



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS*
SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE RATOS SUBMETIDOS AOS
MODELOS DE DIABETES E DISLIPIDÊMIA**

MAIZA CRISTINA VON DENTZ

Porto Alegre

2018

MAIZA CRISTINA VON DENTZ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS*
SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE RATOS SUBMETIDOS AOS
MODELOS DE DIABETES E DISLIPIDÊMIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski

Co-orientador: Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Von Dentz, Maiza Cristina

Avaliação da atividade do extrato de *Pycnopus sanguineus* sobre o metabolismo energético de ratos submetidos aos modelos de diabetes e dislipidemia / Maiza Cristina Von Dentz. -- 2018.

53 f.

Orientador: Luiz Carlos Rios Kucharski.

Coorientador: Matheus Parmegiani Jahn.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Pycnopus sanguineus*. 2. Diabetes. 3. Dislipidemia. 4. Metabolismo. 5. Fisiologia. I. Rios Kucharski, Luiz Carlos, orient. II. Parmegiani Jahn, Matheus, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Luiz Carlos Kucharski pela orientação durante o desenvolvimento desse trabalho, que me ajudou a conduzi-lo sempre com tranquilidade mesmo diante dos contratemplos. Suas habilidades em lidar com eventos inesperados e em contribuir sempre de forma positiva não apenas melhoraram nosso trabalho como tornaram o período de mestrado muito mais agradável.

Ao professor Matheus Parmegiani Jahn pela co-orientação, pela disponibilidade e pelas sugestões e críticas construtivas. A professora Marli Camassola pela colaboração e suporte ao longo de todo este estudo, que sem dúvida não existiria sem a sua contribuição. Ao professor Eliseu Rodrigues também pela colaboração e pela disponibilização do seu laboratório para as análises finais.

Aos colegas e professores do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada pelo auxílio na realização dos experimentos e análises e pela companhia que tornou os dias de trabalho mais divertidos.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela formação e pelo suporte financeiro.

A minha amiga Sarah Webber, que me ajudou de diversas formas sempre fazendo o que estava ao seu alcance. Obrigada por muitas vezes abdicar do seu tempo e do seu descanso para me auxiliar.

Ao meu namorado, Rafael Ventura, pelo apoio em todas as minhas decisões ao longo da graduação e pós-graduação, pelo incentivo diante das minhas dúvidas e pelo ombro amigo diante das minhas frustrações. Obrigada por ser meu companheiro de vida.

E por fim, a minha família, em especial aos meus pais, Geraldo Von Dentz e Regina Von Dentz. Obrigada por me educarem para ser determinada e persistente e também por apoiarem minhas decisões com confiança nas minhas escolhas. Obrigada por serem meu amparo nos dias difíceis e fornecerem um lugar seguro nesses momentos. Vocês são à base de tudo o que construí até hoje, obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Metabolismo de lipídios	1
1.1.1 Caracterização dos lipídios no organismo	1
1.1.2 Transporte de lipídios	2
1.2 Obesidade	5
1.3 Diabetes e Resistência a Insulina	9
1.4 Síndrome metabólica	12
1.5 Aterosclerose x Obesidade e Diabetes	16
1.6 Alimentos funcionais e Nutraceuticos	19
1.7 Macrofungos	21
1.7.1 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	22
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	26
2.1 Hipótese	26
2.2 Objetivo geral	26
2.3 Objetivos específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Local e realização dos experimentos	27
3.2 Animais	27
3.3 Obtenção do extrato	28
3.3.1 Coleta e identificação da amostra.....	28
3.3.2 Cultivo do cogumelo	28

3.3.3	Produção do extrato.....	28
3.4	Análise do extrato por HPLC-MS.....	29
3.5	Tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i>.....	29
3.6	Experimento 1: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de <i>P. sanguineus</i> em ratos diabéticos.....	30
3.6.1	Desenho experimental.....	30
3.6.2	Indução a diabetes.....	30
3.6.3	Processamento dos tecidos.....	31
3.7	Experimento 2: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de <i>P. sanguineus</i> em ratos dislipidêmicos.....	32
3.7.1	Desenho experimental.....	32
3.7.2	Indução a dislipidemia.....	32
3.7.3	Processamento dos tecidos.....	34
3.8	Descrição das técnicas realizadas.....	34
3.8.1	Morfometria e relação tecido/peso corporal total.....	34
3.8.2	Dosagens séricas.....	35
3.8.3	Determinação da concentração de triglicerídeos no fígado.....	35
3.8.4	Determinação da concentração de glicogênio no fígado.....	35
3.8.5	Oxidação de glicose (produção de ¹⁴ CO ₂).....	36
3.8.6	Síntese de lipídios a partir de glicose.....	36
3.8.7	Síntese de glicogênio a partir de glicose no fígado.....	37
3.8.8	Análise da lipólise no tecido adiposo retroperitoneal.....	37
3.8.9	Captação de glicose no músculo sóleo.....	38
3.9	Descarte de resíduos.....	38
3.10	Análise estatística.....	38
4.	RESULTADOS.....	40
4.1	Análise do extrato por HPLC-MS.....	40

4.2 Experimento 1: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de <i>P. sanguineus</i> em ratos diabéticos	41
4.2.1 Parâmetros morfométricos.....	41
4.2.2 Parâmetros Séricos	43
4.2.3 Metabolismo Hepático	44
4.2.4 Metabolismo do tecido adiposo retroperitoneal	46
4.2.5 Metabolismo muscular	47
4.3 Experimento 2: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de <i>P. sanguineus</i> em ratos dislipidêmicos	48
4.3.1 Parâmetros morfométricos.....	48
4.3.2 Parâmetros séricos.....	49
4.3.3 Metabolismo hepático.....	50
4.3.4 Metabolismo no tecido adiposo retroperitoneal	52
4.3.5 Metabolismo muscular	54
5 DISCUSSÃO	55
5.1 Experimento 1: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de <i>P. sanguineus</i> em ratos diabéticos	56
5.2 Experimento 2: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de <i>P. sanguineus</i> em ratos dislipidêmicos	63
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

[U-¹⁴C]-glicose: glicose uniformemente marcada com carbono 14 (metabolizável)

2-deoxi-D-[³H]-glicose-triciada: glicose marcada no terceiro hidrogênio (não metabolizável)

ABC-A1: *ATP-binding cassette A1*

Acetil-CoA: Acetil Coenzima A

AG: Ácidos Graxos

AGL: Ácidos Graxos Livres

ALT: Alanina Aminotransferase

AMPc: Monofosfato Cíclico de Adenosina

ANOVA: Análise de Variância

APO: Apolipoproteína

AST: Aspartato Aminotransferase

AT-II: Angiotensina II

ATP: adenosina trifosfato

AVC: Acidente Vascular Cerebral

CEUA: Comissão de Ética e Uso de Animais

CETP: Proteína de Transferência do Éster de Colesterol

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CT: Colesterol Total

CTR H₂O: Controle Tratado com Água

CTR Pyc: Controle Tratado com o Extrato Aquoso de *P. sanguineus*

DBT H₂O: Diabético Tratado com Água

DBT Pyc: Diabético Tratado com o Extrato Aquoso de *P. sanguineus*

DC: Doenças Cardiovasculares

DIS H₂O: Dislipidêmico Tratado com Água

DIS Pyc: Dislipidêmico Tratado com o Extrato Aquoso de *P. sanguineus*

DM: *Diabetes Mellitus*

DM I: *Diabetes Mellitus* Tipo I

DM II: *Diabetes Mellitus* Tipo II

EM: Espectrometria de Massa

GLUT: Transportador de Glicose

HDL: Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-C: Colesterol HDL
HMG CoA redutase: 3-hidroxy-3-methyl-glutaril CoA redutase
IAA-I: Inibidor do Ativador do Angiotensinogênio I
IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDL: Lipoproteína de Densidade Intermediária
IL-6: Interleucina 6
IMC: Índice de Massa Corporal
IP: Intraperitoneal
IRS: Substratos do Receptor de Insulina
LCAT: Lecitina-colesterol-aciltransferase
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-C: Colesterol LDL
LDL-R: Receptores de LDL
LPL: Lipases Lipoproteica
MAPK: Proteína-Cinases Ativadas por Mitógenos
MTP: Proteína de Transferência de Triacilglicerol Microsomal
PAI-I: Inibidor do Ativador do Plasminogênio I
PCT: Peso Corporal Total
PI3-K: Fosfoinosítideo 3-cinase
PPAR: Receptor Ativado por Proliferados de Peroxissoma
RI: Resistência a Insulina
SM: Síndrome Metabólica
SNS: Sistema Nervoso Simpático
SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosteron
SR-BI: Receptor *sacavenger* B-I
SREBP: Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta a Esterol
STZ: Estreptozotocina
SUS: Sistema Único de Saúde
TAR: Tecido Adiposo Retroperitoneal
TAE: Tecido Adiposo Epididimal
TG: Triglicerídeos
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa
VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Índice de massa corporal em homens adultos (+18 anos) em 2014. (Adaptado de WHO, 2017).....	6
Figura 2 Índice de massa corporal em mulheres adultas (+18 anos) em 2014. (Adaptado de WHO, 2017).....	7
Figura 3 Prevalência de sobrepeso e obesidade na população adulta (maiores de 18 anos) em países da América Latina e Caribe em porcentagem (Adaptado de FAO/OPS, 2017).	8
Figura 4 Prevalência de diabetes em adultos (20-79 anos) no mundo em 2015 (Adaptado e IDF, 2015).....	11
Figura 5 Apresentação esquemática da Síndrome Metabólica com destaque para os efeitos do aumento do tecido adiposo. (Adaptado de Kaur e Jaspinder, 2014).	15
Figura 6 Estrutura da fenoxazinona (a) e seus derivados cinabarina (b), ácido cinabarínico (c) e tramesanguina (d). Fonte: PubChem Compound.	23
Figura 7 Grupos experimentais do experimento 1.....	30
Figura 8 Desenho experimental do experimento 1.	31
Figura 9 Dosagens metabólicas e bioquímicas realizadas no experimento 1.	31
Figura 10 Grupos experimentais do experimento 2.....	32
Figura 11 Desenho experimental do experimento 2.	33
Figura 12 Dosagens metabólicas e bioquímicas realizadas no experimento 2.	34
Figura 13 Cromatograma do extrato de <i>P. sanguineus</i> apresentando os componentes principais: 1 - ácido cinabarínico e 2 - cinabarina.	40

