidas, mas um dado é certo, o aporte energético é cronicamente maior que o gasto energético. Na teoria, esse desequilíbrio poderia decorrer de um aumento no aporte energético, de uma diminuição do gasto energético ou da combinação dos dois fatores. O balanço positivo entre ingestão alimentar e o gasto energético determinaria o acúmulo de tecido adiposo e aumento de peso. Sabe-se que o gasto energético é produto da taxa metabólica basal, do efeito

térmico dos alimentos e da atividade física, sendo que cada um desses componentes pode ser influenciado por fatores genéticos (COUTINHO; DUALIB, 2006). Além dos fatores genéticos, fatores ambientais como má alimentação e sedentarismo e os fatores psicossociais e culturais também estão envolvidos e relacionados entre si no desenvolvimento da obesidade (CARVALHO; DUTRA; ARAÚJO, 2009).

No que diz respeito aos fatores genéticos, diversas mutações monogênicas já foram associadas com a obesidade grave e hiperfagia. A mutação no gene da leptina foi a primeira causa de obesidade monogênica humana, identificada em 1997 (HEYMSFIELD; REITMAN, 2008). Outras mutações já encontradas referem-se ao receptor da leptina (CLÉMENT et al., 1998), ao receptor 4 da melanocortina (MC4R) (SANTORO et al., 2009), ao PPAR $\gamma$ 2 (Receptores ativados por proliferadores de peroxisoma  $\gamma$ 2) (RISTOW et al., 1998), ao gene da pro-opiomelanocortina (POMC) (FAROOQI et al., 2006), e ao gene do fator neutrófico derivado do cérebro (BDNF) (FRIEDEL et al., 2005).

Além das mutações monogênicas, podem ocorrer também mutações poligênicas, representadas pela mutação de diversos genes. A mesma é a influência genética mais comumente manifestada e é resultante de diversos fatores gênicos que podem se interrelacionar de forma bastante complexa, deixando o indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento da obesidade (COUTINHO; DUALIB, 2006).

### **1.5 Distribuição do tecido adiposo**

Desde que a obesidade foi introduzida no “*International Classification of Diseases*” meio século atrás, pesquisas, com o intuito de tentar entender como o excesso de gordura predispõe a doenças crônicas, têm se direcionado para a localização específica dessa gordura no corpo. O tecido adiposo tem uma grande variabilidade em sua distribuição e sua natureza heterogênea indica que diferentes tipos e localização da gordura têm ações distintas. Nos anos 50 foi proposto que o excesso de gordura localizado no tronco (ou andróide) poderia levar a maiores complicações metabólicas que a gordura localizada nos quadris (ou ginóide). Essa proposta vem sendo confirmada por um grande número de estudos e agora é reconhecido que a obesidade abdominal (ou central) tem papel primordial no desenvolvimento da síndrome metabólica, tendo a resistência à insulina (RI) como

um ponto chave ligando a gordura abdominal ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas (DULLOO; ANTIC; MONTANI, 2004).

Garg (2004) também denomina a região intra-abdominal como sendo a mais peculiar em relação à distribuição de gordura corporal. Relata que nesta região, o tecido adiposo poderia ainda ser subdividido em intraperitoneal (TAIP) e retroperitoneal (TARP), sendo que o intraperitoneal teria maior relação com a RI, uma vez que ele drena diretamente para o fígado, através da veia porta, comparado ao TARP, que drena para a circulação sistêmica. Dessa forma, é provável que os ácidos graxos livres (AGLs), glicerol e outras adipocinas liberadas pelo TAIP possam ter efeitos prejudiciais no metabolismo hepático da glicose, triglicerídeos, insulina e outros substratos e hormônios.

Lebovitz e Banerji (2005), apoiam a idéia de que o aumento da gordura visceral é a principal via pela qual a obesidade leva à RI e ao desenvolvimento da síndrome metabólica. Uma das principais bases que corroboram com essa teoria seriam os estudos que demonstram que a remoção cirúrgica de depósitos de gordura subcutânea não alteraria os níveis de glicose ou insulina dos pacientes (KLEIN et al., 2004), enquanto que a remoção de gordura visceral (em ratos) reverteria a RI (BARZILAI et al., 1999).

A gordura subcutânea, de fato, é responsável pela liberação da maioria dos AGLs encontrados na circulação quando comparada à gordura visceral (NIELSEN et al., 2000; GARG, 2004). Entretanto, esta última é responsável pela liberação de uma variedade e quantidade maior de adipocinas e citocinas inflamatórias, que, por sua vez, influenciam de forma direta e indireta no desenvolvimento da RI (FRAYN, 2000).

## **1.6 Tecido adiposo como órgão endócrino**

Até duas décadas atrás, as principais funções atribuídas ao tecido adiposo (TA) eram produção de energia, proteção térmica e mecânica. Atualmente, além dessas propriedades, o TA é considerado um órgão endócrino por produzir uma grande variedade de produtos biologicamente ativos, denominados adipocinas, que influenciam a sensibilidade das células à ação da insulina, o metabolismo da glicose e a resposta inflamatória. Dentre as adipocinas e citocinas de maior destaque produzidas pelo TA estão: a leptina, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a

adiponectina, o inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1) e a resistina (LIMA; CURI, 2008).

### **1.6.1 Leptina**

A leptina, produto do gene *ob*, é expressa principalmente pelo tecido adiposo branco, especialmente pelo tecido subcutâneo, sendo sua secreção diretamente proporcional ao número e volume dos adipócitos (CEDDIA et al., 1998). A mesma atua no metabolismo de forma indireta, por meio da sinalização dos centros localizados no sistema nervoso central (SNC), promovendo a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, e também de forma direta, agindo especificamente sobre a célula alvo, seja no pâncreas endócrino, músculo esquelético ou tecido adiposo (PIJL, 2007).

Em condições fisiológicas, no pâncreas, a leptina é responsável pela supressão da secreção da insulina (JANEČKOVÁ, 2001). No músculo, promove aumento da oxidação de AGLs, do consumo de glicose e síntese de glicogênio. No tecido adiposo, inibe a lipogênese e estimula a lipólise (CEDDIA et al., 1998). Entretanto, com o aumento da massa adiposa ocorre também um aumento anormal dos níveis de leptina, levando à perda da sensibilidade à mesma ou à resistência leptínica, favorecendo a um controle inadequado do armazenamento de energia, culminando na obesidade (PIJL, 2007).

### **1.6.2 TNF- $\alpha$**

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória e imunomodulatória, produzida por macrófagos e monócitos (BEDOUI et al., 2005). Está implicado na apoptose, citotoxicidade, produção de outras citocinas (interleucina 1 -IL- 1 e interleucina 6 - IL- 6) e indução de resistência à insulina. Essa citocina também é expressa pelo tecido adiposo, funcionando como um modulador chave no metabolismo dos adipócitos, inibindo a lipogênese e estimulando a lipólise (LIMA; CURI, 2008). O TNF- $\alpha$  pode agir também diretamente no adipócito, regulando a liberação do *pool* de leptina pré-formada. Dessa forma, a expressão aumentada dessa citocina no tecido adiposo de indivíduos obesos pode contribuir para a hiperleptinemia relacionada à obesidade (KIRCHGESSNER, 1997).

### **1.6.3 Adiponectina**

Outra adipocina também de grande importância no controle do peso é a adiponectina. Produzida exclusivamente pelos adipócitos, de maneira inversamente

proporcional ao tamanho e número dos mesmos, é a única adipocina que se encontra reduzida no obeso (FASSHAEUER et al., 2002).

A Adiponectina tem ação sobre o músculo, tecido adiposo, fígado, vaso e cérebro. No músculo atua de forma a aumentar a oxidação de ácidos graxos (AGs) e a captação de glicose estimulada por insulina. No fígado, potencializa o efeito da insulina na inibição da glicogenólise (YAMAUCHI et al., 2002). No vaso, acredita-se que esteja presente durante o processo de lesão e atua aumentando a produção de óxido nítrico (CHEN et al., 2003), inibindo a expressão de moléculas de adesão celular e intracelular (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin), bem como a adesão de monócitos às células endoteliais, induzidas pelo TNF- $\alpha$  (HOTTA et al., 2000). Quanto à sua atividade no cérebro, estudos recentes sugerem que ela age aumentando o gasto energético e promovendo perda de peso (QI et al., 2004).

#### **1.6.4 PAI-1**

O PAI-1 é uma serinaprotease inibidora envolvida no processo de fibrinólise, angiogênese e aterogênese. É secretada por células endoteliais, do músculo liso vascular, hepatócitos, fibroblastos, células inflamatórias e principalmente por adipócitos, especialmente os de localização visceral (JUHAN-VAGUE; VAGUE, 1991; SHIMOMURA et al., 1996). Estudos indicam que a ausência de PAI-1 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica está relacionada a menor ganho de peso, adiposidade, melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à ação da insulina (MA et al., 2004).

#### **1.6.5 Resistina**

A resistina é uma proteína pertencente à família de proteínas secretórias ricas em cisteína. Funciona como uma molécula sinalizadora induzida durante a adipogênese e secretada pelos adipócitos. Foi descoberta em 2001 e assim denominada pela sua capacidade de promover resistência à insulina em roedores. Os níveis de resistina encontram-se elevados em camundongos obesos geneticamente e induzidos por dieta hiperlipídica, assim como em indivíduos obesos mórbidos (STEBAN, 2001; SAVAGE; SEWTER; KLENK, 2001).

Estudos mostram que a neutralização da resistina melhora a captação de glicose estimulada por insulina e reverte a hiperglicemia, indicando que além do tecido adiposo, o músculo também pode ser alvo da resistina, uma vez que este é o

principal responsável pela captação de glicose. Isso sugere que a mesma possa ter efeitos no metabolismo da glicose antagônicos aos da insulina (STEPPAN, 2001).

## **1.7 Obesidade relacionada à resistência insulínica**

O conceito de resistência insulínica, ou mais especificamente redução da sensibilidade à ação da insulina, foi introduzido em 1939, para definir a relação entre uma deficiente resposta glicêmica à insulina exógena, encontrada num grupo de pessoas obesas com diabetes. Inicialmente, foi demonstrado que a obesidade induzia um aumento da RI, que, por sua vez, aumentava o estresse secretor das células  $\beta$ -pancreáticas, levando a um hiperinsulinismo e posterior insuficiência e exaustão das células  $\beta$ . Mais tarde, foi observado que a resistência à insulina não se restringia apenas ao metabolismo glicídico, mas também à proliferação e diferenciação celular, metabolismo glicídico, lipídico e protéico à função vascular endotelial e à expressão genética. Portanto, a RI pode ser definida como um estado patológico comum na qual as células alvo, por diminuição ou deficiência na sinalização da insulina, têm uma resposta insuficiente aos níveis normais de insulina circulante (CARVALHEIRO, 2009).

### **1.7.1 Sinalização da insulina**

A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, com atividade quinase intrínseca, composto por duas subunidades  $\alpha$  e outras duas subunidades  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase, levando à alteração conformacional e à autofosforilação do receptor nas subunidades  $\beta$  em múltiplos resíduos de tirosina, aumentando ainda mais sua atividade quinase. Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina, dentre eles, os substratos dos receptores de insulina (MACHADO et al., 2008).

A ligação dos sítios YMXM e YXXM fosforilados das proteínas dos substratos dos receptores de insulina ao domínio SH2 da subunidade p85 da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-quinase) ativa o domínio catalítico associado da subunidade p110. A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol, produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3-4-difosfato e fosfatidilinositol-3-4-5-trifosfato. Este último pode regular a PDK-1 (*phosphoinositide-dependent-kinase 1*), que por sua vez fosforila e ativa a proteína

quinase B (PKB ou Akt), que promove o transporte de vesículas de GLUT4 (transportadores de glicose tipo 4) para a membrana, permitindo a captação de glicose para dentro da célula (MACHADO et al., 2008).

Além da Akt, acredita-se que a PDK-1, em resposta à insulina, também seja capaz de fosforilar isoformas atípicas da PKC ( $\zeta$  e  $\lambda$ ) que também estão envolvidas na síntese protéica, no transporte das vesículas de GLUT4 e consequente captação da glicose (MACHADO et al., 2008).

### **1.7.2 Causas da resistência à insulina**

A RI na obesidade e no diabetes tipo 2 pode ser causada por alterações em diversos pontos da via de transmissão do sinal da insulina, seja através da redução da concentração e da atividade quinase do receptor de insulina, da concentração e da fosforilação dos substratos do receptor de insulina 1 e 2, da atividade da fosfatidilinositol-3-quinase, da translocação do GLUT4 e da atividade das enzimas intracelulares (MACHADO et al., 2008).

### **1.7.3 Consequências da resistência insulínica**

Sob o ponto de vista metabólico, a RI evidencia-se nas células hepáticas, musculares e adiposas, sendo que o músculo e o tecido adiposo são os principais responsáveis pela utilização de glicose pós-prandiais. No fígado, a resistência aos efeitos da insulina pode levar à insuficiente inibição da glicogenólise e da gliconeogênese, resultando numa hiperglicemia de jejum. No músculo, ocorre redução da captação de glicose e defeitos na atividade da glicogênio sintetase muscular, levando ao aumento da glicose pós-prandial. No tecido adiposo, ocorre diminuição da captação de AGLs e diminuição da inibição da lipólise, resultando num aumento dos níveis circulantes de AGLs e consequentemente na inibição da utilização periférica de glicose, aumento da gliconeogênese hepática, contribuindo para a hiperglicemia e a RI (MARTINS, 2009).

De acordo com Shulman (2000), a presença de elevados níveis de AGLs no plasma leva a uma deposição de gordura nas células musculares e induz o desenvolvimento de RI, por meio da inibição da ação dos transportadores de glicose, acompanhada da redução na síntese de glicogênio muscular e oxidação da glicose. Mais especificamente, os AGLs promovem a inibição da ativação da PI3-quinase, possivelmente devido à ativação da cascata serina/treonina, através da fosforilação dos substratos dos receptores de insulina em serina/treonina, o que inibiria a ativação

da PI3-quinase, resultando numa redução da translocação de GLUT4 e captação de glicose.

Além do músculo esquelético, essa deposição ectópica de gordura pode ocorrer de forma notável também em células do coração, fígado, rins, pâncreas e nos vasos sanguíneos. Estes, quando sobrecarregados, podem sofrer disfunção (lipotoxicidade) e até mesmo morte programada da célula induzida por lipídio (lipoapoptose) (DULLOO; ANTIC; MONTANI, 2004). Além disso, a presença de gordura ectópica pode também conferir ao tecido a capacidade de produção de adipocinas, a exemplo da adiponectina, leptina e RBP-4 (*retinol-binding protein-4*), principalmente pelo músculo esquelético e fígado, provocando resultados fisiológicos danosos (PERSEGUIN et al., 2007).

### **1.8 Obesidade e inflamação**

O reconhecimento da ligação entre inflamação e obesidade data de 1993, quando foi detectado o aumento do TNF- $\alpha$  no tecido adiposo de roedores obesos, contribuindo para a resistência à insulina dos mesmos (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Além desta, outras citocinas inflamatórias também são notavelmente produzidas pelo TA, a exemplo da IL-1, IL-6, MCP-1 (proteína quimioatratora de monócitos -1) e da proteína C reativa (PCR), caracterizando a obesidade como um estado de inflamação crônica (XU et al., 2003).

Outros estudos vieram em seguida, mostrando a presença de macrófagos em crianças obesas e adultos, além de camundongos, de forma proporcional ao excesso de peso (WEISBERG et al., 2003). De acordo com Xu et al. (2003), diversos genes inflamatórios e macrófagos-específicos estão drasticamente aumentados no tecido adiposo branco de modelos de obesidade genética e induzida por dieta hiperlipídica em ratos. Neste último modelo, a expressão é progressivamente acentuada de acordo com o tempo de indução da dieta e precede o aumento notável de insulina circulante.

É importante esclarecer que a inflamação não é a causa inicial da obesidade. A mesma é resultante do balanço energético positivo e aumento de massa gorda. Entretanto, a obesidade frequentemente leva à inflamação que surge inicialmente em certos depósitos de gordura. Esta, por sua vez, pode exacerbar a obesidade por meio da alteração de reguladores derivados do adipócito em alguns indivíduos obesos e resultar numa resistência à sinalização da insulina (STEHNO-BITTEL, 2008).



## **1.9 Tratamento da obesidade**

Diante dessa complexidade que envolve essa doença epidêmica global, a qual também é responsável pela alarmante prevalência de diabetes tipo 2 e de várias doenças cardiovasculares (DULLOO; ANTIC; MONTANI, 2004), entender a fisiopatologia da obesidade é um assunto de grande importância, assim como o desenvolvimento de novas estratégias que possam prevenir e tratar esse grande problema de saúde pública. Estratégias essas que promovam melhora na saúde e na qualidade de vida, através da redução de peso significativa e duradoura, e, que minimizem os fatores de risco e comorbidades associados.

De acordo com Zilberstein, Neto e Ramos (2001) o tratamento deve ser seguido em três linhas. A primeira diz respeito ao tratamento conservador (clínico), com dieta supervisionada em combinação com terapia de apoio psicológico e programa de exercícios. A segunda seria o tratamento farmacológico associado à dieta, psicoterapia e exercícios. A terceira linha, utilizada somente em casos de obesidade mórbida, quando houver falha das outras duas linhas, seria o tratamento cirúrgico.

Apesar da diversidade de tratamentos, há um grande percentual de insucessos terapêuticos, principalmente quanto à manutenção dos resultados obtidos, que na maioria dos casos acontece por falta de adesão ao tratamento. Outro fator que interfere bastante neste aspecto é a interrupção do tratamento farmacológico, favorecendo a recuperação parcial ou total do peso perdido. Todas as drogas utilizadas possuem um período limite de utilização, nenhum tipo de droga pode ser recomendado para uso rotineiro, seja pela gama de efeitos adversos que ela pode promover ou pelo efeito de adaptação do organismo (WANNMACHER, 2004).

### **1.9.1 Produtos naturais no tratamento da obesidade**

Tendo em vista a gravidade deste problema de saúde pública, a cada ano são intensificadas as pesquisas acerca de novos tratamentos que auxiliem na prevenção e tratamento da obesidade e suas comorbidades. Nas últimas duas décadas, vem crescendo, em nível mundial, a utilização de plantas medicinais que tem base na tradição familiar e tornou-se prática generalizada na medicina popular. Atualmente, muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização deste recurso, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados e o difícil acesso da população à assistência médica (SIMÕES et al., 1998).

Algumas plantas medicinais já foram utilizadas no tratamento da obesidade a exemplo da *Chitin- chitosan* (HAN; KIMURA; OKUDA, 1999), *Camellia sinensis* (chá verde) (BOSE et al., 2008), *Ilex paraguariensis* (erva mate) (MARTINS et al., 2010), Ginseng selvagem (YUN et al., 2004), *Glycyrrhiza uralensis* (MAE et al., 2003) e *Exodia rutaecarpa* (KOBAYASHI et al., 2001), com resultados bastante relevantes. Alguns dos efeitos obtidos por estas espécies em roedores obesos estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2: Espécies de produtos naturais utilizadas no tratamento de roedores obesos e seus efeitos.**

<b>Espécie</b>	<b>Efeitos</b>
<b>Chitin- chitosan</b>	redução do ganho de peso, aumento da excreção de TG nas fezes e redução dos níveis de TG, CT e ácidos graxos livres (AGLs) no soro.
<b>Camellia sinensis</b>	redução do ganho de peso, da porcentagem de gordura corporal e gordura visceral, atenuação da resistência insulínica, dos níveis de colesterol total e melhora de parâmetros inflamatórios.
<b>Ilex Paraguariensis</b>	prevenção do ganho de peso, redução dos níveis de TG e LDL.
<b>Ginseng selvagem</b>	melhora da sensibilidade à insulina, redução dos níveis de TG e AGLs e redução do tamanho do adipócito.
<b>Glycyrrhiza uralensis</b>	redução dos níveis de glicose, do peso relativo da gordura abdominal e supressão do aumento da pressão sanguínea.
<b>Exodia rutaecarpa</b>	redução do peso, dos coxins adiposos, do TG, CT e AGLs no fígado, além de aumento da atividade lipolítica.

### **1.9.1.1 *Chrysobalanus icaco***

A espécie *Chrysobalanus icaco*, embora ainda não tenha sido relatada no tratamento da obesidade, apresenta estudos que mostram sua ação em algumas das comorbidades associadas a esta patologia, dentre elas o diabetes e a inflamação (BARBOSA et al., 2007; CASTILHO et al., 2000).

Essa espécie pertence à família Chrysobalanaceae e é também conhecida como abajeru, icaco, coco plum ou guajiru. Tem origem na América e África Tropical, mas atualmente está adaptada em regiões similares em todo o mundo, desde ao sul dos Estados Unidos até Brasil, Equador e Venezuela, incluindo as Antilhas (BRITO et al., 2007; RAMÍREZ-VILLALOBOS; URDANETA-FERNÁNDEZ; VARGAS-SIMÓN, 2004).

As partes da planta utilizadas para consumo são os frutos, as folhas, as raízes e também as sementes, embora seja um consumo bastante limitado devido à falta de informação sobre seu conteúdo.

Os frutos são extremamente ricos em antocianinas do tipo cianidina, delphinidina, peonidina e petunidina, sendo que esta última em maior quantidade (BRITO et al., 2007; VARGAS-SIMÓN G, SOTO-HERNÁNDEZ R M, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2002). A presença de antocianinas confere ao fruto propriedades antioxidantes, protetora contra danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e também quimioprotetoras (BRITO et al., 2007; GUEDES, 2004). Vargas et al. (2000) relatam ainda a presença em notável quantidade de ácido ascórbico e de alguns minerais como cálcio e fósforo.

As folhas da planta normalmente são utilizadas em forma de extrato aquoso (chá), extrato etanólico (tintura) ou como extrato metanólico. Dentre essas formas, o aquoso é o mais comum. Estudos realizados em nosso laboratório revelaram a presença de taninos flobadêmicos, flavonas, chalconas, auronas, leucoantocianidinas, catequinas, saponinas e alcalóides neste tipo de extrato, com resultados significativos sobre o seu potencial antioxidante. Barbosa e Peres (2002 apud BARBOSA et al., 2006) revelam ainda a presença de rutina (flavonol glicosídeo) neste mesmo extrato. Alguns efeitos obtidos a partir deste referem-se à redução dos níveis sanguíneos de glicose (PRESTA; PEREIRA, 1987), melhora do HDL (BARBOSA et al., 2007), efeito analgésico e anti-inflamatório (CASTILHO et al., 2000), além de ação protetora contra danos ao DNA plasmidial (PRESTA, FONSECA; BERNARDO-FILHO, 2007).

No extrato etanólico foi identificada a presença de rutina, quercitrina e miricitrina, flavonóis glicosídeos pertencentes à subclasse das flavonas. Esses flavonóis possuem propriedades anti-inflamatória (HIERMANN; SCHARAMM; LAUFER, 1998; STEWART et al., 2008; RIVERA et al., 2008), hipoglicemiantes

(BABUJANARTHANAM; KAVITHA; PANDIAM, 2010) e antilipogênica (SHISHEVA; SHECHTER, 1992; IWASHITE; YAMAKI; TSUSHIDA, 2001), além de efeitos sobre a melhora da sensibilidade à insulina no músculo (LUI et al., 2007).

Por sua vez, no extrato metanólico, foi identificado o ácido pomólico. Estudos observaram ação antiangiogênica deste extrato, apresentando atividade contra células humanas cancerosas (K562) resistentes a múltiplas drogas e contra uma linhagem de células de leucemia (Lucena 1) também resistentes a múltiplas drogas (FERNANDES et al., 2003).

As raízes normalmente são maceradas e adicionadas à água e ingeridas diariamente no tratamento de inflamações e do diabetes (AGRA et al., 2007). Gustafson et al. (1991) relataram a presença de diterpenos no extrato orgânico das raízes de abajeru. De acordo com estes mesmos autores, esse extrato tem ação inibitória contra infecção por vírus da imunodeficiência humana sub-categoria 1 (HIV-1) *in vitro*.

Com relação às sementes, Zúñiga (1981), em estudo sobre composição de ácidos graxos de alguns tipos de sementes, identificou-se que o óleo da semente da abajeru possui dois tipos de ácidos graxos, o ácido licânico e o ácido parinárico. Edema et al. (2007) observaram grande redução de peso em ratos suplementados com sementes de abajeru, proporcional à concentração de semente ingerida. Entretanto, dentre as concentrações utilizadas (10, 25, 50 e 75%), apenas a de 10% não promoveu efeito tóxico.

Diante das propriedades antioxidante, hipoglicemiante e anti-lipogênica observada nos extratos das folhas de abajeru, e, em função da necessidade de novas terapêuticas que possam contribuir para a prevenção e tratamento da obesidade, este estudo veio com o propósito de investigar possíveis efeitos do extrato aquoso de *C. icaco* nesta doença e em condições normalmente associadas à mesma.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Verificar o efeito do extrato aquoso das folhas de Abajeru (*Chrysobalanus icaco*) (EACI) sobre a adiposidade, sensibilidade à insulina e tolerância à glicose de camundongos *Swiss* obesos.

### 2.2 Específicos

- Validar modelo de obesidade associada à resistência insulínica induzida por dieta hiperlipídica em camundongos *Swiss*;
- Avaliar os efeitos do EACI sobre a ingesta líquida, consumo alimentar e massa corporal;
- Avaliar os efeitos do EACI sobre a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose;
- Avaliar os efeitos do EACI sobre a glicemia e perfil lipídico (CT, TG, HDL e LDL);
- Avaliar os efeitos do EACI sobre peso dos coxins adiposos periepididimal, perirenal e retroperitoneal e sobre o índice de adiposidade.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material Botânico

Foi utilizado neste estudo o extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco*. As mesmas foram coletadas no mês de fevereiro do ano de 2008, no povoado de Jatobá, no município de Pirambu, registrado sobre o número ASE 11855, no herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe, e levadas ao Departamento de Fisiologia para a preparação do extrato.

#### 3.1.1 Preparação do Extrato

Folhas secas e trituradas de *Chrysobalanus icaco* foram submetidas à extração por infusão em água destilada à 100° C numa proporção de 50g de folhas para 1 litro de água. A solução obtida foi mantida em repouso e resfriada em temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. Em seguida, filtrada em papel de filtro e liofilizada, sendo armazenada a -20°C para posterior utilização.