Figura 14 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a concentração hepática de triglicerídeos (A) e glicogênio (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes.....	44
Figura 15 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a oxidação de glicose a CO ₂ no fígado em ratos submetidos ao modelo de diabetes.....	45
Figura 16 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a conversão hepática de glicose a glicogênio (A) e lipídios (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes.....	45
Figura 17 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a oxidação de glicose a CO ₂ no tecido adiposo retroperitoneal em ratos submetidos ao modelo de diabetes.....	46
Figura 18 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a conversão hepática de glicose a lipídios em ratos submetidos ao modelo de diabetes.	46
Figura 19 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a captação de glicose no músculo em ratos submetidos ao modelo de diabetes.....	47
Figura 20 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a concentração hepática de triglicerídeos (A) e glicogênio (B) em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.	50
Figura 21 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a oxidação de glicose a CO ₂ no fígado em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.	51
Figura 22 Efeito do tratamento com o extrato de <i>P. sanguineus</i> sobre a conversão hepática de glicose a glicogênio (A) e lipídios (B) em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.....	51

Figura 23 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a oxidação de glicose a CO₂ no tecido adiposo retroperitoneal em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.....52

Figura 24 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a conversão de glicose a lipídios (A) e de triglicerídeos a glicerol (B) no tecido adiposo retroperitoneal em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.....53

Figura 25 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a captação de glicose no músculo em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia..54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição das dietas utilizadas no protocolo experimental.....	33
Tabela 2 Ingredientes utilizados no preparo da dieta hiperlipídica artesanal.....	33
Tabela 3 Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos encontrados obtidas por HPLC-DAD-ESI-MS.	40
Tabela 4 Efeito do tratamento com extrato aquoso de <i>P. sanguineus</i> sobre parâmetros morfométricos em ratos submetidos ao modelo de diabetes.	42
Tabela 5 Efeito do tratamento com extrato aquoso de <i>P. sanguineus</i> sobre parâmetros séricos em ratos submetidos ao modelo de diabetes.....	43
Tabela 6 Efeito do tratamento com extrato aquoso de <i>P. sanguineus</i> sobre parâmetros morfométricos em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.	48
Tabela 7 Efeito do tratamento com extrato aquoso de <i>P. sanguineus</i> sobre parâmetros séricos em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.	49

RESUMO

A obesidade e a *diabetes mellitus* são duas comorbidades que aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, acarretando prejuízos à saúde, perda da qualidade de vida e custos econômicos. A busca por tratamentos, que representem menor custo de produção e menos efeitos adversos, é realizada muitas vezes mediante estudo de extratos naturais. Os extratos naturais concentram compostos bioativos que amplificam o efeito benéfico do consumo de determinados alimentos sobre o metabolismo. Extratos naturais se destacam pela capacidade de atuar no metabolismo de lipídios, modificando as concentrações séricas de triglicérides, colesterol total, colesterol HDL e LDL. Neste estudo, foi avaliado o efeito do tratamento com o extrato de *Pycnopus sanguineus* sobre o metabolismo de ratos diabéticos e ratos dislipidêmicos. Obteve-se efeito do extrato principalmente sobre o metabolismo de lipídios de ratos diabéticos. O tratamento atuou aumentando o ganho de peso, a oxidação de glicose no tecido adiposo retroperitoneal, além da síntese de lipídios a partir de glicose nesse mesmo tecido. Não foram observadas diferenças nos lipídios séricos. Nos ratos dislipidêmicos, o extrato teve comportamento diferente, atuando no aumento dos níveis de ureia e na diminuição da conversão hepática de glicose a glicogênio, assim como na captação muscular de glicose nos grupos controle. A análise do extrato por CLAE-EM não mostrou diferenças na concentração de cinabarina e ácido cinabarínico, quando se compara ao extrato de *P. sanguineus* utilizado em outros estudos. Acreditamos que o tratamento não foi tão efetivo quanto em outros estudos devido à forma de administração utilizada, que permitiu a diminuição da biodisponibilidade do composto ativo no sangue. No entanto, somando os dados obtidos na literatura aos efeitos sobre o metabolismo do tecido adiposo neste experimento, acreditamos que o extrato possa estar atuando via ativação do PPARs γ e/ou α . Os efeitos sobre o metabolismo hepático e muscular observados pela primeira vez neste trabalho, mostram que novos estudos devem ser conduzidos com mudanças na forma de administração para identificar os efeitos do extrato em outras vias relacionadas. Este estudo também propõe um modelo de síndrome metabólica obtido mediante dieta hiperlipídica produzida em nosso laboratório. O tratamento com esta dieta durante 60 dias foi capaz de causar dislipidemia, aumento dos níveis glicêmicos e resistência a insulina.

ABSTRACT

Obesity and *diabetes mellitus* are two comorbidities that increase the risk of developing cardiovascular diseases, leading to health losses, loss of life quality and economic costs. The search for treatments that represent lower cost of production and fewer side effects is often done through the study of natural extracts. The natural extracts concentrate bioactive compounds, amplifying the beneficial effect of the consumption of certain foods on the metabolism. Natural extracts have been highlighted because of their ability to act on lipid metabolism, modifying the serum concentrations of triglycerides, total cholesterol, HDL and LDL cholesterol. In this study the effect of treatment with *Pycnopus sanguineus* extract on the metabolism of diabetic rats and dyslipidemic rats was evaluated. The effect of the extract was mainly on the lipid metabolism of diabetic rats. The treatment acted to increase the weight gain, the glucose oxidation in the retroperitoneal adipose tissue and the synthesis of lipids from glucose in the same tissue. No differences were observed in serum lipids. In the dyslipidemic rats, the extract had a different behavior by increasing the urea levels, and decreasing the hepatic conversion of glucose to glycogen and muscle glucose uptake in the control groups. Analysis of the extract by HPLC-MS showed no differences in the concentration of cinabarine and cinabarine acid compared to the extract of *P. sanguineus* used in other studies. We believe that the treatment was not as effective as in other studies due to the form of administration used, which allowed the bioavailability of the active compound to decrease in the blood. However, adding the data obtained in the literature to the effects on adipose tissue metabolism in this experiment, we believe that the extract may be acting by activating the γ and / or α PPARs. The effects on liver and muscle metabolism observed for the first time in this study show that further studies should be conducted with changes in the administration form to identify the effects of the extract on these and other related pathways. This study also proposes a model of metabolic syndrome obtained through a hyperlipidic diet produced in our laboratory. The treatment with this diet during 60 days was able to cause dyslipidemia, increase in glycemic levels and resistance to insulin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Metabolismo de lipídios*

1.1.1 *Caracterização dos lipídios no organismo*

Os lipídios são um grupo composto por moléculas quimicamente diversas cuja característica comum é a insolubilidade em água, sendo assim consideradas substâncias hidrofóbicas (NELSON et al., 2011). Assim como sua estrutura, suas funções também são diversas. Entre elas, destacam-se seu papel como fonte de energia (utilização e forma de armazenamento), sua participação na composição da estrutura de membranas celulares e sua função como precursor molecular para a síntese dos hormônios esteroides.

Do ponto de vista fisiológico e clínico, os lipídios biologicamente mais relevantes são os fosfolipídios, o colesterol, os triacilgliceróis (TG) e os ácidos graxos (AG) (XAVIER et al., 2013). No organismo esses lipídios podem ter origem exógena ou endógena e desequilíbrios na ingestão, síntese ou degradação dessas moléculas podem causar prejuízos à saúde.

Os fosfolipídios são moléculas anfipáticas, as quais possuem uma porção polar que pode ser representada simplesmente por um grupo –OH ou uma molécula de glicerol ligada a um grupo fosfato e uma porção apolar representada por uma ou duas cadeia de ácidos graxos. Os ácidos graxos são compostos por cadeias de hidrocarbonetos e o grupo carboxílico e compõem a porção lipídica dos fosfolipídios e triacilgliceróis. Os fosfolipídios são os principais constituintes das membranas celulares e sua característica anfipática permite a interação das porções hidrofóbicas entre si e das porções hidrofílicas com a água, direcionando seu empacotamento em camadas e formando então as bicamadas de membrana (NELSON et al., 2011).

O triacilglicerol é a forma de armazenamento dos lipídios no organismo, pode ser armazenado em diversos tecidos, sendo o principal deles o tecido adiposo. Cada triacilglicerol é composto por três cadeias de ácidos graxos esterificando uma molécula de glicerol. O triacilglicerol é adquirido principalmente por meio da dieta, mas também por ser produzido de forma endógena pelo fígado quando há estresse calórico. Nesse caso, os estoques de glicogênio no fígado e músculo são saturados e a glicose é convertida em acetil coenzima A (acetil-CoA) que então é utilizada para

a síntese de ácidos graxos que posteriormente são incorporados aos triacilgliceróis. (KOEPPEN; STANTON, 2009; NELSON, 2011).

O colesterol é precursor dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares e da vitamina D, também atua conferindo fluidez às membranas celulares e ativando enzimas nela situada (XAVIER et al., 2013). Apesar de não possuir ácidos graxos na sua composição, seu núcleo esterol é sintetizado a partir de partes de moléculas de ácidos graxos, o que lhe confere propriedades semelhantes às de outras substâncias lipídicas (HALL, 2011).

1.1.2 Transporte de lipídios

A característica hidrofóbica dos lipídios torna necessário o seu transporte em complexos denominados lipoproteínas. As apolipoproteínas (APOs), caracterizadas por ser a fração proteica desses complexos, permitem a solubilização dos lipídios e seu transporte no sangue. Existem as lipoproteínas ricas em TG, maiores e menos densas como os quilomícrons, as lipoproteínas de muito baixa densidade ou *very low density protein* (VLDL) e as lipoproteínas ricas em colesterol, como as de baixa densidade ou *low density protein* (LDL) e as proteínas de densidade alta ou *high density protein* (HDL). Existem ainda as proteínas de densidade intermediária ou *intermediary density protein* (IDL), lipoproteínas das quais uma quantidade de TG foi removida; e por isso, possuem concentrações maiores de colesterol e fosfolipídios (HALL, 2011; XAVIER et al., 2013).

O metabolismo das lipoproteínas está intimamente associado ao metabolismo de lipídios, visto que as lipoproteínas são responsáveis pelo transporte de lipídios, e logo são uma medida da quantidade de lipídios no sangue. O transporte e metabolismo de lipídios ocorrem por via intestinal, quando os lipídios são oriundos da alimentação, ou pela via hepática, quando sua origem é endógena e sua síntese ocorre no fígado (KOEPPEN; STANTON, 2009).