### 3.2 Métodos

O protocolo experimental dessa pesquisa foi submetido à Comissão Científica de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe e aprovado sobre o protocolo CEPA 40/2010.

#### 3.2.1 Animais para experimentação

Foram utilizados 32 camundongos da linhagem *Swiss*, machos, saudáveis, recém-desmamados (21 a 23 dias), obtidos comercialmente do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - Universidade de Campinas (UNICAMP). Após semana de adaptação, os animais foram divididos aleatoriamente, objetivando a homogeneidade de peso corporal, tanto intra quanto intergrupo, em 4 grupos com 8 animais cada. Os grupos foram denominados: DP - grupo que recebeu dieta padrão por 14 semanas (controle negativo); DPE - grupo que recebeu dieta padrão por 14 semanas e extrato aquoso de *Crhysobalanus icaco* (EACI) nas 4 últimas semanas; DH – grupo que recebeu dieta hiperlipídica por 14 semanas (controle positivo); e, DHE – grupo que recebeu dieta hiperlipídica por 14 semanas e EACI nas 4 últimas semanas.

##### 3.2.1.1 Condições experimentais

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com água e alimentação “ad libitum”, ciclo de claro/escuro de 12 horas e temperatura na faixa de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  durante todo o experimento. Nos grupos que fizeram ingestão do EACI a administração foi realizada na água de beber, também “ad libitum”.

### 3.2.2 Dietas experimentais

Dois tipos de dietas foram utilizados neste experimento. Uma dieta padrão (ou normolipídica) e uma hiperlipídica para ganho de peso, durante 14 semanas. As dietas foram obtidas comercialmente da PragSoluções, cujas composições estão especificadas abaixo.

**Tabela 3.** Composição das dietas

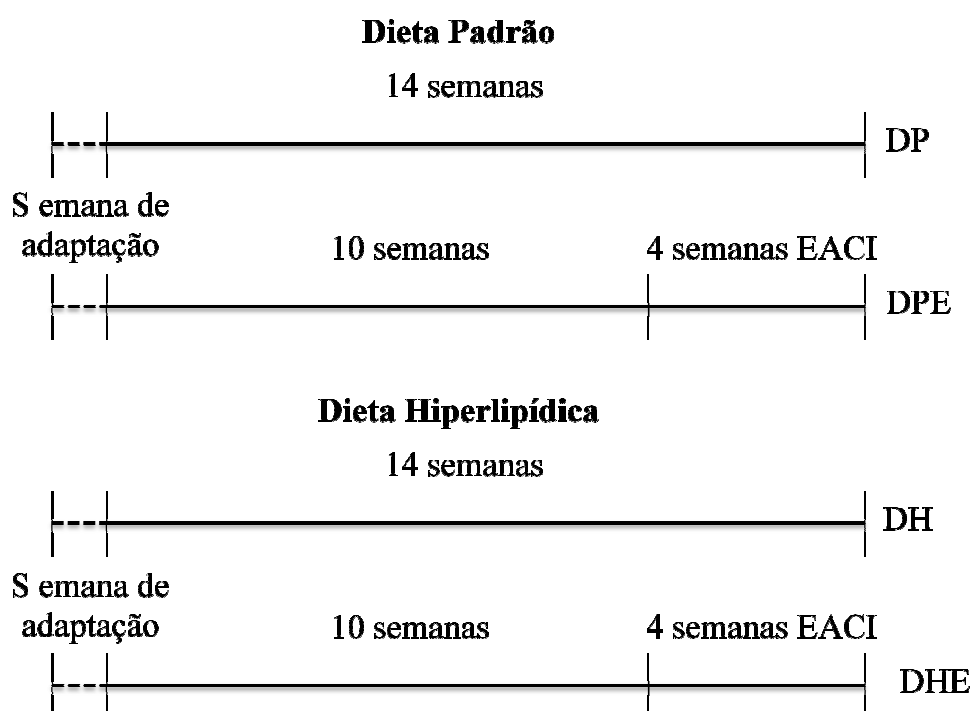
Ingredientes	<i>Padrão</i>				<i>Hiperlipídica</i>			
	p/ 1 kg	U	kcal	%	p/ 1 kg	U	kcal	%
Amido de milho	415,0 g		1660		14,3 g		57,2	
Farelo de soja	305,0 g		1281		410,0 g		1722	
Sacarose	80,0 g		320		80,0 g		320	
Maltodextrina	70,0 g		280		70,0 g		280	
Banha	0,0 g		0		302,0 g		2718	
Óleo de soja	0,0 g		0		0,0 g		0	
Ac. Graxo soja	50,0 g		350		50,0 g		350	
Celulose microcrista	31,7 g		0		25,4 g		0	
L-cistina	1,8 g		7,2		1,8 g		7,2	
Cloreto colina	1,5 g		0		1,5 g		0	
Butil-hidroxitolueno	0,014 g		0		0,028 g		0	
Mix min.mod50gps	35,0 g		0		35,0 g		0	
Mix vitamina	10,0 g		40		10,0 g		40	
<b>Carboidrato</b>				<b>73,9%</b>				<b>26,3%</b>
<b>Proteína</b>				<b>14,8%</b>				<b>14,4%</b>
<b>Lipídio</b>				<b>9,8%</b>				<b>57,6%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>1000,0 g</b>		<b>3938</b>		<b>1000,0 g</b>		<b>5494</b>	

### 3.2.3 Suplementação com extrato aquoso

Os extratos aquosos, em temperatura ambiente, foram oferecidos aos camundongos dos grupos DPE e DHE durante as 4 últimas semanas em que foram oferecidas as dietas, na dose estimada de 200mg/kg do animal e de forma “ad libitum”. As doses eram ajustadas duas vezes por semana de acordo com o peso do animal e com a concentração do extrato (mg/mL), obtida a partir da divisão da massa

do extrato em mg (correspondente à dose de 200mg/kg) pela média do consumo líquido em ml de cada animal, a cada 3-4 dias. Obtida a concentração, que variou numa faixa estimada de 0,00002 a 0,0003% (0,0002 a 0,003 mg/mL), a dose era então ajustada para uma quantidade maior de líquido, 3ml a mais em relação ao consumo normal do animal, evitando dessa forma que o extrato acabasse antes de ser repostado. Essa reposição era realizada diariamente.

### 3.3 Delineamento do estudo



### 3.4 Avaliação do consumo alimentar, ingestão líquida e evolução ponderal dos animais

Durante o experimento, a avaliação do consumo da dieta, água e do extrato aquoso foi realizada diariamente e o ganho de massa corpórea dos animais verificado duas vezes por semana.

### 3.5 Análise da sensibilidade à insulina, tolerância à glicose e glicemia

#### 3.5.1 TTIIP (teste de tolerância à insulina intraperitoneal)

Ao final das 14 semanas, a glicose foi mensurada por meio de sangue obtido da veia da cauda do animal, utilizando-se o glicosímetro Accu-check (Roche), de



acordo com as especificações do fabricante. Após a aferição da a glicemia basal, foi então injetada insulina humana regular (Insunorm R - 100U/ml, Celiofarm), intraperitonealmente, na proporção de 0,75 U/kg, e a glicemia sanguínea mensurada novamente nos tempos 10, 20, 30, 40, 60 e 120 min pós-injeção (ASENSIO et al., 2005).

### **3.5.2 TTGIP (teste de tolerância à glicose intraperitoneal)**

Ao final das 14 semanas, 48 horas após o TTIP, a glicose foi mensurada por meio de sangue obtido da veia da cauda do animal, em jejum de 16h, utilizando o glicosímetro Accu-check (Roche), de acordo com as especificações do fabricante. A glicose, a 50%, foi administrada intraperitonealmente, na proporção de 1mg de glicose por g de peso do animal. A glicemia foi mensurada novamente nos tempos 10, 20, 30, 40, 60 e 120 min pós-injeção (ASENSIO et al., 2005).

### **3.5.3 Glicemia**

A glicemia foi aferida no mesmo dia da realização do TTGIP, porém, 4h antes do início do teste, ou seja, com os animais em jejum de 12 horas. Para determinação da mesma, foi também obtido sangue da veia da cauda do animal e glicemia mensurada por meio do glicosímetro Accu-check (Roche) de acordo com as especificações do fabricante.

## **3.6 Determinação dos lipídios**

Dois dias após a realização do TTGIP, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório e o sangue coletado através da veia cava inferior, após jejum de 12h. As amostras de sangue foram coletadas com seringas de 3mL e escoadas suavemente sem agulha pela parede dos tubos de polietileno sem anticoagulante, previamente identificados. Em seguida centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e o soro sobrenadante separado com a ajuda de pipeta, colocado em microtubo tipo eppendorf, identificado e congelado em freezer até o momento da análise.

Para a avaliação do colesterol total, HDL e triglicerídeos foram utilizados kits enzimáticos colorimétricos. Para determinação do valor de LDL foi utilizada a fórmula de Friedwald.

## **3.7 Retirada dos Coxins Adiposos e músculo gastrocnêmio**

Após anestesia e coleta do sangue dos animais, foram retirados os tecidos adiposos periepídimal, perirenal e retroperitoneal, além do músculo gastrocnêmio. Em seguida, os mesmos foram mergulhados em solução salina, sendo o excesso da solução absorvido com gaze, e, imediatamente pesados.

### **3.8 Análises Estatísticas**

Os resultados foram representados em média  $\pm$  EPM e a comparação entre eles realizada por Teste T e Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com pós-teste de Bonferroni. Foi considerado o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). O valor crítico de F de acordo com seu grau de liberdade foi também calculado e comparado aos valores de F obtidos pela ANOVA.

## 4. RESULTADOS

Durante as 14 semanas de observação os animais tiveram o consumo de água, EACI e ração mensurados diariamente (Figura 1 A e B).

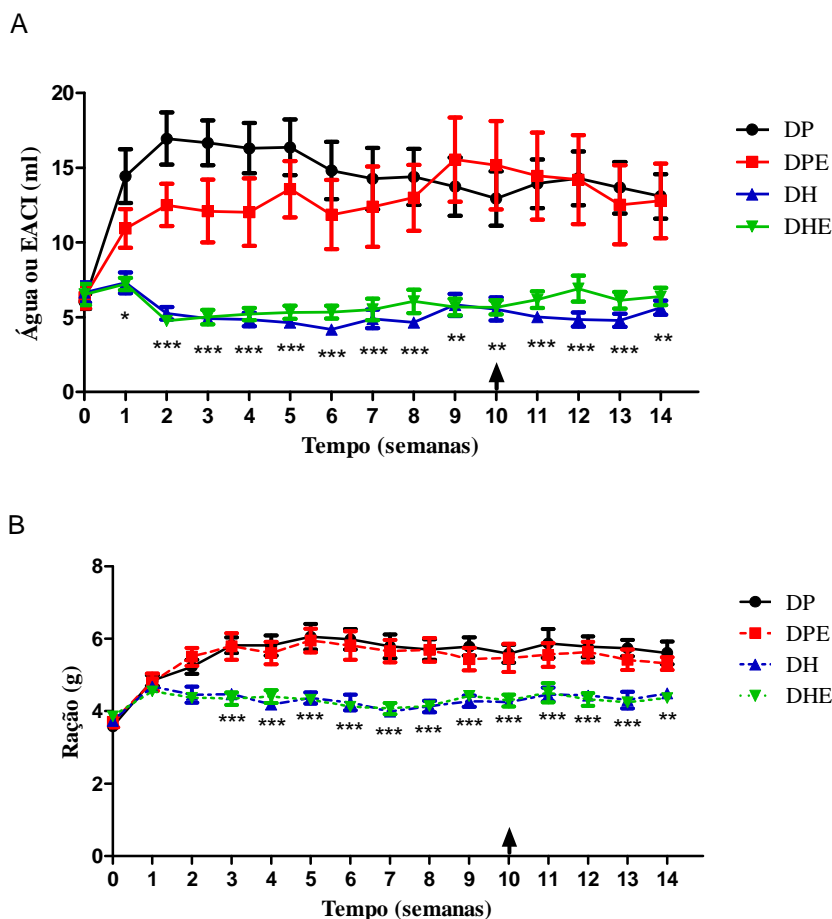


Figura 1: Consumo de água, EACI e ração apresentados pelos grupos controles submetidos à dieta padrão (DP) ou à dieta hiperlipídica (DH), e, dos respectivos grupos tratados, submetidos à dieta padrão + EACI (DPE) e dieta hiperlipídica + EACI (DHE). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M da ingestão de água ou EACI (ml) e do consumo de ração (g) mensurados diariamente (n = 8). A seta, localizada na décima semana, representa o ponto a partir do qual os grupos DPE e DHE passaram a receber o EACI ao invés de água. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001 vs DP. ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 28} = 2,9$ . Valor de F calculado no consumo de água ou EACI para interação = 1,4; no consumo de ração para interação = 1,9.

Analisando a figura 1 é possível observar que os grupos que receberam dieta padrão tiveram a média do consumo significativamente maior de ração quando comparados aos que receberam dieta hiperlipídica. Essa diferença mostrou-se significativa desde a primeira semana ( $p < 0,05$ ), em relação ao consumo de água e extrato, e, desde a terceira semana ( $p < 0,001$ ) com relação ao consumo de ração.

A partir desses dados verificamos também que a ingestão líquida, assim como o consumo de ração, não foram alterados a partir do momento em que os grupos passaram a receber o extrato na décima semana.

Uma vez observados os consumos, foi então avaliada a evolução ponderal a partir das mensurações realizadas duas vezes por semana.

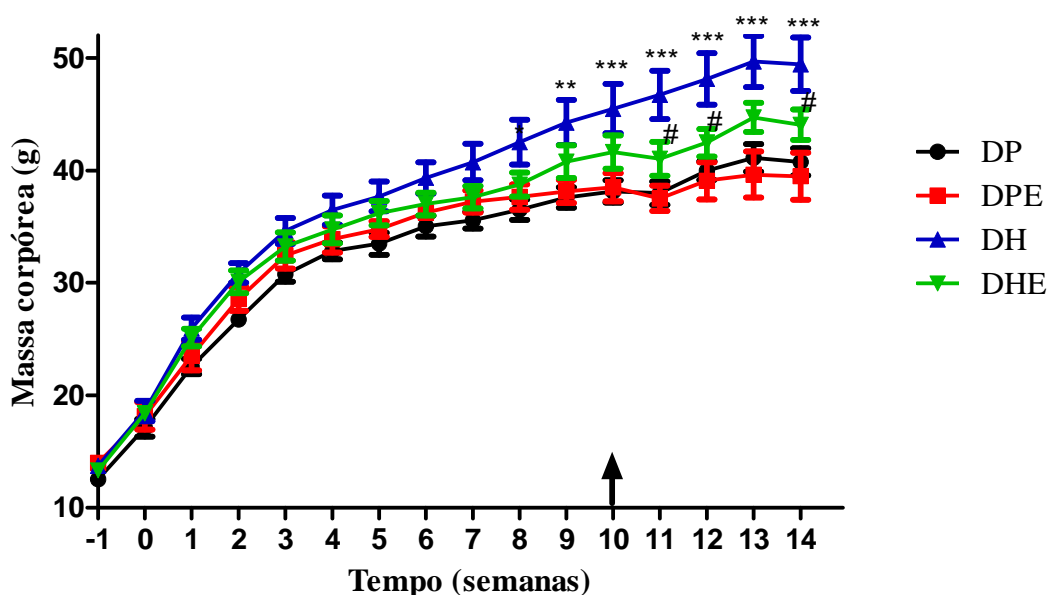


Figura 2: Evolução de massa corpórea dos grupos controles submetidos à dieta padrão (DP) ou à dieta hiperlipídica (DH), e, dos respectivos grupos tratados submetidos à dieta padrão + EACI (DPE) e dieta hiperlipídica + EACI (DHE). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M da massa corpórea (g) avaliada duas vezes por semana ( $n = 8$ ). A seta, localizada na décima semana, representa o ponto a partir do qual os grupos DPE e DHE passaram a receber o EACI ao invés de água. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs DP e #  $p < 0,05$  vs DH. ANOVA duas vias, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 28} = 2,9$ . Valor de F calculado para interação = 2,9.

De acordo com a figura 2 é possível observar que houve diferença entre os grupos DP e DH, sendo que a diferença mostra-se significativa a partir da oitava

semana de indução ( $p < 0,05$ ), tornando-se mais expressiva ( $p < 0,001$ ) de acordo com o tempo de experimento. Quando comparados os grupos tratados aos seus respectivos controles, o grupo DHE obteve menor ganho de massa corpórea ( $p < 0,05$ ), evidenciado na 11<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semanas, em relação ao DH.

A partir dos dados de consumo de ração, massa inicial e massa final dos animais entre os grupos, foi calculada a eficiência energética das dietas, que é obtida a partir da divisão do ganho de peso pelo consumo de ração em quilocalorias (kcal). Para a obtenção do consumo absoluto em kcal, levou-se em consideração o consumo total em gramas do animal, durante as 14 semanas de experimento, e a densidade energética de cada uma das dietas.

Tabela 4: Média  $\pm$  E.P.M. dos valores de peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo de ração e eficiência energética.

<b>Grupo</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Ganho total de peso (g)</b>	<b>Consumo total em gramas</b>	<b>Consumo total em kcal</b>	<b>Eficiência energética (g/kcal x 10<sup>-3</sup>)</b>
<b>DP</b>	12,5 $\pm$ 0,3	34,0 $\pm$ 0,8	21,5 $\pm$ 0,7	581,9 $\pm$ 21,4	2292,0 $\pm$ 84,5	9,4 $\pm$ 0,4
<b>DPE</b>	14,0 $\pm$ 0,2	33,9 $\pm$ 1,6	19,9 $\pm$ 1,8	569,4 $\pm$ 26,9	2242,5 $\pm$ 106,1	9,1 $\pm$ 1,0
<b>DH</b>	13,8 $\pm$ 0,5	44,8 $\pm$ 1,8 <sup>***</sup>	31,0 $\pm$ 2,2 <sup>**</sup>	451,3 $\pm$ 7,9 <sup>***</sup>	2479,0 $\pm$ 43,8	17,5 $\pm$ 1,2 <sup>***</sup>
<b>DHE</b>	13,3 $\pm$ 0,6	40,2 $\pm$ 1,0	26,9 $\pm$ 1,3	450,4 $\pm$ 7,1	2475,0 $\pm$ 38,9	15,2 $\pm$ 0,7

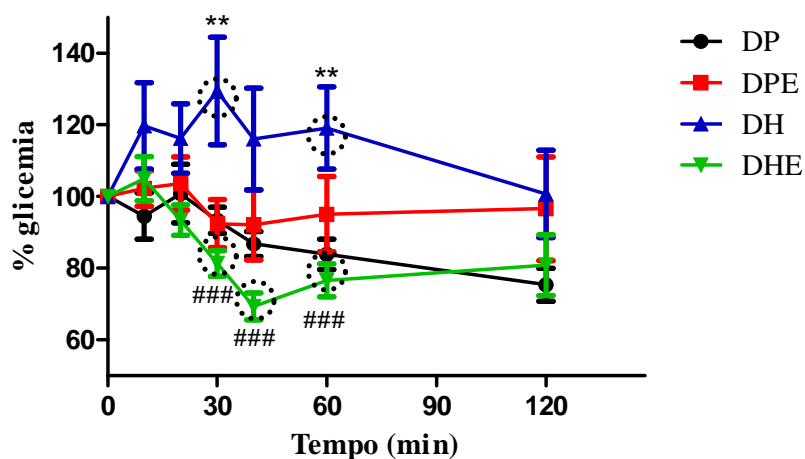
Valores de peso inicial mensurado após desmame e demais parâmetros ao final das 14 semanas de experimento, dos grupos controles submetidos à dieta padrão (DP) ou à dieta hiperlipídica (DH), e, dos respectivos grupos tratados submetidos à dieta padrão + EACI (DPE) e dieta hiperlipídica + EACI (DHE). N = 8. \* p < 0,05 \*\* p < 0,001 \*\*\* p < 0,0001 vs DP. ANOVA uma via, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de F<sub>3, 28</sub> = 2,9. Valor de F calculado para massa inicial = 2,3; massa final = 5,2; ganho de massa = 10,3; consumo (g) = 16,1; consumo (kcal) = 2,8; eficiência energética = 22,6.

Os valores da tabela 4 demonstram que no início do experimento não houve diferença significativa de peso entre os grupos controles e tratados. Ao longo do experimento, os grupos que receberam dieta hiperlipídica (DH e DHE) tiveram um aumento do ganho de peso, apresentando maior peso final ao término das 14 semanas ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente vs DP). Com relação à média do ganho de massa corpórea total, nas 14 semanas de experimento, apenas o grupo DH apresentou diferença significativa em relação aos grupos que receberam a dieta padrão. Essa menor média do ganho total de massa corpórea do grupo DHE, embora não tenha sido significativamente diferente do DH também não mostrou-se diferente em relação ao DP, refletindo assim o menor ganho de massa observado nas quatro últimas semanas em que foi realizada a ingestão do extrato.

Quanto ao consumo, embora os grupos que receberam a dieta hiperlipídica tenham apresentado menor consumo total em gramas de ração ( $p < 0,0001$ ), não apresentaram diferença significativa em relação ao consumo total em kcal, em decorrência da maior densidade energética da ração hiperlipídica. Contudo, apresentaram eficiência energética significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) quando comparados aos grupos que consumiram dieta padrão (DP e DPE).

Ao final das 14 semanas de experimento, também foram realizados os testes de TTIIP e TTGIP. Os mesmos foram realizados com intervalo de 2 dias entre eles e no mínimo 3 dias antes da eutanásia dos animais. Em ambos os testes foram aferidas as glicemias por meio de glicosímetro, no tempo 0 (basal) e 10, 20, 30, 40, 60 e 120 minutos após a injeção de insulina e glicose, respectivamente. A partir dessas glicemias, traçou-se a linha de elevação e decaimento das mesmas, representada nas figuras 3A e 4A, e, posteriormente, foi avaliada a área sob a curva representativa do traçado, representada pelas figuras 3B e 4B.

A



B

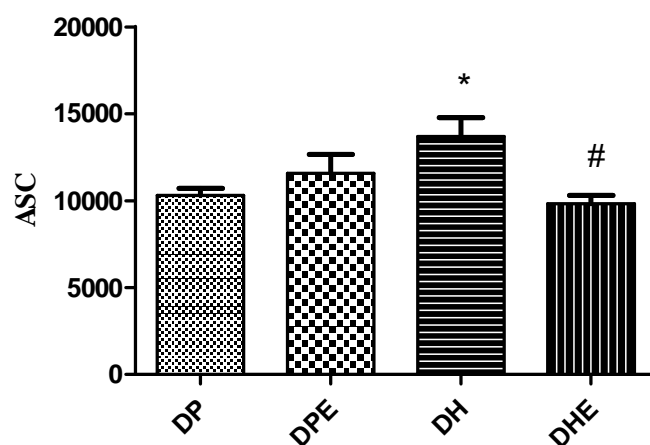


Figura 3: Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTIIP). A figura 3A representa a variação da média  $\pm$  E.P.M. das porcentagens dos valores de glicemia, em relação ao valor basal, dos grupos controles submetidos à dieta padrão (DP) ou à dieta hiperlipídica (DH), e, dos respectivos grupos tratados submetidos à dieta padrão + EACI (DPE) e dieta hiperlipídica + EACI (DHE), nos tempos 0 (basal = 100%), 10, 20, 30, 40, 60 e 120 minutos. ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 20} = 3,1$ . Valor de F calculado para interação = 2,4. A figura 3B representa os valores da área sob a curva (ASC)  $\pm$  E.P.M dos mesmos grupos. ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 20} = 3,1$ . Valor de F calculado = 5,1. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs DP e #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,001$  vs DH. N = 6.



Analisando o traçado da figura 3A, podemos observar que houve diferença entre os grupos controles, evidenciada nos pontos de 30 e 60 minutos pós injeção da insulina. Nestes pontos as médias das porcentagens de variação da glicemia, em relação à basal, mostraram-se significativamente elevadas ( $p < 0,01$ ) no grupo DH quando comparadas ao DP, caracterizando um quadro de resistência à insulina no primeiro grupo. Quando comparados os grupos DHE e DH, verificamos que houve uma redução significativa dessas médias ( $p < 0,001$ ), evidenciada nos pontos de 30, 40 e 60 minutos pós injeção, caracterizando uma normalização da sensibilidade à insulina no grupo que foi tratado com o extrato.

Esses resultados se confirmam nos dados da figura 3B, que mostra aumento significativo da área sob a curva do grupo DH quando comparado ao DP ( $13682 \pm 1090$  vs  $10306 \pm 383,9$ ,  $p < 0,05$ ), assim como, observa-se redução significativa dessa área mediante tratamento com o EACI ( $9828 \pm 485,3$ ,  $p < 0,05$ ), ainda em presença da dieta hiperlipídica.