Na via intestinal os TGs provenientes da dieta sofrem emulsificação pelos sais biliares e formam micelas, estes são então hidrolisados pelas lipases pancreáticas em ácidos graxos livres (AGL) e monoglicerídeos que são absorvidos pela borda em escova do intestino por difusão. Na célula intestinal os lipídios são utilizados para a formação de quilomícrons. Os quilomícrons são então secretados pelas células intestinais no sistema linfático, e chegam aos capilares sanguíneos pelo ducto

linfático torácico. Enquanto os quilomícrons circulam pelos capilares, lipases lipoproteicas secretadas pelas células parênquimais e ancoradas no endotélio dos vasos dos tecidos adiposo e muscular promovem a hidrólise desses quilomícrons, liberando ácidos graxos livres e monoacil-glicerol. Os ácidos graxos e glicerol são rapidamente captados pelos adipócitos e células musculares para armazenamento na forma de TG ou produção de ATP. Os remanescentes dos quilomícrons, colesterol e AG são capturados pelo fígado para formação de VLDL (HALL, 2011).

Na via hepática os TG, colesterol e as lipoproteínas responsáveis pelo transporte desses lipídios são produzidos de forma endógena. Quando a disponibilidade de carboidratos ou proteínas for maior do que a necessidade energética ou maior do que a capacidade de estocar esses nutrientes na forma de glicogênio e proteína, ocorre a formação de TG no fígado a partir de glicose e aminoácidos. Os TG sintetizados no fígado são então transportados através da corrente sanguínea até o tecido adiposo, onde são captados e estocados nos adipócitos para reserva energética (HALL, 2011).

Para que os TG sejam transportados pelo sangue é necessário que o fígado promova o empacotamento desses lipídios em VLDL. A formação das VLDL ocorre a partir da transferência dos TG para a apolipoproteína B100 (apo B100), reação que é mediada pela proteína de transferência de triacilglicerol microsomal ou *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP). Os TG são então secretados pelo fígado para circulação na forma de VLDL. Assim como ocorre com os quilomícrons na via intestinal, os TG das VLDL são hidrolisados pelas lipases lipoproteicas (LPL) e redistribuídos para os tecidos periféricos. À medida que as VLDL são digeridas pelas lipases lipoproteicas, sua densidade aumenta e então essas lipoproteínas se tornam “remanescentes” de VLDL ou IDL. As “remanescentes” de VLDL e as IDL podem então ser capturados pelo fígado por endocitose mediante ativação dos receptores de LDL (LDL-R) ou continuam seus TG hidrolisados pelas lipases lipoproteicas até se tornarem LDL (SPOSITO et al., 2007).

A LDL tem contém colesterol e apo B100, além de TG residual (XAVIER et al., 2013). Dessa forma, com a formação de LDL o papel nutricional das lipoproteínas termina, visto que o colesterol não pode ser metabolizado para a obtenção de energia. Ainda assim, como dito anteriormente, o colesterol desempenha importantes funções estruturais e na síntese de hormônios, entre outras. Nesse

sentido, a LDL é uma fonte de colesterol única para as células que têm capacidade limitada de produção de colesterol. Por meio da ligação das LDL aos receptores de LDL (LDL-R) a LDL é endocitada fornecendo o colesterol às células (KOEPPEN; STANTON, 2009).

O colesterol em excesso nas células, sintetizado na própria célula ou adquirido via LDL, não pode ser metabolizado nos tecidos periféricos. Dessa forma, o colesterol é transportado dos tecidos periféricos para o fígado. O qual é capaz de excretá-lo na forma de sais biliares ou mesmo como colesterol. Esse processo é chamado de transporte reverso de colesterol e é mediado pelas proteínas de alta densidade (SPOSITO et al., 2007).

A HDL é produzida pelo fígado e intestino delgado e é composta por apo A-I, fosfolipídios e pela enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT). Na circulação, a HDL extrai o colesterol das células mediante complexo *ATP-binding cassette* A1 (ABC-A1). Uma vez associado à partícula de HDL, o colesterol extraído é esterificado pela enzima LCAT, assim seus ésteres podem acumular no interior da HDL. Isso, por sua vez, promove a estabilização e o transporte desses lipídios pela corrente sanguínea. A HDL pode então retornar o colesterol para o fígado de duas formas: i) Primeiramente, a proteína de transferência do éster de colesterol ou *cholesterol ester transfer protein* (CETP) pode promover trocas lipídicas entre a HDL e as VLDL, IDL e quilomícrons. Nesse processo, a HDL transfere seus ésteres de colesterol para essas proteínas em troca de TG. Assim o colesterol proveniente das células periféricas chega ao tecido através das VLDL, IDL e quilomícrons enriquecidos com colesterol. ii) Na segunda via, o colesterol chega ao fígado diretamente pela HDL, que se liga ao receptor *scavenger* B-I (SR-BI) na membrana dos hepatócitos (NELSON, 2011).

A HDL também é reconhecida pelos seus efeitos protetores no leito vascular. Ela inibe a oxidação e remove os lipídios oxidados na LDL, estimula a síntese e secreção de óxido nítrico pelas células endoteliais e inibe a fixação de moléculas de adesão e monócitos no endotélio (KOEPPEN; STANTON, 2009; XAVIER et al., 2013).

Desequilíbrios e disfunções no metabolismo de lipídios podem ocorrer por diversos motivos, desde mudanças na alimentação até alterações hormonais e anormalidades genéticas. Quando esses desequilíbrios ocorrem pode haver o

surgimento de doenças que afetam seriamente a qualidade de vida dos indivíduos como a obesidade e a *diabetes mellitus* (DM). A incidência dessas duas doenças tem aumentado de forma crescente e causado prejuízos econômicos e sociais no mundo todo, exigindo a atenção da comunidade científica sobre esse problema.

1.2 Obesidade

A obesidade costuma ser definida simplesmente como o acúmulo de tecido adiposo em excesso no organismo, acarretando prejuízos à saúde. De forma simplificada, o acúmulo de gordura surge devido a modificações no equilíbrio energético que alteram a relação entre consumo calórico e gasto energético (WHO, 2000).

O balanço energético pode ser regulado pelo sistema neuroendócrino por três vias. A via aferente envolve a leptina e outros sinais de saciedade e apetite a curto prazo, a fim de controlar o comportamento alimentar. Há ainda a unidade de processamento do sistema nervoso central e a via eferente, que é um complexo de apetite, saciedade e efetores autônomos e termogênicos que levam ao estoque energético e regulação do peso corporal a longo prazo (WOODS et al., 2004; BENOIT et al., 2009; ABESO, 2016).

Embora a relação entre o consumo calórico e o gasto energético não seja a única via de ganho de gordura corporal, o rápido aumento da incidência de obesidade nos últimos anos leva a acreditar que esse distúrbio está relacionado principalmente a mudanças ambientais e de comportamento, e não somente, a fatores genéticos e disfunções endócrinas (WHO, 2000).

Os prejuízos associados à obesidade não estão relacionados apenas à quantidade de gordura no organismo, mas também à distribuição dessa gordura e ao ganho de peso durante a idade adulta (WHO, 2000). É possível observar isso relacionando o padrão de distribuição de gordura feminino e masculino em obesos com o desenvolvimento de anormalidades metabólicas. Enquanto mulheres possuem maiores depósitos de gordura nos quadris e coxas, homens possuem a maior parte da gordura armazenada na porção abdominal e apresentam maior risco de desenvolver hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipertensão (KROTKIEWSKI et al., 1983).

O risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DC) é altamente expressivo em indivíduos obesos. A obesidade predispõe o indivíduo a uma série de fatores de risco como hipertensão e dislipidemia que podem acarretar aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e doenças cerebrovasculares (AKIYAMA et al., 1996; DOURMASHKIN et al., 2005). O desenvolvimento e morte por aterosclerose coronariana, por exemplo, têm como principal causa a obesidade (WHO, 2000).

O acúmulo de gordura abdominal assim como a própria obesidade está relacionado também ao desenvolvimento de diabetes tipo II (DM II), com o aumento da resistência à insulina (RI) e diminuição da tolerância à glicose (AKIYAMA et al., 1996; JANG et al., 2003; WOODS et al., 2003). O risco de desenvolver DM II aumenta continuamente com o índice de massa corporal (IMC) e diminui com a perda de peso em ambos os sexos. Estudos mostraram que cerca de 64% dos casos masculinos e 74% dos casos femininos de obesos com DM II poderiam ser evitados se o IMC dos indivíduos fosse abaixo de 25 Kg/m² (COLDITZ et al., 1990; CHAN et al., 1994).

A obesidade ainda acarreta em uma série de desajustes endócrinos e metabólicas como aumento da secreção de insulina, aumento da testosterona livre e diminuição da progesterona em mulheres, diminuição dos níveis de testosterona em homens, aumento da produção de cortisol e diminuição dos níveis de hormônio do crescimento (DOURMASHKIN et al., 2005; WHO, 2017).

Há ainda outra série de comorbidades associadas à obesidade, como hiperleptinemia, transtornos psicológicos e alguns tipos de câncer (WHO, 2000; JANG et al., 2003; WOODS et al., 2003; O'NEILL; O'DRISCOLL, 2015).

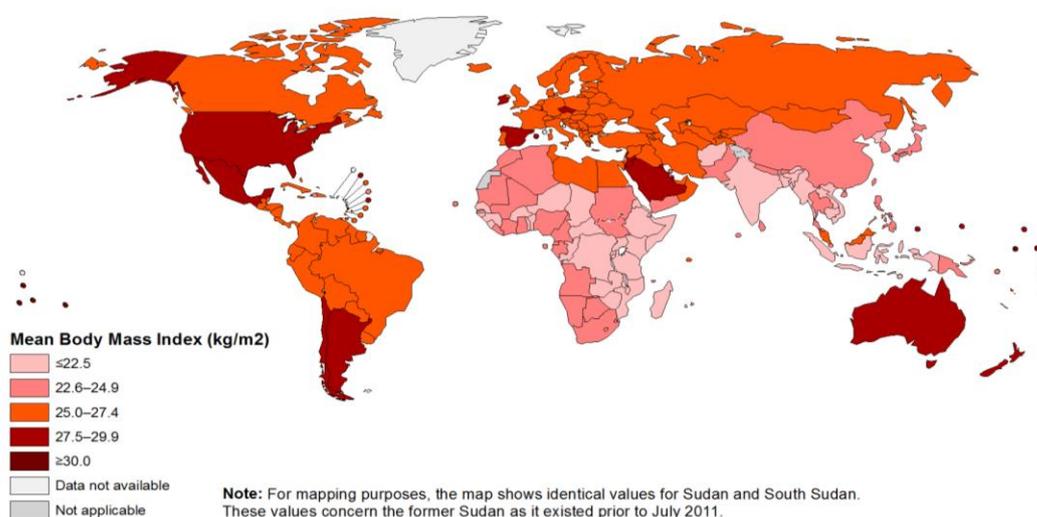


Figura 1 Índice de massa corporal em homens adultos (+18 anos) em 2014. IMC > 25 Kg/m² é considerado sobrepeso e acima de 30 Kg/m² é considerado obeso (Adaptado de WHO, 2017).