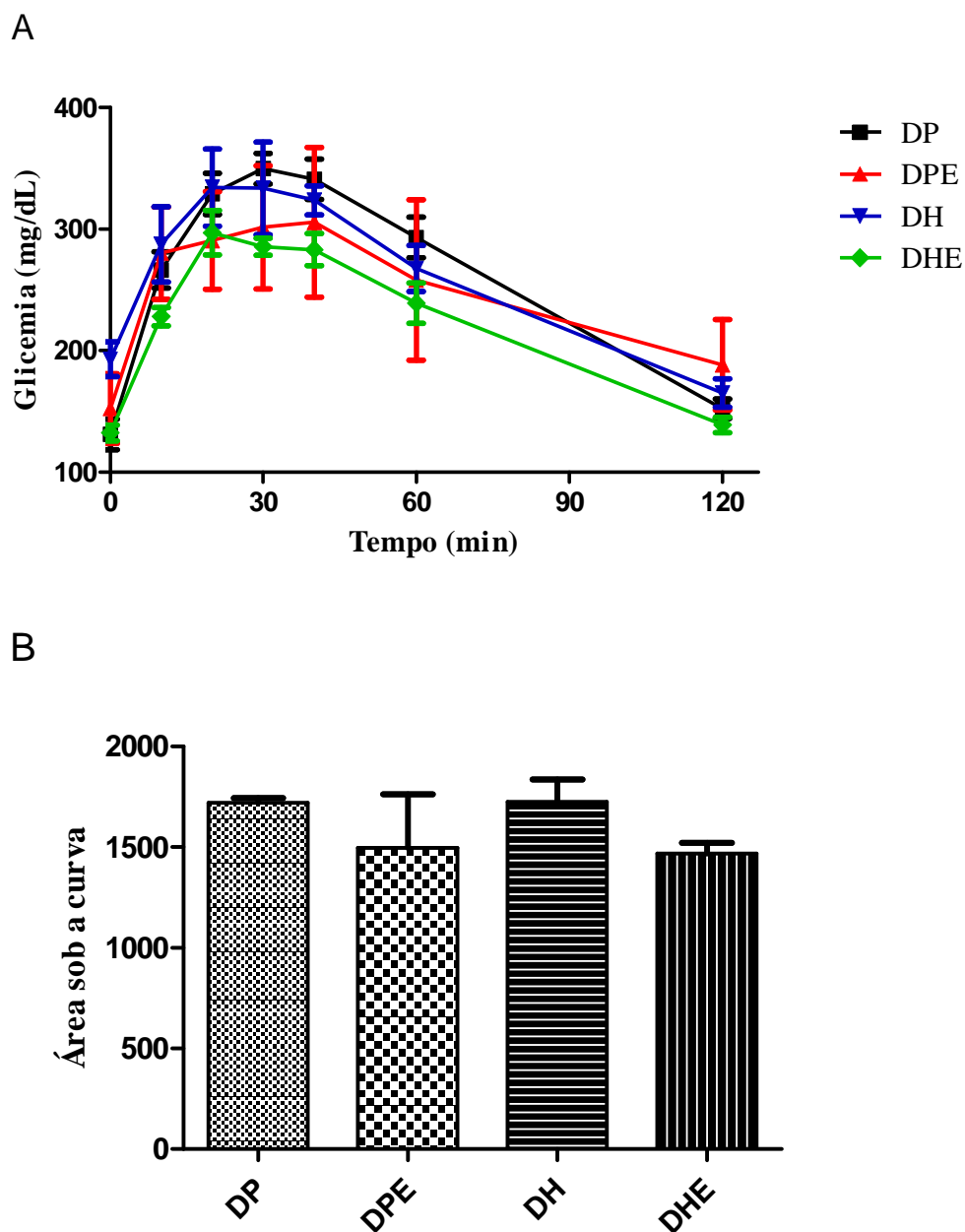


Figura 4: Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGIP). A figura 4A representa a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de glicemia dos grupos controles submetidos à dieta padrão (DP) ou à dieta hiperlipídica (DH), e, dos respectivos grupos tratados submetidos à dieta padrão + EACI (DPE) e dieta hiperlipídica + EACI (DHE), nos tempos 0 (basal), 10, 20, 30, 40, 60 e 120 minutos. ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 20} = 3,1$ . Valor de F calculado para interação = 0,7. A figura 4B representa os valores da área sob a curva (ASC)  $\pm$  E.P.M. dos mesmos grupos. ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 20} = 3,1$ . Valor de F calculado = 1,1. N = 6.

A figura 4 mostra que não houve diferença significativa entre os grupos, seja na média das glicemias aferidas nos determinados pontos, ou na média das áreas sob a curva, representativa dos traçados de elevação e decaimento dessas glicemias, indicando que todos estavam tolerantes à glicose.

Previamente à execução do IPGTT, com os animais em 12 horas de jejum, foi aferida a glicemia também por meio de glicosímetro.

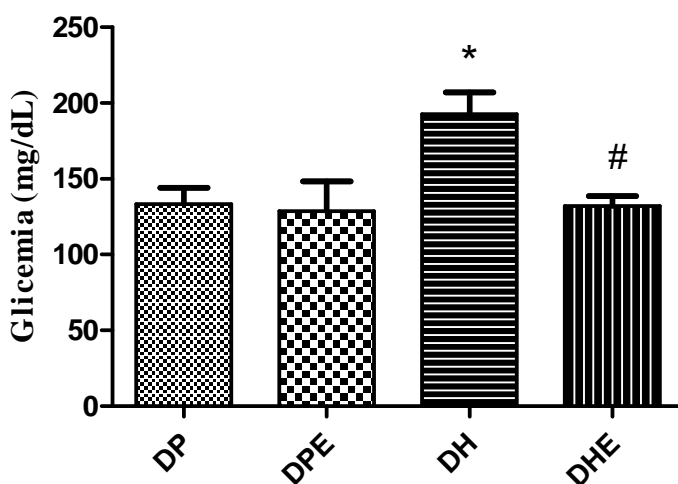


Figura 5: Representa a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de glicemia entre os grupos controles submetidos à dieta padrão (DP) ou à dieta hiperlipídica (DH), e, dos respectivos grupos tratados submetidos à dieta padrão + EACI (DPE) e dieta hiperlipídica + EACI (DHE). \*  $p < 0,05$  vs DP e #  $p < 0,05$  vs DH. ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 20} = 3,1$ . Valor de F calculado = 5,5. N = 6.

De acordo com a figura 5, a glicemia do grupo DH foi significativamente maior que a do grupo DP ( $192,8 \pm 14,2$  vs  $133,5 \pm 10,5$ ,  $p < 0,05$ ), e, quando comparado o grupo DHE ao DH, o primeiro mostrou-se significativamente menor ( $132,3 \pm 6,4$ ,  $p < 0,05$ ), indicando que o extrato impediu o aumento da glicemia mesmo diante do consumo semelhante de dieta hiperlipídica.

Após a realização dos testes de TTIIP e TTGIP, os animais foram eutanasiados sob anestesia e realizada a coleta de sangue para análise bioquímica dos lipídios. Embora tenham sido 8 animais por grupo, em alguns animais foi obtida quantidade insuficiente de soro para a realização de todas as análises. Diante disso,

para esse parâmetro foi utilizado um n de 4 a 5 animais.

Tabela 5: Médias  $\pm$  E.P.M. dos valores de colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL.

<b>Grupo</b>	<b>CT</b>	<b>TG</b>	<b>HDL</b>	<b>LDL</b>
<b>DP</b>	236,8 $\pm$ 26,4	125,0 $\pm$ 11,1	51,0 $\pm$ 5,1	151,8 $\pm$ 24,1
<b>DPE</b>	280,1 $\pm$ 25,6	145,4 $\pm$ 14,0	35,6 $\pm$ 3,9	192,4 $\pm$ 36,0
<b>DH</b>	222,6 $\pm$ 11,9	149,7 $\pm$ 10,1	42,0 $\pm$ 3,8	138,1 $\pm$ 13,6
<b>DHE</b>	182,6 $\pm$ 5,5	118,4 $\pm$ 6,8	49,7 $\pm$ 2,6	112,2 $\pm$ 6,5

ANOVA uma via, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 12} = 3,5$ ; valor crítico de  $F_{3, 18} = 3,1$ . Valor de F calculado para CT = 4,9; TG = 2,4; HDL 3,4; LDL = 2,0. N = 5 – 7.

Os dados da tabela 5 mostram que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados após ANOVA. Todavia, quando comparado o DHE ao seu controle (DH) por meio de teste T, observamos que houve uma redução do CT (18,2  $\pm$  2,5%,  $p = 0,003$ ), TG (20,9  $\pm$  4,5%,  $p = 0,01$ ) e LDL (18,8  $\pm$  4,7%,  $p < 0,05$ ) e uma tendência ao aumento do HDL (18,6%  $\pm$  6,2%,  $p = 0,056$ ).

Após coleta do sangue foram retirados os coxins periepididimal, perirenal e retroperitoneal para determinação do peso em gramas. Em seguida foi determinada a soma desses coxins e o índice de adiposidade. Este índice é um representativo da quantidade de gordura corporal do animal proporcional ao seu peso total e é obtido da divisão da soma dos coxins pelo massa final do animal (referente ao dia em que foi eutanasiado).

Tabela 6: Médias  $\pm$  E.P.M. dos pesos em gramas dos coxins periepididimal, perirenal, retroperitoneal, soma dos coxins e índice de adiposidade.

<b>Grupo</b>	<b>Coxim periepididimal</b>	<b>Coxim perirenal</b>	<b>Coxim retroperitoneal</b>	<b>Soma dos coxins</b>	<b>Índice de adiposidade <math>\times 10^{-3}</math></b>
<b>DP</b>	0,10 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,03	6,30 $\pm$ 1,08
<b>DPE</b>	0,19 $\pm$ 0,07	0,10 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,1	8,95 $\pm$ 2,65
<b>DH</b>	2,16 $\pm$ 0,19 <sup>***</sup>	0,58 $\pm$ 0,15 <sup>***</sup>	0,36 $\pm$ 0,06 <sup>***</sup>	3,09 $\pm$ 0,3 <sup>***</sup>	68,67 $\pm$ 4,68 <sup>***</sup>
<b>DHE</b>	1,83 $\pm$ 0,26	0,32 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,03	2,41 $\pm$ 0,35	59,55 $\pm$ 8,18

\*\*\*  $p < 0,0001$  vs DP. ANOVA uma via, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 28} = 2,9$ . Valor de F calculado para coxim periepididimal = 35,3; coxim perirenal = 6,6; coxim retroperitoneal = 17,3; soma dos coxins = 37,5; índice de adiposidade = 44,4. N = 8.

A tabela 6 revela que os coxins dos animais do grupo DH foram significativamente mais pesados quando comparados aos do grupo DP ( $p < 0,0001$ ) e, portanto, assim também se mostrou seu índice de adiposidade ( $p < 0,0001$ ). Com relação aos grupos tratados, não houve diferença significativa quando comparados aos seus respectivos controles por ANOVA. Entretanto, quando comparados o DH ao DHE por meio de Teste T, houve uma tendência ao menor ganho de tecido adiposo, especialmente sobre os coxins perirenal ( $44,8\% \pm 10,3\%$ ,  $p = 0,056$ ) e retroperitoneal ( $27,8\% \pm 8,3\%$ ,  $p = 0,08$ ).

Além do peso do tecido adiposo, foi também observado o peso do músculo gastrocnêmio, utilizado, neste estudo, como um representante da musculatura do animal, a fim de observar se o extrato poderia provocar algum efeito sobre a redução de massa magra.

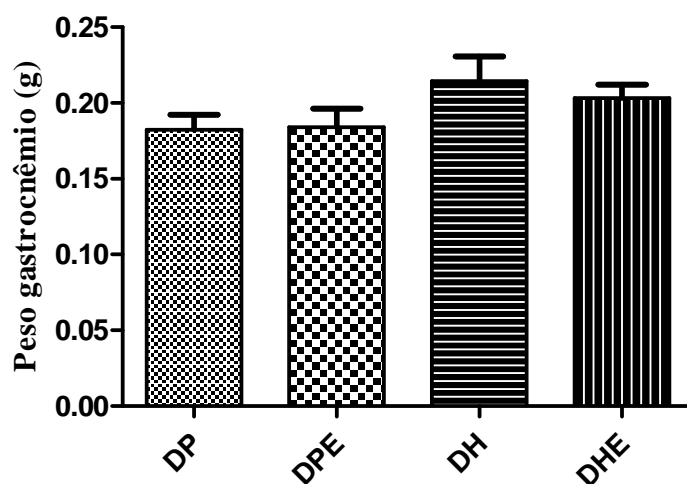


Figura 6: Representa a média  $\pm$  E.P.M. do peso do músculo gastrocnêmio em gramas dos grupos controles submetidos à dieta padrão (DP) ou à dieta hiperlipídica (DH), e, dos respectivos grupos tratados submetidos à dieta padrão + EACI (DPE) e dieta hiperlipídica + EACI (DHE).  $N = 8$ . ANOVA de uma via, pós-teste de Bonferroni. Valor crítico de  $F_{3, 28} = 2,9$ . Valor de F calculado = 1,7.

Conforme observado na figura 6, não houve diferença significativa entre os grupos. Dessa forma não houve influência do extrato ou da dieta na perda de massa magra dos animais.

## 5. DISCUSSÃO

Antes de dar início à suplementação com o EACI e verificar seus efeitos sobre a fisiopatologia da obesidade e de algumas de suas condições associadas, foi preciso validar um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos, que refletisse as condições apresentadas pelo humano. De acordo com os resultados obtidos pelo aumento do ganho de massa corpórea, do tecido adiposo e índice de adiposidade, é possível afirmar que este trabalho viabilizou um modelo reprodutível de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos *Swiss*. Além de obeso, esse modelo mostrou-se também resistente à insulina e hiperglicêmico.

Outro dado importante na validação desse modelo se refere a eficiência energética das dietas. Embora os animais que receberam a dieta hiperlipídica tenham consumido uma quantidade menor de ração em gramas e uma quantidade semelhante de ração em quilocalorias, apresentaram maior eficiência energética em comparação ao padrão. Isto é, os animais dos grupos DH e DHE tiveram maior eficiência em converter a mesma quantidade de calorias em maior peso quando comparados aos grupos DP e DPE.