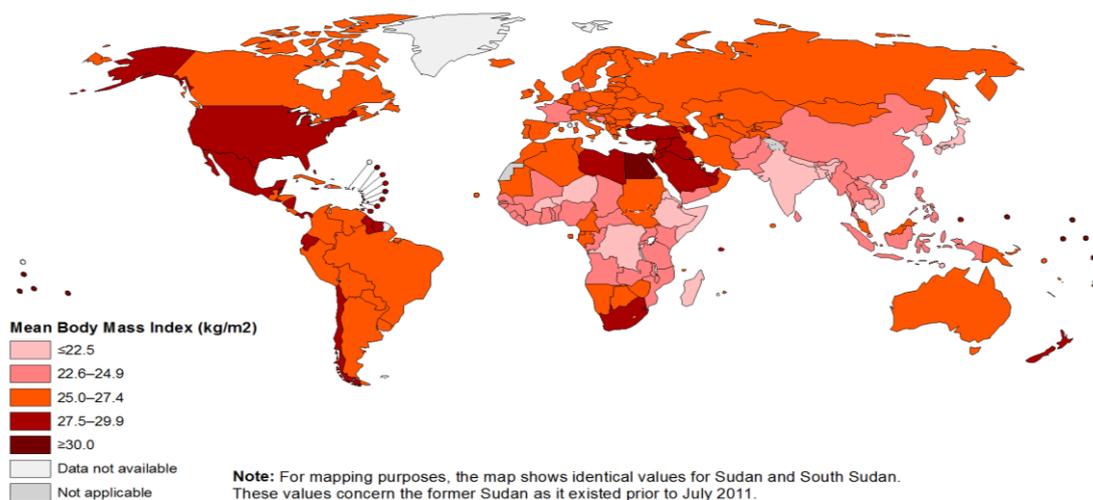


Figura 2 Índice de massa corporal em mulheres adultas (+18 anos) em 2014. IMC > 25 Kg/m² é considerado sobrepeso e acima de 30 Kg/m² é considerado obeso (Adaptado de WHO, 2017).

Por todas as doenças associadas à obesidade, esse distúrbio tem se tornado um problema mundial de proporções epidêmicas. A Organização Mundial da Saúde já aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (figuras 1 e 2). A projeção é que em 2025 cerca de 2,3 bilhões de adultos no mundo estejam com sobre peso e mais de 700 milhões obesos, outros relatórios apontam que até 2030 mais da metade da população mundial adulta poderá estar com sobrepeso (KELLY et al., 2008; ABESO, 2017).

A taxa de obesidade aumenta ano a ano em homens e mulheres não apenas nos países desenvolvidos, mas também em países em desenvolvimento. Na população brasileira o excesso de peso, considerado para indivíduos que possuem IMC entre 25 e 30 Kg/m², chega à incidência de 65,8% entre os homens e 55,8% em mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A incidência é muito parecida em outros lugares do mundo. Na maioria dos países da América Latina o sobrepeso afeta mais da metade da população adulta (figura 3), fato preocupante devido ao alto custo econômico e social causado por esse problema (FAO/OPS, 2017).

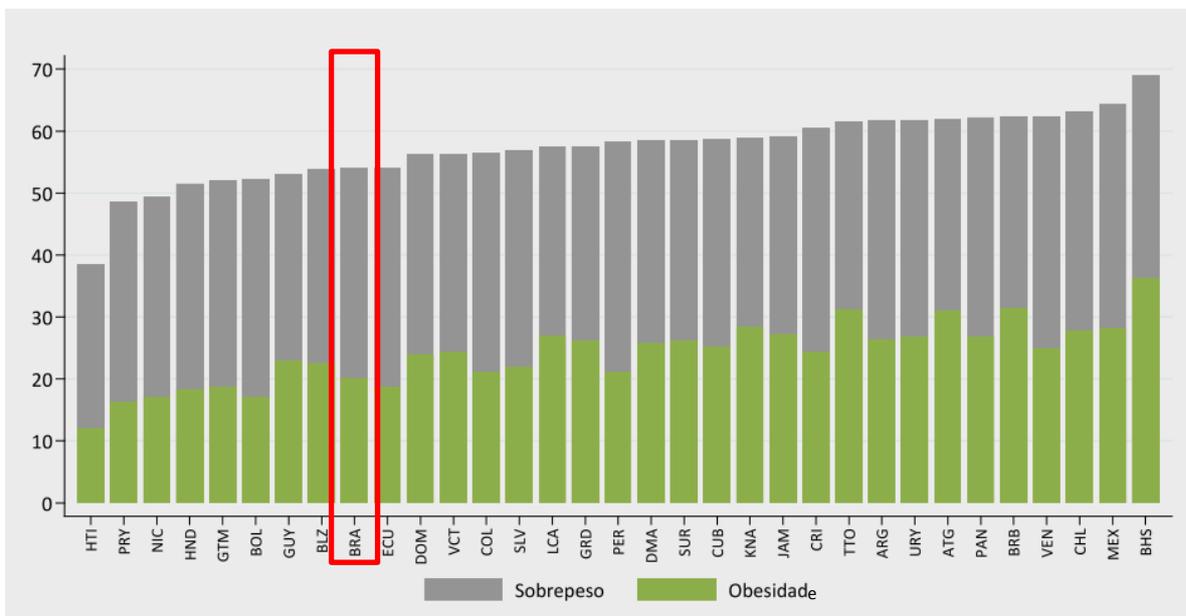


Figura 3 Prevalência de sobrepeso e obesidade na população adulta (maiores de 18 anos) em países da América Latina e Caribe em porcentagem (Adaptado de FAO/OPS, 2017).

Para se ter uma ideia do tamanho do impacto econômico global, os custos com obesidade estão equiparados aos gastos com violência armada e tabagismo. Em números, isso significa 2 trilhões de dólares ou 2,8% do PIB global. Em todo o mundo, 2 a 7% de todos os gastos com saúde estão relacionados com a prevenção e tratamento dessa condição e 20% com doenças relacionadas com DM II e doenças cardiovasculares (DOBBS et al., 2014).

Além da perda da qualidade de vida do próprio indivíduo os custos econômicos são devidos à perda de produtividade econômica pela redução de anos de vida produtiva e aposentadorias precoces, aos tratamentos fornecidos pelos sistemas de saúde e aos investimentos necessários para mitigar o impacto da obesidade (BAHIA; ARAÚJO, 2014; DOBBS et al., 2014).

Nos Estados Unidos o gasto *per capita* com um indivíduo obeso é aproximadamente de 42 a 100% maior do que com um indivíduo de peso normal (FINKELSTEIN et al., 2009). Poucos estudos no Brasil estimam os custos diretos e indiretos devido à obesidade no país. Todavia, as pesquisas existentes observaram que 3 a 5% de todas as internações no Brasil foram decorrentes de doenças relacionadas à obesidade e que entre 3 a 11 dias por ano de trabalho são perdidos em função da obesidade e doenças associadas (SICHIERI; NASCIMENTO; COUTINHO, 2007).

Estima-se que o Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) gaste anualmente R\$ 3,6 bilhões por ano com o tratamento da obesidade e doenças associadas, sendo que as doenças cardiovasculares são responsáveis por 67% desses custos (BAHIA et al., 2012). Considerando que grande parte da população brasileira

depende exclusivamente da assistência médica oferecida pelo SUS para o tratamento de doenças, e que o número de casos de sobrepeso se tornou crescente, de forma a representar uma ameaça à sustentabilidade do tratamento desses indivíduos, a obesidade está sendo classificada como um problema de saúde e econômico (BAHIA et al., 2012; ABESO, 2016).

Entretanto a obesidade não é o único distúrbio que vem se estabelecendo de forma preocupante, a *diabetes mellitus* (DM) é outra doença não menos prejudicial que tem tomado proporções epidêmicas.

1.3 Diabetes e Resistência a Insulina (RI)

A DM é uma alteração metabólica que pode ser ocasionada por diversos distúrbios, resultando em hiperglicemia crônica (FUCHS; WANNMACHER, 2010). A hiperglicemia é uma condição na qual o tecido periférico não capta adequadamente a glicose; estabelecendo níveis elevados de glicemia que podem romper a homeostase tecidual ao longo do tempo.

A diabetes pode ser classificada de formas diferentes, de acordo com a sua origem. A *diabetes mellitus* tipo I (DM I), também conhecida como diabetes dependente de insulina, ocorre quando o organismo não é capaz de produzir insulina suficiente para o controle homeostático da glicose. Por muito tempo a causa desse tipo de diabetes foi desconhecida, mas atualmente se acredita que sua origem seja auto imune e que anticorpos destruam as células beta prejudicando a síntese e secreção de insulina (IDF, 2015; MILECH et al., 2016).

A *diabetes mellitus* tipo II (DM II) é a forma mais comum e responde por 90% dos casos diagnosticados. A DM II surge quando há diminuição da capacidade dos órgãos alvo em responder a insulina, quadro que define a resistência à insulina. Os sintomas são semelhantes aos da DM I, porém menos marcantes ou ausentes, o que faz com que o indivíduo possua essa doença por anos sem ser diagnosticado. A DM II é considerada uma doença de causa multifatorial, mas fica claro que a maioria dos casos poderia ser evitada se os portadores possuísem hábitos de vida saudável, já que essa forma de DM está quase sempre relacionada à obesidade visceral a inatividade física (IDF, 2015; MILECH et al., 2016).

Há ainda a diabetes gestacional, uma condição que pode ser temporária ou não, na qual há intolerância a carboidratos e os níveis de glicose estão mais altos do

que o normal, mas ainda não preenche os critérios de diagnósticos de DM. Entretanto, muitas vezes a diabetes gestacional pode representar o aparecimento de DM II durante a gravidez (IDF, 2015; MILECH et al., 2016).

Na pré-diabetes, os níveis de glicose estão alterados, mas também não caracterizam a diabetes, porém, pessoas dentro desse grupo já possuem maior risco de sofrer ataque cardíaco e acidente vascular cerebral (AVC). A pré-diabetes é associada como uma condição intermediária à DM II, e seu diagnóstico é utilizado para sugerir uma mudança nos hábitos de vida do indivíduo (IDF, 2015; MILECH et al., 2016).

A hiperglicemia crônica gera diversos problemas, incluindo aumento do estresse oxidativo e do acúmulo de lipídios intracelulares levando à lipotoxicidade. Esse cenário induz a resistência à insulina e disfunção das células beta, levando à intolerância à glicose e DM II (KOEPPEN; STANTON, 2009).

Os níveis de glicose no sangue são controlados por uma série de hormônios sendo o principal deles a insulina. A insulina é secretada pelas células beta do pâncreas em resposta ao aumento dos níveis de glicose no sangue. Esse hormônio atua nas células dos tecidos adiposo e muscular esquelético promovendo a translocação do GLUT 4, transportador de glicose dependente de insulina, para membrana celular, permitindo assim o influxo de glicose para as células desses tecidos (NELSON, 2011).

Na DM, os níveis de insulina ou a resposta dos tecidos a insulina são insuficientes para manter a glicemia normal. Nesse caso, instalam-se quadros de hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia e intolerância a glicose que caracterizam clinicamente a diabetes (HALL, 2011).

Tanto fatores genéticos quanto ambientais contribuem para patogenia da DM II, que envolvem a secreção insuficiente de insulina, redução da responsividade à insulina nos tecidos, aumento na produção de glicose e anormalidades no metabolismo dos lipídios e das proteínas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Ao longo do tempo a DM pode danificar o coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos, e aumentar o risco de doença cardíaca e AVC. Se não forem fatais, esses danos podem resultar em redução do fluxo sanguíneo, o que combinado ao

dano dos nervos nos pés aumenta a chance de desenvolver úlceras, infecção e eventual necessidade de amputação dos membros (WHO, 2016).

A DM também está intimamente associada ao desenvolvimento de aterogênese e doenças cardiovasculares e cerebrovasculares por provocar dislipidemia. Diabéticos normalmente apresentam hipertrigliceridemia, níveis reduzidos de HDL-C e aumento no número de partículas de LDL. O acúmulo desse tipo de LDL no compartimento plasmático causa agressão ao endotélio com consequente inflamação e desenvolvimento de aterogênese (XAVIER, 2013).

Dados da Sociedade Brasileira de Diabetes estimam que no início do século XXI 5,2% de todos os óbitos do mundo foram atribuídos à DM, tornando essa doença a quinta principal causa de morte. Deve-se considerar que essa porcentagem provavelmente é maior, pois nas declarações de óbito poucos registram DM como causa da morte, sem considerar problemas cardiovasculares e cerebrovasculares como complicações decorrentes da DM (MILECH et al., 2016).

A Federação Internacional de Diabetes afirma que em 2015, 415 milhões de pessoas no mundo possuíam DM (figura 4) e a perspectiva é que em 2040, este número aumente para 642 milhões de pessoas. Atualmente, o Brasil está entre os 10 países com maior número de casos, em quarto lugar com 14,3 milhões de pessoas (IDF, 2015).

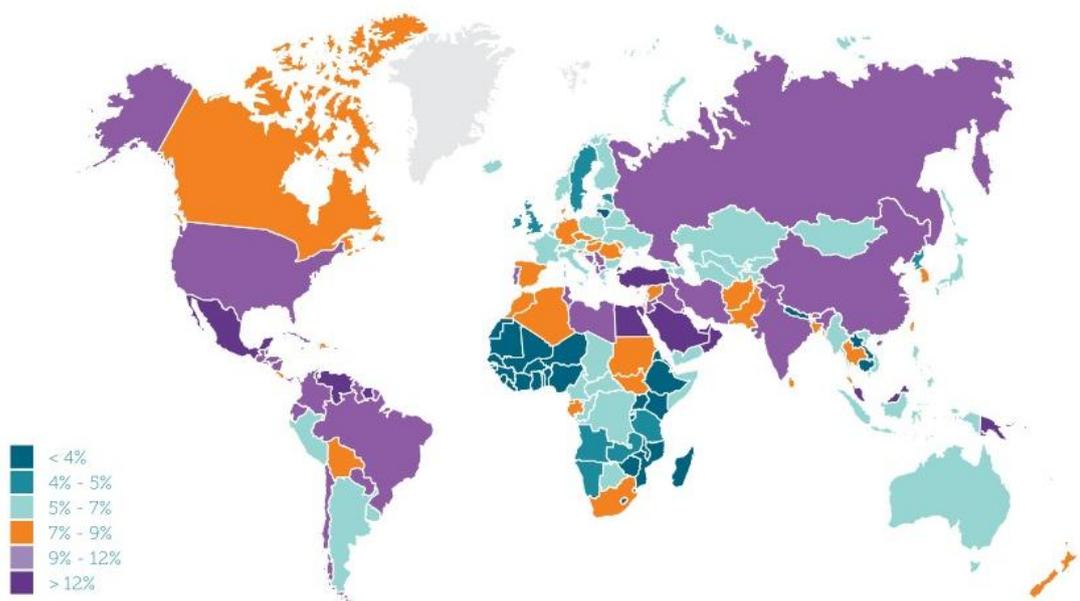


Figura 4 Prevalência de diabetes em adultos (20-79 anos) no mundo em 2015 (Adaptado e IDF, 2015).

Esse crescimento tem causado grande impacto econômico e social no cenário mundial. Os custos estão relacionados ao aumento do uso de serviços de saúde e perda de produtividade, considerando que uma parcela dos óbitos ocorre quando os indivíduos ainda contribuem economicamente para a sociedade (MILECH et al., 2016). Além disso, os gastos com a DM no mundo em 2015 chegaram a 673 bilhões de dólares americanos, cerca de 12% de todo o valor gasto com saúde. No Brasil a soma dos custos diretos e indiretos oscila em torno de 22 bilhões de dólares americanos por ano. Só no Sistema único de Saúde brasileiro (SUS), as despesas relacionadas ao tratamento ambulatorial são de U\$ 2.108,00 por paciente (IDF, 2015; MILECH et al., 2016).

Socialmente, a DM interfere na qualidade de vida dos indivíduos afetados, pode levar à cegueira, insuficiência renal, amputações nos membros inferiores, disfunção ou falha de vários órgãos e tecidos, entre outras doenças (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Os tratamentos visam o controle da hiperglicemia e têm como alvo diferentes processos envolvidos na regulação ou desregulação da glicose (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). No entanto, existe a possibilidade da implementação de intervenções de baixo custo e fácil uso que podem reduzir o gasto econômico da diabetes. Muitas dessas intervenções são viáveis até mesmo para países em desenvolvimento (RAMACHANDRAN et al., 2007).

Assim, quando há a presença de obesidade e diabetes, podemos estar diante de um quadro muito importante indicador de outras doenças, que é a síndrome metabólica.

1.4 Síndrome metabólica

A Síndrome Metabólica (SM) é uma doença multifatorial representada por um grupo de fatores de risco cardiovascular, usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência à insulina. A Síndrome Metabólica ainda carece de uma definição bem estabelecida, mas há uma indicação consensual de que o aumento da pressão arterial, os distúrbios no metabolismo dos glicídios e lipídios e o excesso de peso estão associados ao aumento da morbimortalidade cardiovascular (BRANDÃO et al., 2005).

O *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* determina que o quadro de síndrome metabólica ocorre quando há combinação de pelo menos três dos seguintes fatores: acúmulo de gordura abdominal, dislipidemia aterogênica, caracterizada pelo aumento dos níveis triglicéridos e diminuição dos níveis de HDL no sangue além do aumento da pressão sanguínea e resistência à insulina (NCEP, 2001). A presença de SM está associada a um incremento no risco de morbidade e mortalidade cardiovascular como doença cardíaca coronária, infarto do miocárdio e AVC. O risco dessas morbidades para DC é maior quando associado a esse grupo de fatores do que quando associado aos componentes individuais (ISOMAA et al., 2001).

Embora a patogênese da síndrome metabólica ainda não seja bem compreendida, estilos de vida que prezam pela inatividade física e pelo consumo de dietas ricas em gorduras saturadas, colesterol e carboidratos refinados são as principais causas da obesidade abdominal e desenvolvimentos de resistência à insulina (DEEDWANIA; GUPTA, 2006; KAUR; JASPINDER, 2014).

Estima-se que cerca de um quarto da população mundial possua síndrome metabólica e que o desenvolvimento dessa síndrome aumenta em 3 vezes o risco de ataque cardíaco ou de AVC e em 2 vezes o risco de morrer nesses eventos em relação a pessoas sem síndrome. Portadores dessa síndrome também têm um risco 5 vezes maior de desenvolver DM II (IDF, 2006).

A obesidade está diretamente relacionada com a SM, pois o tecido adiposo não é apenas uma reserva de gordura, mas também é um órgão endócrino responsável pela secreção de metabólitos conhecidos como adipocinas como a leptina, adiponectina, interleucinas, mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), inibidor do ativador do plasminogênio I (PAI-I), entre outros (KERSHAW; FLIER, 2004; KAUR; JASPINDER, 2014; SIRTORI et al., 2017). Essas adipocinas integram sinais endócrinos, Parácrinos e autócrinos que regulam a sensibilidade à insulina, o estresse oxidativo, o metabolismo energético, a coagulação sanguínea e respostas inflamatórias, de forma a acelerar o desenvolvimento de aterosclerose e aterotrombose (figura 5) (KAUR; JASPINDER, 2014).

O excesso de tecido adiposo abdominal libera grandes quantidades de ácidos graxos livres que chegam ao fígado via sistema porta e podem contribuir para o

acúmulo de gordura no fígado. Além disso, os altos níveis de ácidos graxos podem atuar sobre o músculo esquelético inibindo a captação de glicose mediada por insulina e causando resistência à insulina (figura 5). No pâncreas, a exposição crônica a esses ácidos graxos leva à perda da função das células β produtoras de insulina (ABBASI et al., 2002; KAUR; JASPINDER, 2014; SIRTORI et al., 2017).

Dessa forma, algumas adipocinas regulam a sensibilidade à insulina direta ou indiretamente, pela modulação da sinalização de insulina e das moléculas envolvidas no metabolismo de carboidratos e lipídios (KERSHAW; FLIER, 2004).