Esses dados corroboram com resultados obtidos por Prior et al. (2008) e Townsend, Lorenzi e Widmaier (2008) em que uma maior eficiência energética também foi encontrada diante de um consumo semelhante de ração em quilocalorias. De acordo com este último trabalho, um aumento do consumo energético não é obrigatório para que haja aumento da adiposidade em função de uma dieta hiperlipídica. O aumento de peso e tecido adiposo pode ser resultado da alteração na modulação hipotalâmica da sinalização da leptina em função da hiperleptinemia. Além disso, redução da massa e capacidade oxidativa mitocondrial também pode ser observadas em roedores alimentados com dieta hiperlipídica, favorecendo a um maior acúmulo de gordura (POMPLUN et al., 2007; VILLAROYA; GIRALT; VILLAROYA, 2009).

Outro fator de grande importância que também pode contribuir para maior adiposidade, independente de uma maior ingestão calórica, é o tipo de gordura utilizada na composição da dieta. De acordo com Buettner et. al (2006), a gordura

saturada e monoinsaturada são capazes de promover, de forma mais pronunciada, obesidade e resistência insulínica quando comparadas à gordura poli-insaturada, sendo as mesmas capazes de gerar aumento da lipogênese e depósito de microvesículas de gordura no fígado. O autor afirma ainda que dentre as gorduras utilizadas em seu trabalho, a banha (mistura de gordura saturada e monoinsaturada) certamente é a mais recomendada para a geração de um modelo válido de roedor obeso com alterações metabólicas. Em acordo com este autor, nosso trabalho apresenta o mesmo tipo de gordura utilizada para composição da dieta hiperlipídica.

Com relação ao tempo de indução necessário para a determinação de alterações de peso e tecido adiposo, existe uma inconsistência na literatura quanto ao período que melhor caracterizaria um quadro de obesidade em roedores semelhante ao encontrado em humanos. No presente trabalho foram utilizadas 14 semanas para gerar um modelo consistente de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, embora a diferença na massa corpórea total tenha sido observada a partir da oitava semana. Este período mostra-se um pouco maior comparado a outros estudos que alcançaram diferença significativa a partir da terceira (YUN et al., 2004), quarta (BOSE et al., 2008) ou quinta (PRIOR et al., 2008) semanas de indução, utilizando dietas com 60% de lipídios em camundongos.

Outros parâmetros avaliados caracterizam também esse modelo, além de obeso, resistente à insulina, a exemplo do aumento da área sob a curva do teste de tolerância à insulina e do aumento da glicemia do grupo DH quando comparado ao DP. Este último grupo, embora tenha apresentado valores glicêmicos maiores em relação aos achados em grande parte das publicações, corrobora com outros estudos nos quais foram obtidos valores semelhantes, entre 140 e 150 mg/dL com 12h de jejum (NADEROLI et al., 2001; AMAYA et al., 2008) e entre 140 e 174,4 mg/dL em trabalhos com 6h de jejum (CALIXTO et al., 2010; FRALOUB et al., 2010).

Assim sendo, estabelecido um modelo viável, iniciamos as análises do efeito do EACI sobre o consumo, massa corpórea, glicemia, sensibilidade à insulina, tolerância à glicose, perfil lipídico e adiposidade desses animais.

Os resultados obtidos em relação ao consumo revelam que, após o início do tratamento, na décima semana de ingestão das dietas, o extrato não promoveu alteração na ingesta líquida, inferindo-se que ele tenha sido bem aceito pelos animais, nem no consumo de ração, pois os animais continuaram consumindo a



mesma quantidade de ração prévia à utilização do EACI. Dessa forma, também não houve diferença significativa do consumo em gramas, consumo absoluto em kcal, bem como na eficiência energética entre os grupos tratados e seus respectivos controles, já que a dieta utilizada entre eles foi a mesma. Quanto aos dados relativos à massa corpórea, ainda que os animais do grupo DHE não tenham apresentado diferença significativa referente à média do ganho de peso total, foi possível observar um menor ganho de peso nas quatro últimas semanas em que os animais receberam a dieta hiperlipídica associada à ingestão do extrato.

Embora não haja trabalhos publicados a respeito deste extrato em camundongos obesos, estudo realizado com a utilização de quercetina (composto aglicona da rutina) na dose de 10 mg/kg promoveu menor ganho de peso em ratos *Zucker* obesos (RIVERA et al., 2008). Em outro estudo realizado por Edema et al. (2007), as sementes trituradas de abajeru, na concentração de 10% (10 g de sementes misturadas em cada 100 g de ração), promoveram redução significativa do peso em ratos normais sem efeitos tóxicos.

Com relação aos efeitos do EACI sobre a glicemia, observou-se que o extrato foi capaz de normalizar a glicemia dos animais do grupo DHE, uma vez que os mesmos apresentaram glicemia similar ao do grupo DP e significativamente menor que o DH, mesmo diante do consumo de dieta hiperlipídica.

Presta e Pereira (1987), já relatavam efeito hipoglicemiante em camundongos normais depois de apenas 8 dias de tratamento com o extrato aquoso na concentração de 5% (ou 50 mg/ml), misturados à água de beber e ingeridos de forma “*ad libitum*”. Em camundongos diabéticos, induzidos por aloxana, este mesmo autor relata que o chá de abajeru, administrado da mesma forma e na mesma concentração, protegeu os animais de doses tóxicas de aloxana, administrada endovenosamente, uma vez que a taxa de mortalidade desses animais foi significativamente menor quando comparados aos que não receberam o chá. Estes mesmos autores relatam ainda que o chá (a 5%), perfundido concomitantemente a 100 mg/dL de uma solução isotônica de glicose, no duodeno, reduziu a absorção intestinal da glicose em 64,2%.

Embora a concentração utilizada por Presta e Pereira (1987), 50 mg/ml, tenha promovido efeito hipoglicemiante e antioxidante nos camundongos, Presta; Fonseca; Bernardo-Filho (2007) verificaram que esta mesma concentração pode

promover forte efeito genotóxico sobre o DNA plasmidial, ao passo que concentrações de 0,5 e 5 mg/ml têm ação protetora contra o efeito genotóxico do cloreto estano no DNA plasmidial.

Em nosso estudo foi utilizada a dose estimada de 200mg/kg o que resultou numa concentração estimada na faixa de 0,00002 a 0,0003% (0,0002 a 0,003 mg/ml). Essa concentração é substancialmente menor quando comparada à utilizada Presta e Pereira (1987), sendo também capaz de manter a normalização da glicemia dos animais do grupo DHE.

Corroborando com a dose utilizada em nosso estudo, Barbosa et al. (2007) também verificaram redução significativa dos níveis glicêmicos de ratos diabéticos, induzidos por aloxana, com o extrato aquoso de abajeru nas dose de 200 mg/kg, após tratamento durante seis semanas.

Efeito hipoglicemiante também foi encontrado em estudo com a quercitrina (presente no extrato etanólico de *C. icaco*) em ratos diabéticos, na dose de 30 mg/kg, além de aumento dos níveis de insulina, resultantes de uma expansão das ilhotas pancreáticas e redução de infiltração de gordura nas mesmas (BABUJANARTHANAM; KAVITHA; PANDIAM, 2010).

Além dos efeitos sobre a glicemia, o EACI também promoveu normalização da sensibilidade à insulina, observada pela redução da área sob a curva no TTIIP, mesmo diante do consumo de dieta hiperlipídica.

Pesquisa realizada com a miricetina (flavonol também encontrado no extrato etanólico de *C. icaco*), 1mg/kg por meio de injeção intravenosa três vezes ao dia durante quatorze dias de tratamento, observou efeito sobre a melhora da sensibilidade à insulina por meio da potencialização da ação da insulina em nível dos substratos dos receptores de insulina -1, PI-3-quinase e translocação de GLUT4 no músculo sóleo de ratos resistentes à insulina (LUI et al., 2007).

Esses achados são sugestivos de que o EACI melhore a captação de glicose pelo tecido muscular, que, de acordo com Shulman (2000) é o principal responsável pela captação de glicose insulino-dependente, promovendo assim a homeostase glicêmica desses animais.

Relativamente aos resultados obtidos pelo TTGIP, observa-se que, em todos os grupos, os animais se apresentam tolerantes à glicose. A dieta hiperlipídica conseguiu induzir obesidade, gerando resistência insulínica nesses animais, porém, a

tolerância à glicose continuou preservada.

De acordo com Polonsky et al. (1998), num quadro de obesidade associada à resistência insulínica, inicialmente, os níveis de insulina normalmente aumentam de 3 a 4 vezes, quando comparadas às taxas de indivíduos magros, na tentativa de manter a homeostase glicêmica, justificando o fato de, neste ponto, estarem resistentes, porém, ainda tolerantes à glicose. Contudo, com o tempo, haveria uma exaustão das células  $\beta$  pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, e consequente queda nos níveis de insulina, intolerância à glicose e hiperglicemia, caracterizando um quadro de diabetes tipo 2 (SHAH, 1996).

Assim como os autores acima, Petersen e Shulman (2002) acreditam que a resistência à insulina preceda o desenvolvimento de diabetes por muitos anos, e que sua presença é o melhor preditor de se um indivíduo mais tarde se tornará diabético do tipo 2. Dessa forma, as 14 semanas de indução, utilizadas neste estudo, não foram suficientes para a promoção da intolerância à glicose. Talvez um tempo maior seja necessário para que haja falha nas células  $\beta$  desses animais resultando num quadro de intolerância.

Em relação à análise dos lipídios (CT, TG, HDL e LDL), embora a ANOVA não tenha evidenciado diferenças significativas nos parâmetros avaliados entre os quatro grupos, o teste T comparando o DH ao DHE mostrou redução significativa dos níveis de CT, TG e LDL, e ainda uma tendência ao aumento do HDL. Talvez um número maior de amostras possibilitaria refletir esse nível de significância. Achados relativos à ação do extrato aquoso nos lipídios séricos foi encontrado também por Barbosa et al. (2007). Em seu estudo com extrato na dose de 200 mg/kg foi verificado aumento significativo dos níveis de HDL em ratos diabéticos induzidos por aloxana.

Avaliando o efeito do EACI sobre o tecido adiposo dos camundongos obesos, observou-se que houve menor ganho de tecido adiposo, evidenciado pelo teste T, principalmente sobre o peso dos coxins perirenal e retroperitoneal.

Ainda que pouco expressivo, esse menor ganho de tecido adiposo possivelmente pode ter se dado em virtude da presença de rutina neste tipo de extrato. Hsu et al. (2009) observou redução significativa da massa corpórea e dos coxins adiposos retroperitoneal e periepididimal, além de redução dos níveis séricos de CT, TG, insulina e leptina em ratos obesos submetidos ao tratamento com rutina

na dose de 50 mg/kg durante 8 semanas. Choi et al. (2006) verificou supressão da diferenciação do adipócito e redução na expressão do RNAm de fatores de transcrição adipogênica, como o PPAR $\gamma$  e o C/EBP $\alpha$ , nos hepatócitos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, também com rutina na dose de 50 mg/kg, mas com tratamento durante 4 semanas.

Outros estudos com a quercetina e a quercitrina também mostraram propriedade antilipogênica. Iwashita, Yamaki e Tsushida (2001), observaram redução da atividade da glicerol-3-fosfato-desidrogenase, enzima chave no processo da lipogênese, com a quercitrina (50 $\mu$ g) em adipócitos 3T3-L1. Shisheva e Shechter (1992), por sua vez, verificaram ação anti-lipogênica da quercetina, na concentração de 44 a 120  $\mu$ M, em adipócitos isolados de ratos, por meio da inibição da fosforilação dos substratos dos receptores de insulina, da translocação de GLUT4, oxidação da glicose e sua incorporação em lipídios. Strobel et al. (2005) também observaram efeito inibidor sobre a translocação de GLUT4 estimulada por insulina em utilização da miricetina e quercetina em concentrações de 20 a 100  $\mu$ M.

Esses resultados podem justificar o menor ganho de peso, nas quatro semanas em que os animais receberam o extrato, além do menor ganho de tecido adiposo, sugerindo que o extrato aquoso também possa apresentar efeito inibidor sobre a atividade lipogênica e adipogênica desses animais. A diferença significativa sobre o tecido adiposo dos animais entre os grupos DH e DHE pode não ter sido suficientemente evidenciada em razão do fato de que, com dez semanas, esses animais já estavam obesos, apresentando elevada quantidade de tecido adiposo, e somente a partir daí é que a atividade lipogênica desses animais foi reduzida. Possivelmente um tempo maior de tratamento favoreceria a uma maior diferença entre os grupos. Além disso, a inexistência de diferenças significativas referentes à ação do extrato sobre a massa magra do animal também apóiam esta hipótese.

Referente aos dados encontrados na literatura e aos obtidos neste trabalho é preciso ressaltar também que, embora os achados mostrem efeitos a partir de doses muito altas de compostos isolados, que poderiam estar presentes no extrato aquoso de *Crhysobalanus icaco*, não se deve descartar a participação de outros compostos neste último, e ainda, de um possível efeito sinérgico entre eles, favorecendo para que esses efeitos fossem observados, porém, em doses significativamente menores.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho é possível afirmar que foi validado um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, associada à resistência insulínica, em camundongos *Swiss*, num período de 14 semanas. A partir desse modelo, verificamos que o extrato aquoso de abajeru possibilitou menor ganho de massa corpórea e promoveu normalização da sensibilidade à ação da insulina e da glicemia dos camundongos obesos que apresentaram resistência em decorrência da dieta hiperlipídica.