Desequilíbrios em algumas ações da insulina juntamente com a resistência a outras ações da insulina resultam nas manifestações clínicas da síndrome metabólica. No entanto, os indivíduos que possuem resistência à insulina não são necessariamente obesos, embora geralmente possuam um padrão de distribuição de gordura anormal (KAUR; JASPINDER, 2014).

Verifica-se, portanto, que a síndrome metabólica tem como principal fator de desenvolvimento a obesidade e pode levar a resistência à insulina e DM II. Tanto os quadros de obesidade quanto de diabetes podem ter como desfecho o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Em vista disso, torna-se necessário compreender essas patologias e suas disfunções na intenção de buscar intervenções que mudem esses quadros e levem a uma melhora da qualidade de vida dos indivíduos acometidos, diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

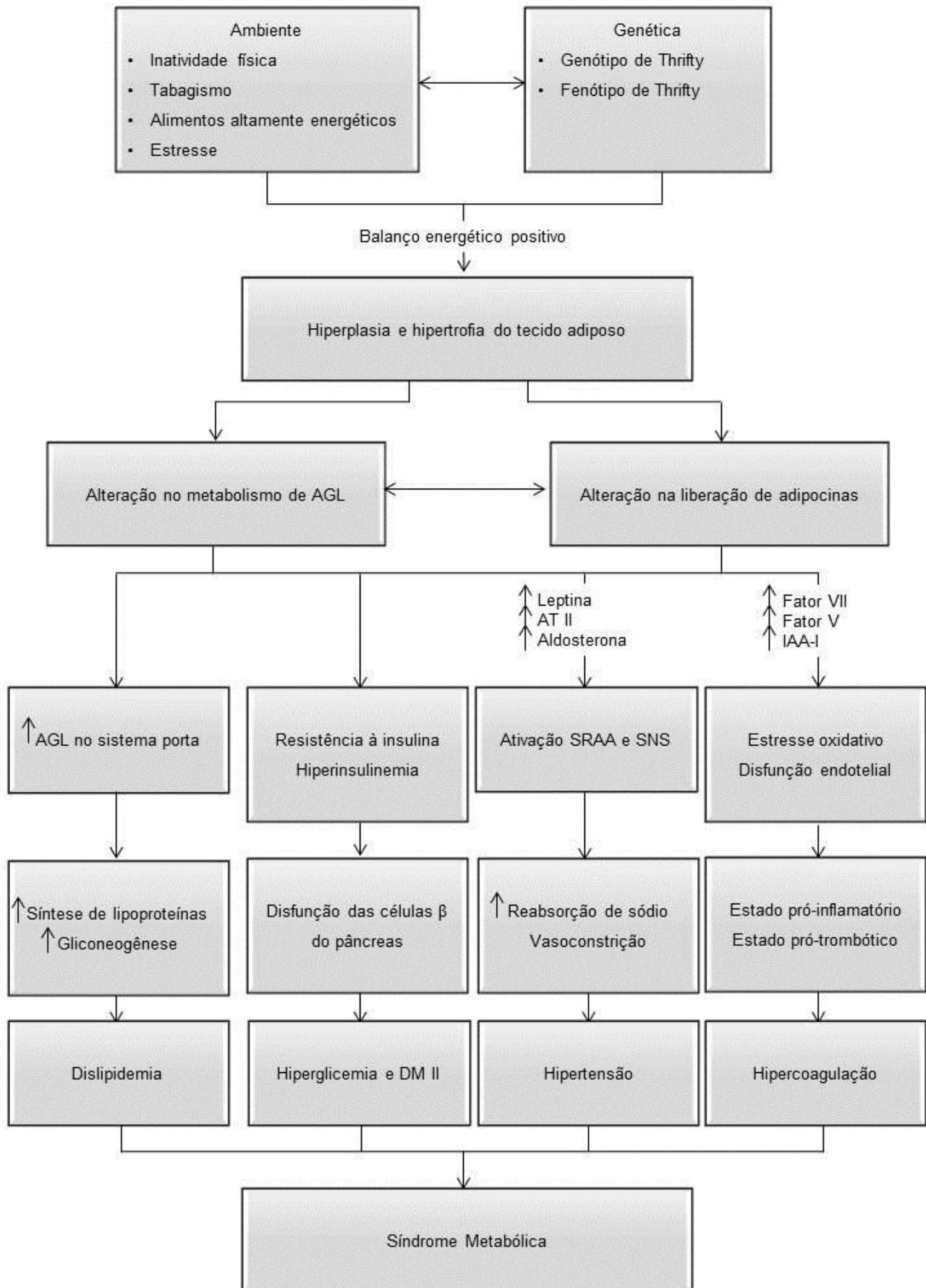


Figura 5 Apresentação esquemática da Síndrome Metabólica com destaque para os efeitos do aumento do tecido adiposo. (AGL: ácidos graxos livres; AT II: angiotensina II; IAA-I: inibidor do ativador do angiotensinogênio I; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: sistema nervoso simpático) (Adaptado de Kaur e Jaspinder, 2014).

1.5 Aterosclerose x Obesidade e Diabetes

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Nessa doença, lesões de gordura chamadas placas aterotomatosas se desenvolvem na superfície das paredes arteriais (KOEPPEN; STANTON, 2009).

Um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de aterosclerose é o aumento dos níveis de LDL plasmáticos. Como visto antes, a LDL é relativamente densa e pequena, sendo capaz de se fixar em pequenos danos endoteliais na íntima dos vasos sanguíneos. Nesse ambiente, a LDL é oxidada e causa estresse celular, reduzindo a viabilidade das células endoteliais e diminuindo sua produção de óxido nítrico, composto importante por seus efeitos vasodilatadores e ateroprotetores que impedem a adesão de macromoléculas, plaquetas e monócitos ao endotélio (KOEPPEN; STANTON, 2009; HALL, 2011).

O desenvolvimento da placa aterosclerótica inicia quando um dos componentes oxidados da LDL, a apo B 100, liga-se a receptores *scavenger* nos macrófagos que endocitam a LDL. Os macrófagos podem se tornar inflados com a LDL oxidada e tornarem-se células espumosas preenchidas por colesterol. As células espumosas se proliferam e morrem liberando grandes quantidades de colesterol dentro da íntima, construindo a placa aterosclerótica. Essas placas podem se tornar tão grandes que acabam se projetando no lúmen das artérias, reduzindo o fluxo de sangue ou obstruindo o vaso. (HALL, 2011).

A LDL oxidada ainda causa uma reação inflamatória que induz o movimento de células imunológicas para dentro da íntima, liberação de citocinas e quimioatrativos e proliferação e migração das células do músculo liso vascular para dentro da íntima (KOEPPEN; STANTON, 2009). Os fibroblastos da placa depositam quantidades extensas de tecido conjuntivo denso e as artérias tornam-se então rígidas e resistentes. As artérias arteroscleróticas perdem a maior parte da sua distensibilidade e devido às áreas degenerativas em suas paredes, rompem-se facilmente (HALL, 2011).

Estudos mostram que para cada redução de 1 mg/dL na LDL no plasma, ocorre cerca de 2% de redução na mortalidade por doença cardíaca aterosclerótica (HALL, 2011). A aterosclerose é a chave para o desenvolvimento de hipertensão,

pela redução da síntese de óxido nítrico e redução da elasticidade arterial, assim como de doença cardíaca coronariana, pelo bloqueio das artérias coronárias e pela formação da placa. Portanto, medidas preventivas adequadas são valiosas na redução de ataques cardíacos (XAVIER, 2013).

Quando os fatores hipertensão, diabetes e hiperlipidemia estão presentes, o risco de doença coronariana aterosclerótica aumenta por quase 20 vezes. Em muitos pacientes obesos ou acima do peso, esses três fatores de risco ocorrem juntos, aumentando imensamente o risco de aterosclerose, que por sua vez pode levar a ataque cardíaco, AVC e doença renal (HALL, 2011; PARHOFER, 2015).

Na obesidade induzida por dieta, a hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo pode ocorrer sobrecarga do fígado com o alto influxo de ácidos graxos livres pela veia porta hepática (figura 5). Quando a RI está associada à obesidade, esse quadro é ainda maior, já que a RI induz a uma lipólise elevada e liberação de AGLs pelo tecido adiposo. Com a RI estabelecida no quadro de obesidade, o músculo esquelético também perde a capacidade de reduzir de forma eficiente os níveis de carboidrato após uma refeição, assim, o fígado é exposto a uma alta carga de glicose que entra no fígado via GLUT 2, que é independente de insulina e a converte em AGLs e TG.

Diante dessa situação, todo o metabolismo lipídico fica comprometido e instala-se a dislipidemia:

1. O fígado produz mais VLDL para transportar os lipídios ao tecido adiposo;
2. A VLDL é depletada a LDL e seus altos níveis no sangue tornam-se um fator de risco para a aterosclerose;
3. Com a lipólise elevada, altas concentrações de AGLs e TG tornam-se circulantes;
4. Todo esse influxo de glicose, AGLs e TG para o fígado o sobrecarrega e ele passa a armazenar esses lipídios, levando a esteatose hepática.

Na DM a aterosclerose se desenvolve de forma acelerada. Pacientes diabéticos são mais propensos a apresentar doença arterial coronariana e infarto do miocárdio do que indivíduos não diabéticos (KOEPPEN; STANTON, 2009). Isso porque a DM está associada a fatores de risco para DC como obesidade central, RI e dislipidemia.

A diabetes e a RI podem levar ao desenvolvimento de aterogênese por diversas vias. Além do aumento da lipólise pela diminuição da insulina, a RI também pode diminuir os níveis de LPL, responsável por clivar as lipoproteínas no sangue e liberar AGLs e TG para os tecidos (KAUR; JASPINDER, 2014). Quando a LPL não é suficiente para depurar essas moléculas, os lipídios se acumulam na corrente sanguínea. A insulina também atua na degradação de apo B através de vias dependentes de fosfoinosítideo 3-cinase (PI3-K), considerando que na DM essa via é prejudicada, a RI aumenta diretamente a produção de VLDL (KAUR; JASPINDER, 2014). Assim a hipertrigliceridemia na DM decorre de um aumento da produção de VLDL e diminuição da depuração da VLDL, o que se acredita, seja o principal fator de desenvolvimento da dislipidemia na DM.