Esses achados reforçam ainda o uso do extrato aquoso de abajeru no tratamento da hiperglicemia, porém com dosagens substancialmente menores quando comparadas a outras publicações.

## **7. PERSPECTIVAS**

A partir desses achados torna-se necessária a realização de mais estudos utilizando maiores concentrações do extrato, por um tempo maior de tratamento, a fim de verificar se é possível essa inibição da lipogênese e adipogênese em animais obesos, bem como a melhora dos parâmetros bioquímicos.

Outras pesquisas também são inevitáveis a respeito da investigação dos mecanismos pelos quais o extrato melhora a sensibilidade à ação da insulina e a homeostase glicêmica de camundongos obesos, assim como dos possíveis efeitos do mesmo sobre a expressão de fatores de transcrição adipogênica e na modulação de adipocinas e citocinas inflamatórias, produzidas pelo tecido adiposo. Esses fatores podem estar interferindo de forma direta e indireta na fisiopatologia da obesidade e da resistência insulínica.

Trabalhos sobre toxicidade aguda e crônica deste extrato também se fazem de grande valia para maior conhecimento e utilização deste extrato pela população.

## 8. BIBLIOGRAFIA

AGRA M DE F, DE FREITAS PF, BARBOSA-FILHO JM. **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AMAYA SC, PERELLA B, CINTRA D, ROPELLE E, PAULI JR, SAAD MJA. **Efeito do bloqueador do receptor de angiotensina sobre obesidade induzida por dieta.** In: XVI Congresso Interno de Iniciação Científica, 2008, Campinas. Anais do XVI Congresso Interno de Iniciação Científica. Campinas, 2008. p. 63.

ANGELIS RC de. **Riscos e Prevenção da Obesidade – Fundamentos Fisiológicos e Nutricionais para o Tratamento.** 1ª edição. São Paulo: Atheneu, 2003. 109 p.

ASENSIO C, JIMENEZ M, KÜHNE F, ROHNER-JEANRENAUD F, MUZZIN P. **The Lack of  $\alpha$ -Adrenoceptors Results in Enhanced Insulin Sensitivity in Mice Exhibiting Increased Adiposity and Glucose Intolerance.** Diabetes, v. 54, p. 3490 – 3495, 2005.

BABUJANARTHANAM R, KAVITHA P, PANDIAM MR. **Quercitrin, a bioflavonoid improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes.** Fundamental & Clinical Pharmacology, v. 24, p. 357 – 364, 2010.

BARBOSA APO, MENEZES IAC, ANTONIOLLI AR, BITENCURT JRC, SANTOS MRV. **Effects of the chronic treatment with aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* (Chrysobalanaceae) in alloxan-induced diabetic rats.** In: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2007, Águas de Lindóia. Anais da XXII Reunião Anual da FeSBE. Águas de Lindóia, 2007. p. 120.

BARBOSA WLR, PERES A. **Deteção e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência de rutina em extratos de *Chrysobalanus icaco* L.** XVII *Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Cuiabá, MT, 2002 apud BARBOSA WLR, PERES A, GALLORI S, VINCIERI SS. Determination of myricetin derivates in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 3, p. 333 – 337, 2006.

BARBOSA WLR, PERES A, GALLORI S, VINCIERI SS. **Determination of myricetin derivates in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 3, p. 333 – 337, 2006.

BARZILAI N, SHE L, LIU B-Q, VUGUIN P, COHEN P, WANG J, ROSSETTI L. **Surgical Removal of Visceral Fat Reverses Hepatic Insulin Resistance.** Diabetes, v. 48, p. 94 – 98, 1999.

BEDOUI S, VELKOSKA E, BOZINOVSKI S, JONES JE, ANDERSON GP, MORRIS MJ. **Unaltered TNF- $\alpha$  production by macrophages and monocytes in diet-induced obesity in the rat.** Journal of Inflammation, v. 2, n. 2, p. 1 – 8.

BOSE M, LAMBERT JD, JU J, REUHL KR, SHAPSES SA, YANG CS. **The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice.** *J. Nutr.*, v. 138, p. 1677–1683, 2008.

BRITO ES de, ARAÚJO MCP de, ALVES RE, CARKEET C, CLEVIDENCE BA, NOVOTONY JA. **Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9389 – 9394, 2007.

BUETTNER R, PARHOFER KG, WOENCKHAUS M, WREDE CE, KUNZ-SCHUGHART LA, SCHOÖLMERICH J, BOLLHEIMER LC. **Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types.** *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 36, p. 485 – 501, 2006.

CALIXTO MC, LINTOMEN L, SCHENKA A, SAAD MJ, ZANESCO A, ANTUNES E. **Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma.** *British Journal of Pharmacology*, v. 159, p. 617 – 625, 2010.

CARVALHO KMB de, DUTRA ES, ARAÚJO MSM. **Obesidade e Síndrome Metabólica.** In: CUPPARI L. **Nutrição nas doenças crônicas não transmissíveis.** 1ª edição. Barueri-SP: Manole, 2009. p. 71 – 141.

CARVALHEIRO M. **Insulino-resistência: o que é?** In: GEIR – Grupo de Estudo da Insulino-Resistência da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. **Manual sobre insulino-resistência.** 3º edição. Ed. Helena Cardoso, 2009. p. 8 – 10.

CASTILHO RO, SOUZA I de, GUIMARÃES UP, KAPLAN MAC. **A survey of chemistry and biological activities of chrysobalanaceae.** *An Acad Bras Ci*, v. 72, n. 2, p. 292 – 293, 2000.

CEDDIA RB, WILLIAM Jr WN, LIMA FB, CARPINELLI AR, CURI R. **Pivotal role of leptin in insulin effects.** *B Erfafezcilitasn o Jf oleuprtnina la onf dM iendsuiclainl and Biological Research*, v. 31, n. 6, p. 715-722, 1998.

CHEN H, MONTAGNANI M, FUNAHASHI T, SHIMOMURA I, QUON MJ. **Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells.** *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 45021–45026, 2003.

CHOI I, PARK Y, CHOI H, LEE EH. **Anti-adipogenic activity of rutin in 3T3-L1 cells and mice fed with high-fat diet.** *Biofactors*, v. 26, n. 4, p. 273 – 281, 2006.

CLÉMENT K, VAISSE C, LAHLOU N, CABROL N, PELLOUX V, CASSUTO D, GOURMELEN M, DINA C, CHAMBAZ J, LACORTE J-M, BASDEVANT A, BOUGNÈRES P, LÉBOUC Y, FROGUEL P, GUY-GRAND B. **A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.** *Nature*, v. 392, p. 398–401, 1998.



COUTINHO W, DUALIB P. Etiologia da Obesidade. In: NUNES MA, APPOLINARIO JC, GALVÃO AL, COUTINHO W. **Transtornos Alimentares e Obesidade**. 2ª edição. São Paulo: Artmed, 2006. p. 265-272.

DULLOO A G, ANTIC V, MONTANI J-P. **Ectopic fat stores: housekeepers that can overspill into weapons of lean body mass destruction**. Int J Obesity, v. 28, p. S1 - S2, 2004.

EDEMA MO, OMOGBAI EK, AFIJABI SA, IDAEWOR PE. **Pathological changes induced by chrysobalanus icaco seeds**. Nigerian Journal of Health and Biomedical Sciences, v. 6, n.1, p. 35 – 37, 2007.

FAROOQI IS, DROP S, CLEMENTS A, KEOGH JM, BIERNACKA J, LOWENBEIN S, CHALLIS BG, O'RAHILLY S. **Heterozygosity for a POMC-Null Mutation and Increased Obesity Risk in Humans**. Diabetes, v. 55, p. 2549 – 2553, 2006.

FERNANDES J, CASTILHO RO, COSTA MR, WAGNER-SOUZA K, KAPLAN MAC, GATASS CR. **Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines**. Cancer Letters, v. 190, p. 165 – 169, 2003.

FASSHAUER M, KLEIN J, NEUMANN S, ESZLINGER M, PASCHKE R: **Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes**. Biochem Biophys Res Commun, v. 290, p. 1084 – 1089, 2002.

FASSHAUER M, PASCHKE R, STUMVOLL M. **Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease**. Biochimie, v. 86, p. 779–784, 2004.

FRALOUB JC, OGG-DIAMANTINO, FERNANDES-SANTOS C, AGUILA MB, MANDARIM-DE-LACERDA CA. **A Mouse Model Of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver And Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (Nafpd) In C57bl/6 Mice Fed A High Fat Diet**. J. Clin. Biochem. Nutr., v. 46, n. 3, p. 1 – 12, 2010.

FRAYN K N. **Visceral fat and insulin resistance – causative or correlative?**. British Journal of Nutrition, v. 83 (Suppl.1), p. 71 – 77, 2000.

FRIEDEL S, HORRO FF, WERMTER AK, GELLER F, DEMPFLER A, REICHWALD K, SMIDT J, BRÖNNER G, KONRAD K, HERPERTZ-DAHLMANN B, WARNKE A, HEMMINGER U, LINDER M, KIEFL H, GOLDSCHMIDT HP, SIEGFRIED W, REMSCHMIDT H, HINNEY A, HEBEBRAND J. **Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity**

**disorder.** Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v. 132, n. 1, p. 96-99, 2005.

GARG A. **Regional Adiposity and Insulin Resistance.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 89, n. 9, p. 4206 – 4210, 2004. GUEDES, MdoC. **Antocianinas: pigmento natural ou remédio?.** Revista Científica do IMAPES, v. 2, n. 2, p. 71 – 73, 2004.

GUSTAFSON K R, MUNRO MHG, BLUNT JW, CARDELLINA II JH, McMAHON JB, GULAKOWSKI RJ, CRAGG GM, COX PA, BRINEN LS, CLARDY J, BOYD MR. **HIV inhibitory natural products. Diterpenes from *Homolanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*.** Tetrahedron, v. 47, p. 4547–4554, 1991

HAN LK, KIMURA Y, OKUDA H. **Reduction in Fat Storage During Chitin-Chitosan Treatment in Mice Fed a High-Fat Diet.** International Journal of Obesity, v. 23, p. 174 – 179, 1999.

HAYMSFIELD SB, REITMAN ML. **Obesity: Genomics and Postgenomics.** N Engl J Med, v. 358, n. 22, p. 2417 – 2418, 2008.

HIERMANN A, SHARAMM HW, LAUFER S. **Anti-inflammatory activity of myricetin-3-O-beta-D-glucuronide and related compounds.** Inflamm Res, v. 47, n. 11, p. 421 – 427, 1998.

HILL JO, CATENACCI VA, WYATT HR. **Obesidade: Etiologia.** In: SHILS ME, SHIKE M, ROSS AC, COBALLERO B, COUSINS RJ. **Nutrição Moderna na Saúde e na Doença.** 10<sup>a</sup> edição. Barueri-SP: Manole, 2009. p. 1088 – 1105.

HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. **Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.** Science, v. 259, p. 87 – 91, 1993.

HOTTA K, FUNAHASHI T, ARITA Y, TAKAHASHI M, MATSUDA M, OKAMOTO Y, IWAHASHI H, KURIYAMA H, OUCHI N, MAEDA K, NISHIDA M, KIHARA S, SAKAI N, NAKAJIMA T, HASEGAWA K, MURAGUCHI M, OHMOTO Y, NAKAMURA T, YAMASHITA S, HANAFUSA T, MATSUZAWA Y. **Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients.** Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., v. 20, p. 1595–1599, 2000.

HSU CL, WU CH, HUANG SL, YEN GC. **Phenolic compounder rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat-diet in rats.** J Agric Food Chem, v. 57, n. 2, p. 425 – 431, 2009.

IWASHITA K, YAMAKI K, TSUSHIDA T. **Effect of Flavonoids on the Differentiation of 3T3-L1 Adipocytes.** Food Sci. Technol. Res., v. 7, n.2, p. 154 – 160, 2001.

JANEČKOVÁ R. **The role of leptin in human physiology and pathophysiology.**

Physiol Res, v. 50, p. 443-459, 2001.

JUHAN-VAGUE I, VAGUE P. **Hypofibrinolysis and insulin-resistance**. *Diabete Metab.*, v. 17(1 Pt 2), p. 96 – 100, 1991.

KIRCHGESSNER TG, UYSAL KT, WIESBROCK SM, MARINO MW, HOTAMISLIGIL GS. **Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Contributes to Obesity-related Hyperleptinemia by Regulating Leptin Release from Adipocytes**. *J. Clin. Invest.*, v. 100, n. 11, p. 2777 – 2782, 1997.

KLEIN S, FONTANA L, YOUNG V L, COGGAN A R, KILO C, PETTERSON B W, MOHAMMED B S. **Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease**. *N Engl J Med* , v. 350, p. 2549 – 2557, 2004.

KOBAYASHI Y, NAKANO Y, KIZAKI M, HOSHIKUMA K, YOKOO Y, KAMIYA T. **Capsaicin-Like Anti-Obese Activities of Evodiamine from Fruits of *Evodia rutaecarpa*, a Vanilloid Receptor Agonist**. *Planta Med*, 67: 628 – 633.

LEBOVITZ H E, BANERJI M A. **Point: Visceral Adiposity Is Causally Related to Insulin Resistance**. *Diabetes Care*, v. 28, n. 9, p. 2322 – 2325, 2005.

LIMA FB, CURI R. Moléculas ativas produzidas por órgãos não-endócrinos. In: AIRES M de M. **Fisiologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1077 – 1096.

LIU I-M, TZENG T-F, LIOU S-S, LAN T-W. **Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats**. *Life Sciences*, v. 81, n. 21-22, p. 1479-1488, 2007.

MA LJ, MAO SL, TAYLOR KL, KANJANABUCH T, GUAN Y, ZHANG Y, BROWN NJ, SWIFT LL, MCGUINNESS OP, WASSERMAN DH, VAUGHAN DE, FOGO AB. **Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1**. *Diabetes*, v. 53, n. 2, p. 336 – 346, 2004.

MACHADO UF, CARPINELLI AR, ZECCHIN HG, SAAD MJA. Pâncreas Endócrino. In: AIRES M de M. **Fisiologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1077 – 1096.

MAE T, KISHIDA H, NISHIYAMA T, TSUKAGAWA M, KONISHI E, KURODA M, MIMAKI Y, SASHIDA Y, TAKAHASHI K, KAWADA T, NAKAGAWA K, KITAHARA M. **A Licorice Ethanolic Extract with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  Ligand-Binding Activity Affects Diabetes in KK-Ay Mice, Abdominal Obesity in Diet-Induced Obese C57BL Mice and Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats**. *J. Nutr.*, v. 133, p. 3369–3377, 2003.

MANCINI MC. Noções Fundamentais – Diagnóstico e Classificação da Obesidade. In: GARRIDO JR AB, FERRAZ EM, BARROSO FL, MARCHESINI JB, SZÊGO T. **Cirurgia da Obesidade**. 1ª edição. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 1-7.

MARTINS F, NOSSO TM, PORTO VB, CURIEL A, GAMBERO A, BASTOS DHM, RIBEIRO ML, CARVALHO PdeO. **Maté Tea Inhibits In Vitro Pancreatic Lipase Activity And Has a Hypolipidemic Effect on High-Fat Induced Obese Mice.** *Obesity*, v. 18, n. 1, p. 42 – 47, 2010.

MARTINS M. Etiopatogenia da insulino-resistência / hiperinsulinismo. In: GEIR – Grupo de Estudo da Insulino-Resistência da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. **Manual sobre insulino-resistência.** 3ª edição. Ed. Helena Cardoso, 2009. p. 22 – 27.

NADERALI EK, PICKAVANCE LC, WILDING JPH, WILLIAMS G. **Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight.** *Clinical Science*, v. 100, p. 635 – 641, 2001.

NIELSEN Y, GLASS L, TREPLITT C, WAJCBERG E, MANDARINO L J, DeFRONZO R A. **Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in DM2.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 283, p. 1135 – 1143, 2002.

OMS. **Organização Mundial da Saúde – Prevenindo e controlando a epidemia global.** 1ª edição. São Paulo: Roca, 2004. 256p.

PERSEGHIN G, LATTUADA G, DeCOBELLI F, ESPOSITO L, BELLONI E, CANU T, RAGOGNA F, SCIFO P, DEL MASCHIO A, LUZI L. **Serum retinol-binding protein-4, leptin, and adiponectin concentrations are related to ectopic fat accumulation.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 92 p. 4883 – 4888, 2007.

PETERSEN KF, SHULMAN GI. **Cellular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle.** *J R Soc Med*, v. 95, n. 42, p. 8–13, 2002.

PIJL H. **Leptin resistance.** *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*, v. 32, n. 1, p. 3 – 8, 2007.

POF 2008-2009. **Pesquisa de Orçamentos Familiares – Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil.** Ministério da Saúde. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Rio de Janeiro, 2010.

POLONSKY KS, GIVEN BD, HIRSCH L, SHAPIRO ET, TILLIL H, BEEBE C, GALLOWAY JA, FRANK BH, KARRISON T, VAN CAUTER E. **Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects.** *J. Clin. Invest.*, v. 81, p. 435–441, 1988.

POMPLUN D, VOIGT A, SCHULZ TJ, THIERBACH R, PFEIFFER AF, RISTOW M. **Reduced expression of mitochondrial frataxin in mice exacerbates diet-induced obesity.** *PNAS*, v. 104, n. 15, p. 6377 – 6381, 2007.

PRESTA GA, FONSECA AS, BERNARDO-FILHO M. **A Chrysobalanus icaco extract alters the plasmid topology and the effects of stannous chloride on the DNA of plasmids.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 3, p. 331 – 335,

2007.

PRESTA GA, PEREIRA NA. **Atividade do Abagerú (*Chrysobalanus Icaco* Lin, *Chrysobalanaceae*) em Modelos Experimentais para o estudo de Plantas Hipoglicemiantes.** Rev Bras Farm, v. 68, p. 91 – 101, 1987.

PRIOR RL, WU X, GU L, HAGER TJ, HAGER A, HOWARD LR. **Whole Berries versus Berry Anthocyanins: Interactions with Dietary Fat Levels in the C57BL/6J Mouse Model of Obesity.** J. Agric. Food Chem., v. 56, p. 647–653, 2008.

QI Y, TAKAHASHI N, HILEMAN SM, PATEL HR, BERG AH, PAJVANI UB, SCHERER PE, AHIMA RS. **Adiponectin acts in the brain to decrease body weight.** Nat. Med., v. 10, p. 524–529, 2004.

RAMÍREZ-VILLALOBOS M, URDANETA-FERNÁNDEZ A, VARGAS-SIMÓN G. **Tratamientos con ácido indolbutírico y lesionado sobre El enraizamiento de estacas de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.).** Agronomía Trop, v. 54, n. 2, p. 203 – 218, 2004.

REPETTO G, RIZOLLI J, BONATTO C. **Prevalência, riscos e soluções na obesidade e sobrepeso: here, there and everywhere.** Arch Bras Endocrinol Metabol, v. 47, n. 6, p. 633 – 635, 2003.

RISTOW M, MULLER-WIELAND I, PFEIFFER A, KRONE W, KAHN R. **Obesity Associated with a Mutation in a Genetic Regulator of Adipocyte Differentiation.** N Engl J Med, v. 339, n. 14, p. 953 – 959, 1998.

RIVERA L, MORÓN R, SÁNCHEZ M, ZARZUELO A, GALISTEO M. **Quercetin Ameliorates Metabolic Syndrome and Improves the Inflammatory Status in Obese Zucker Rats.** Obesity, v. 16, p. 2081 – 2087, 2008.

SANTORO M, CIRILLO G, XIANG Z, TANAS R, GREGGIO N, MORINO G, IUGHETTI L, VOTTERO A, SALVATONI A, PIETRO M DI, BALSAMO A, CRINÒ A, GRANDONE A, HASKELL-LUEVANO C, PERRONE L, GIUDICE EM DEL. **Prevalence of pathogenetic MC4R mutations in Italian children with early Onset obesity, tall stature and familial history of obesity.** BMC Medical Genetics, v. 10, n. 25, p. 1 – 9, 2009.

SARTORELLI DS, FRANCO LJ. **Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19 (Sup. 1), p. S29-S36, 2003.

SAVAGE DB, SEWTER CP, KLENK ES, et al. **Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans.** Diabetes, v. 50, p. 2199 – 2202, 2001.

SHAH P. **Insulin Resistance (IR) in Impaired Glucose Tolerance (IGT).** Int. J. Diab. Dev. Countries, v. 16, p. 16 – 18, 1996.

SHIMOMURA I, FUNAHASHI T, TAKAHASHI M, MAEDA K, KOTANI K, NAKAMURA T, YAMASHITA S, MIURA M, FUKUDA Y, TAKEMURA K, TOKUNAGA K, MATSUZAWA Y. **Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity.** *Nat Med.*, v. 2, n. 7, p. 800 – 803, 1996.

SHISHEVA A, SHECHTER Y. **Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes.** *Biochemistry*, v.31, n. 34, p.8059 – 8063, 1992.

SHULMAN G I. **Cellular mechanisms of insulin resistance.** *J Clin Invest*, v. 106, p. 171 – 176, 2000.

SIMÕES CMO, MENTZ LA, SCHENKEL EP, NICOLAU M, BETTEGA JR. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul.** 5ª edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. p. 150.

STEHNO-BITTEL L. **Intricacies of Fat.** *Physical Therapy*, v. 88, n. 11, p. 1265 – 1278, 2008.

STEPPAN CM, BAILEY ST, BHAT S, BROWN EJ, BANERJEE RR, WRIGHT CM, PATEL HR, AHIMA RS, LAZAR MA. **The hormone resistin links obesity to diabetes.** *Nature*, v. 409, p. 307 – 312, 2001.

STEWART LK, SOILEAU JF, RIBNICKY D, WANG ZQ, RASKIN I, POULEV A, MAJEWSKI M, CEFALU WT, GETTYS TW. **Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet.** *Metabolism*, v. 57, n. 7 (Supl 1), p. S39–S46, 2008.

STROBEL P, ALLARD C, PEREZ-ACLE T, CALDERON R, ALDUNATE R, LEIGHTON F. **Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes.** *Biochem. J.*, v. 386, p. 471 – 478, 2005.

TOWNSEND KL, LORENZI MM, WIDMAIER EP. **High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice.** *Endocrine*, v. 33, n. 2, p. 176 – 188, 2008.

VARGAS-SIMÓN G, SOTO-HERNÁNDEZ RM, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ MT. **Análisi preliminar de antocianinas en fruto de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.).** *Revista Fitotecnia Mexicana*, v. 25, n. 3, p. 261 – 164, 2002.

VARGAS-SIMÓN G, SOTO-HERNÁNDEZ RM, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ MT, ESCALANTE EJ. **Análisis fitoquímico preliminar del fruto de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.): flavonoles y flavonas.** *Revista Chapingo, serie horticultura*, v. 6, n. 2, p. 196 – 202, 2000.

VILLARROYA J, GIRALT M, VILLARROYA F. **Mitochondrial DNA: An Up-and-coming Actor in White Adipose Tissue Pathophysiology**. *Obesity*, v. 17, n. 10, p. 1814 – 1820, 2009.

WANNMACHER L. **Obesidade: Evidências e Fantasias**. *Uso Racional de Medicamentos: Temas Seleccionados*, v. 1, n. 3, p. 1 – 6, 2004.

WEISBERG SP, McCANN D, DESAI M, ROSENBAUM M, LEIBEL RL, FERRANTE Jr AW. **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue**. *J. Clin. Invest.*, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WHO. World Health Organization. BMI Classification. Disponível em: ([http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)). Acessado em: 25 out. 2009.

YAMAUCHI T, KAMON J, MINOKOSHI Y, ITO K, WAKI H, USHIDA S, YAMASHITA S, NODA M, KITA S, UEKI K, ETO K, AKANUMA Y, FROGUEL P, FOUFELLE F, FERRE P, CARLING D, KIMURA S, NAGAI R, KAHN BB, KADOWAKI T. **Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase**. *Nat. Med.*, v. 8, p. 1288–1295, 2002.

YUN SN, MOON SJ, KO SK, IM BO, CHUNG SH. **Wild Ginseng Prevents the Onset of High-Fat Diet Induced Hyperglycemia and Obesity in ICR Mice**. *ArchPharm Res.*, v. 27, n. 7, p. 790 – 796, 2004.

XU H, BARNES G T, YANG Q, TAN G, YANG D, CHOU C J. **Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance**. *J. Clin. Invest.*, v. 112, p. 1821 – 1830, 2003.

ZILBERSTEIN B, NETO MG, RAMOS AC. **O Papel da Cirurgia no Tratamento da Obesidade**. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 59, n. 4, p. 258 – 264, 2002.

ZÚÑIGAS JR. **Oil seeds from the American tropics**. *Arch Latinoam Nutr*, v. 31, n. 2, p. 350 – 370, 1981.

## 9. ANEXOS

### 9.1 – Anexo A



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

### DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado “Efeito do extrato aquoso de abajeru (*Chrysobalanus icaco*) na redução de peso em camundongos obesos”, sob coordenação do Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos (protocolo CEPA 40/2010), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 03/09/2010.

São Cristóvão, 22 de setembro de 2010

Prof.ª. Dr.ª. Flávia Teixeira Silva  
Presidente do CEPA/UFS



## 9.2 Anexo – B

Elsevier Editorial SystemTM http://ees.elsevier.com/jep/default.asp

---



**Journal of  
ETHNOPHARMACOLOGY**

Contact us   
Help ?

EES has been upgraded! [Read more](#)  
Register for TrainingDesk sessions on 2011.1 upgrade

---

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: Polly White  
Role: Author

Version: EES 2011.1

---

**Submissions Being Processed for Author Pollyanna Alves Secundo White, MSc**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
+ Action 		Aqueous extract of <i>Chrysobalanus icaco</i> L. leaves (Chrysobalanaceae) normalizes blood glucose and insulin sensitivity and inhibits weight gain in high-fat diet induced obese mice.	24/01/2011	24/01/2011	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

---

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#)

© 2006 - 2011 Elsevier BV.

---

1 de 1 24/1/2011 08:25

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Ethnopharmacology

Manuscript Number: JEP-D-11-00181

Title: Aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* L. leaves (Chrysobalanaceae) normalizes blood glucose and insulin sensitivity and inhibits weight gain in high-fat diet induced obese mice.

Article Type: Full Length Article