Embora os níveis absolutos de LDL sejam similares entre diabéticos e indivíduos saudáveis a redução da colesterolemia por meio do tratamento com estatinas em indivíduos portadores de DM II é um elemento crucial na prevenção da doença aterosclerótica. Estudos clínicos têm demonstrado que a redução do LDL nos diabéticos promove benefício similar à redução do LDL em pacientes com doença coronária manifesta. A III Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose já aponta a redução dos níveis de LDL como meta terapêutica para a prevenção de DC em indivíduos diabéticos, uma vez que estes são considerados como de risco equivalente aos portadores da doença aterosclerótica (SANTOS et al., 2001; SPOSITO et al., 2007).

Com base nesses dados, nota-se a importância do controle do metabolismo lipídico na prevenção de aterosclerose e DC em grupos de risco como obesos e diabéticos. O tratamento normalmente baseia-se na tomada de hábitos saudáveis, como a prática de exercícios físicos, dieta com restrição de gorduras e abandono de hábitos como consumo de fumo e álcool. No entanto, esses hábitos são parte de um estilo de vida que não costuma ser modificado imediatamente e por isso o uso de fármacos, suplementos e nutracêuticos se faz necessário.

1.6 Alimentos funcionais e Nutraceuticos

Alimentos funcionais são alimentos que promovem benefícios fisiológicos, aumentando a qualidade de vida e diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Esses benefícios são possíveis devido a vitaminas, macromoléculas e outras substâncias, todos denominados compostos bioativos, presentes nos alimentos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 1978 aproximadamente 80% da população mundial utilizava ervas medicinais como sua principal forma de cuidados a saúde (OMS, 1979), o que indica a necessidade de pesquisas que comprovem as propriedades funcionais dessas plantas.

Muitas pesquisas já foram realizadas na intenção de buscar ingredientes fisiologicamente ativos em plantas que previnam doenças e promovam melhoria na qualidade de vida, porém poucos estudos obtiveram documentação clínica substancial que comprovasse esses benefícios (HASLER, 2002). Muitas vezes os benefícios não são vistos com o aumento do consumo do alimento porque a quantidade das substâncias presentes é insignificante para os efeitos pretendidos.

Isso leva a um problema, pois esse tipo de conhecimento é difundido facilmente para a população em geral, que ao observar que determinado alimento não apresentou o efeito esperado, desacredita a pesquisa e à comunidade científica.

Uma das soluções para amplificar os efeitos dos compostos bioativos é extraí-los para a fabricação de nutraceuticos, abrindo a possibilidade do consumo de doses maiores do que as que seriam ingeridas apenas com o consumo de alimentos.

O termo nutraceutico tem sido geralmente usado para descrever compostos bioativos apresentados de forma farmacêutica como cápsulas e comprimidos, que possuem um potencial considerável como suplementos alimentares e na utilização da prevenção e tratamento de várias doenças. A utilização de nutraceuticos é interessante, porque extratos naturais possuem menor custo de produção em relação a alguns medicamentos e a facilidade de obtenção do seu produto é maior. Além disso, extratos de plantas geralmente são considerados menos tóxicos e apresentam menos efeitos colaterais do que drogas sintéticas (EIDI; EIDI; ESMAEILI, 2006).

Muitos estudos associam extratos de vegetais e fungos a atividade anti-hiperlipídica. Martinello et al. verificaram que o extrato do fruto de *Tamarindus indica*

produziu efeito hipolipidêmico em hamsters hipercolesterolêmicos tratados por 10 semanas (MARTINELLO et al., 2006). Outro estudo tratou ratos diabéticos pelo período de sete semanas com o extrato metanólico dos rizomas de *Tulbaghia violácea* e ao final do tratamento observou efeito antioxidante, antidiabético e hipolipidêmico no modelo (MOODLEY et al., 2015). O extrato do cálice e folhas de *Hibiscus sabdariffa* também produziu efeito antioxidante e anti-hiperlipidêmico em ratos tratados por 30 dias. O efeito anti-hiperlipidêmico não é exclusivo de vegetais, cogumelos como *Pleurotus ferulae* e *Phellinus rimosus* também demonstraram esse efeito em ratos diabéticos e hiper-colesterolêmicos (ALAM; YOON; LEE, 2011; RONY; AJITH; JANARDHANAN, 2015).

Existem drogas sintéticas comercializadas a fim de normalizar o metabolismo lipídico, como estatinas e fibratos, porém essas drogas atuam predominantemente sobre a diminuição de LDL-C ou sobre a diminuição dos triglicerídeos, e não sobre os dois concomitantemente. Além disso, apresentam efeitos colaterais diversos, e o uso das duas drogas em associação ainda é estudado (SPOSITO et al., 2007)

Os fibratos são amplamente utilizados para reduzir os níveis de triglicerídeos, podendo alcançar reduções de até 70%. Porém, esses medicamentos não agem sobre os valores de colesterol, o que é um problema visto que raramente o aumento dos níveis de triglicerídeos ocorre sem ser acompanhado de alterações nos níveis de colesterol (SPOSITO, 2007; XAVIER, 2013).

Atualmente as estatinas são as drogas mais recomendadas para a regulação dos valores de colesterol, embora tenham grande eficácia, podem causar hepatite tóxica, falta de apetite, diarreia e vômitos, além de colestase, que se manifesta através de icterícia e vômitos (SPOSITO, 2007; XAVIER, 2013).

Devido aos diversos efeitos colaterais das drogas utilizadas para reduzir níveis de triglicerídeos e colesterol existe a necessidade de busca de novas substâncias e/ou extratos que apresentem atividade anti-hipertrigliceridêmica e anti-hipercolesterolêmica, mas que ao mesmo tempo não apresentem elevados custos de produção para tornar os tratamentos mais acessíveis, e, contribuir assim, para a melhoria da qualidade de vida das pessoas e animais acometidos por esses distúrbios.

1.7 Macrofungos

Fungos são quase sempre relacionados à decomposição, mas possuem importância também nas áreas médicas e econômicas. Devido a compostos liberados pelo seu metabolismo, são amplamente utilizados na indústria alimentícia, como na fabricação de vinhos e queijos. Um exemplo notável de composto derivado dos fungos aplicado na área médica é a ciclosporina, que suprime reações imunológicas que causam a rejeição de órgãos transplantados sem efeitos colaterais indesejáveis (EVERT; EICHHORN, 2014).

Os cogumelos são macrofungos com distintos corpos de frutificação que podem ser hipógeos ou epígeos, grandes o suficiente para serem vistos a olho nu (CHANG, 2008). Entre esse grupo de organismos, os basidiomicetos têm atraído a atenção por suas baixas taxas de toxicidade e elevada especificidade na ativação do sistema imunológico humano (MASCARO et al., 2014). A classe dos basidiomicetos inclui cogumelos comestíveis e venenosos, fungos coraloides, dentiformes e orelhas-de-pau (EVERT; EICHHORN, 2014).

O consumo de macrofungos é associado a uma melhora na saúde e nas últimas décadas pesquisas comprovaram seu papel antitumoral, no fortalecimento do sistema imunológico, atividade profilática contra quimio e radioterapia, atividade antimicrobiana, antioxidante, antiviral, anti-Alzheimer e anti-malária, além do seu potencial antihiperlipidêmico e anti-hipercolesterolêmico (ZJAWIONY, 2004; DE SILVA et al., 2013; GIAVASIS, 2014).

Têm sido utilizados como medicamentos naturais na atividade antidiabética e devido a poucas evidências científicas, muitas pesquisas têm estudado o efeito hipoglicemiante de cogumelos comestíveis (HWANG et al., 2005). Da mesma forma, muitas espécies de basidiomicetos tem sido associadas a atividade anti-hiperlipídica no organismo, regulando o metabolismo lipídico em ratos e camundongos hipercolesterolêmicos e diabéticos (ANANDHI et al., 2013; DE MIRANDA et al., 2014; ZHENG et al., 2014; RONY; AJITH; JANARDHANAN, 2015).

Os benefícios terapêuticos são principalmente devidos a um grande número de compostos bioativos, entre eles, compostos de alto peso molecular como polissacarídeos, proteínas e lipídeos e também de baixo peso molecular, como terpenos, alcaloides e metabólitos derivados de peptídeos não ribossomais (DE SILVA et al., 2013).

A produção de alimentos saudáveis, a fabricação de nutracêuticos e a biorremediação são os principais objetivos do cultivo de macrofungos (CHANG, 2008). Ecologicamente, os macrofungos produzem enzimas fenol oxidases importantes na área da biorremediação, pois degradam compostos aromáticos presentes nos resíduos industriais (CAMASSOLA et al., 2013).

Nutricionalmente, são ricos em proteínas, aminoácidos essenciais e fibras, possuem pouca gordura e diversas vitaminas (REIS et al., 2012). Devido a todas essas propriedades, o desenvolvimento de nutracêuticos na forma de cápsulas, comprimidos ou pó é feita a partir da biomassa seca do micélio ou corpo de frutificação, ou mesmo do extrato.

1.7.1 *Pycnoporus sanguineus*

O gênero *Pycnoporus* pertence ao filo Basidiomycota, ordem Polyporales e família Polyporaceae. Esse gênero é dividido em quatro espécies com diferentes origens geográficas sendo que *P. sanguineus* é encontrado em regiões tropicais e subtropicais (LEVASSEUR et al., 2014). Todos são caracterizados por produzir pigmentos vermelho-alaranjados do tipo 2-amino-fenoxazinona, como cinabarina, ácido cinabarínico e tramesanguina (figura 6) (EGGERT, 1997; DIAS; URBAN, 2009; DENTZ et al., 2017).

P. sanguineus é conhecido popularmente como orelha-de-pau sendo encontrado na madeira, onde se fixa e se alimenta. É capaz de hidrolisar polissacarídeos da parede celular e também a lignina de materiais celulósicos (GARCIA, 2006).

Embora esse cogumelo não seja considerado comestível, tem sido utilizado há muito tempo na medicina popular por tribos indígenas em países africanos e sul-americanos por sua atividade antibacteriana e antiviral (SMÂNIA et al., 2003). Ainda assim, estudos com este gênero, e principalmente sobre o seu potencial nutracêutico são escassos e apesar de um número ainda limitado de publicações envolvendo esse fungo, há uma tendência crescente de seu emprego apenas em processos biotecnológicos (GARCIA, 2006).

Muitos dos estudos mais recentes são sobre o potencial de aplicação de *Pycnoporus* sp. na deslignificação dentro da indústria de alimentos, papel, corantes e na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (CAMARERO et al.,

2012). Entre esses estudos a espécie *P. cinnabarinus* mostrou-se eficiente na remoção de compostos lipofílicos no processo de produção de papel e celulose (MOLINA et al., 2008).

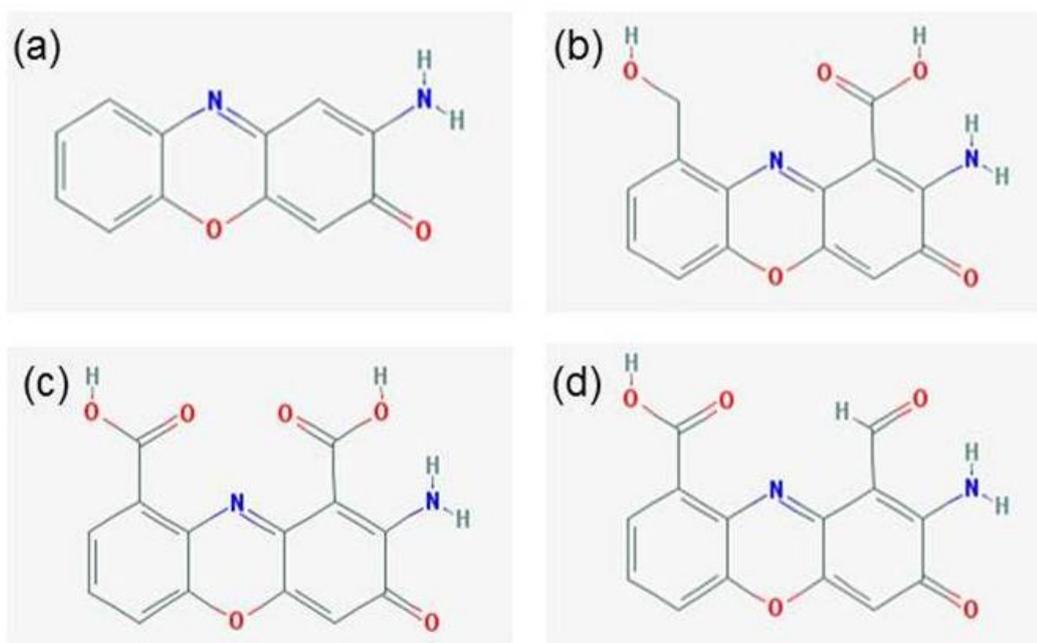


Figura 6 Estrutura da fenoxazinona (a) e seus derivados cinabarina (b), ácido cinabarinico (c) e tramesanguina (d). Fonte: PubChem Compound.

Na área da biorremediação, já foi comprovado o potencial do uso de enzimas oxidativas de *P. sanguineus* na remoção de hormônios sexuais sintéticos de água e esgotos, como Etililestradiol, Gestodeno e Acetato de Ciproterona (MORAIS, 2012). As enzimas lacases deste mesmo fungo que se mostraram eficientes no tratamento de águas residuais e na degradação de desreguladores endócrinos (RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014).

Outro estudo utilizou o extrato hidroalcoólico *P. sanguineus* para inibir o crescimento de *Fusarium* sp, fungo conhecido por causar doenças em culturas de plantas, e o resultado foi uma inibição de mais de 92% da esporulação dos conídios (FIGUEIREDO; SILVA, 2014).

Sobre sua aplicação na saúde, uma pesquisa mostrou atividade antioxidante satisfatória de *P. sanguineus* e sugeriu seu uso como uma fonte natural de compostos antioxidantes (BORDERES et al., 2011). Gambato et al. também observaram atividade antioxidante *in vitro* a partir do extrato de *P. sanguineus*

crescido em condições controladas, verificando variação dessa atividade em função do meio de cultivo (GAMBATO et al., 2016).

Em 2017, o documento patentário BR1020170229440 atribuiu ao extrato de *P. sanguineus* efeito anti-hiperlipídico em ratos diabéticos tratados por 30 dias. O tratamento promoveu diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol não HDL a valores considerados normais. O efeito foi atribuído à molécula cinabarina, composto que constituiu quase que integralmente o extrato (DENTZ et al., 2017).

A cinabarina (figura 6b) é uma molécula que possui ainda hoje função biológica altamente desconhecida. Possui peso molecular 286,243 g/mol e fórmula molecular $C_{14}H_{10}N_2O_5$, sendo uma molécula orgânica do tipo alcaloide. Um estudo avaliou a toxicidade da cinabarina em ratos e observou que a maior concentração utilizada (1000 mg/Kg) não foi suficiente para matar os animais ou causar danos morfológicos no fígado e rins (SMÂNIA et al., 2003).

Embora pouco se conheça sobre os efeitos da cinabarina, sabe-se que outras moléculas da mesma família como o ácido cinabarínico e a fenoxazinona podem atuar no sistema nervoso ativando receptores metabotrópicos de glutamato, no fortalecimento do sistema imunológico estimulando a produção de linfócitos, além de possuírem atividade neuroprotetora, antibacteriana e antioxidante (EGGERT, 1997; FAZIO et al., 2012, 2014; LOWE et al., 2014; POLAK et al., 2016). O ácido cinabarínico endógeno, gerado pelo metabolismo do triptofano, também pode exercer efeitos hepatoprotetores através da ativação do receptor de hidrocarboneto aril, promovendo a expressão de staniocalcina 2 (LOWE et al., 2014; JOSHI et al., 2015). Contudo, ainda não existem estudos que investiguem os efeitos da cinabarina no metabolismo intermediário.

Após essa análise referencial, verifica-se que a espécie *Pycnoporus sanguineus* já foi pesquisada em alguma das três áreas de aplicação dos macrofungos. Fica claro que este é comumente estudado para utilização em processos biotecnológicos, entretanto, os estudos que avaliam a seu potencial para o emprego como fonte de moléculas funcionais ativas são bastante escassos, porém já se sabe que seu extrato atua sobre o metabolismo lipídico.

Dessa forma, o macrofungo *Pycnoporus sanguineus* isolado da região da mata atlântica gaúcha é uma potencial fonte de estudo, visto que são necessárias

mais pesquisas para compreender suas atividades biológicas sobre o metabolismo intermediário.

Fica claro, portanto, que a obesidade e a DM são distúrbios que além de afetarem a qualidade de vida dos indivíduos por si só, também desencadeiam uma série de anormalidades que culminam no desenvolvimento de DC, tornando-se um problema ainda maior. A prospecção por compostos bioativos em extratos naturais é uma alternativa na busca por uma melhora da saúde dos indivíduos acometidos por essas doenças. Esses compostos podem atuar por diferentes vias, muitas vezes envolvendo mais de um mecanismo de ação, podendo dessa forma exercer efeitos diferentes dos medicamentos já utilizados para fins de controle lipídico nesses distúrbios. O extrato de *P. sanguineus* já demonstrou efeito no perfil lipídico de ratos diabéticos e estudos que investiguem as vias de atuação desse extrato são necessários para compreender seu mecanismo de ação.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

O extrato de *P. sanguineus* atua sobre o metabolismo lipídico de ratos diabéticos e dislipidêmicos alterando vias de síntese e degradação no fígado e tecido adiposo.

2.2 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi avaliar a atividade anti-hiperlipídica do extrato de *P. sanguineus* em ratos diabéticos e dislipidêmicos, buscando identificar as possíveis vias metabólicas de atuação, visando o fornecimento de dados para o desenvolvimento de nutracêuticos.

2.3 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* associado à *diabetes mellitus* sobre parâmetros metabólicos de ratos Wistar.
- II. Avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* associado à dislipidemia induzida por dieta sobre parâmetros metabólicos de ratos Wistar.
- III. Avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre os parâmetros sorológicos indicadores do metabolismo sistêmico de carboidratos e lipídios e de toxicidade hepática em ratos saudáveis, diabéticos e dislipidêmicos.
- IV. Avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre metabolismo hepático.
- V. Avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre o metabolismo do tecido adiposo.
- VI. Avaliar o efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre o metabolismo muscular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e realização dos experimentos

As técnicas descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) e Laboratório de Análise de Alimentos e Antioxidantes Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul.

Todos os procedimentos desse estudo estão de acordo com a Lei Arouca (Lei n. 11.794, 2008) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pela Sociedade Brasileira de Animais de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UFRGS e está registrado no sistema dessa universidade sob o **número 31195**. Os responsáveis pelo manuseio dos animais passaram por treinamento prévio e possuem experiência com o protocolo experimental e a com a prática de eutanásia.

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) concedeu autorização de acesso ao componente do patrimônio genético das amostras. A autorização está registrada sob o processo de número 02001.007656/2012-11.

Os experimentos realizados nessa Dissertação serão apresentados como experimento 1 referente aos animais induzidos a DM, e experimento 2 referente aos animais induzidos a dislipidemia por dieta hiperlipídica. Em ambos os experimentos foi avaliado o potencial efeito anti-hiperlipídico do extrato de *P. Sanguineus*.

3.2 Animais

Foram utilizados nesse estudo 58 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus*), machos com 60 dias de vida no início do tratamento, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em biotério setorial, acomodados em caixas padrão de tamanho 340 mm x 410 mm x 200 mm, totalizando 110 cm² de piso e separados em grupos de dois a quatro animais por

caixa, com livre acesso à alimentação e à água, em ambiente com temperatura controlada entre $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas.

3.3 Obtenção do extrato

3.3.1 Coleta e identificação da amostra

A estirpe de fungo utilizada nesse trabalho foi a espécie *Pycnoporus sanguineus*, linhagem 14G. A cepa foi coletada na cidade de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil. O micélio foi isolado e está armazenado no Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul. A exsiccata do macrofungo coletado após isolamento em meio artificial está depositado no Herbário da Universidade de Caxias do Sul, na micoteca da mesma (HUCS/MIUCS).

3.3.2 Cultivo do cogumelo

As condições adotadas para o cultivo de *Pycnoporus sanguineus* foram seguidas conforme descrito por Gambato *et al* (GAMBATO *et al.*, 2016) e Camassola *et al* (CAMASSOLA *et al.*, 2013).

Primeiramente, o micélio do cogumelo foi cultivado em placa de Petri com meio de cultivo contendo 2% serragem de *Pinus* moída, 2% farelo de trigo moído, 0,2% carbonato de cálcio e 2% ágar. O micélio foi mantido em estufa pelo período de 7 dias a 24°C . Após esse período os discos colonizados foram transferidos para sacos de propileno com novo meio de cultivo contendo 94% serragem de *Pinus* moída, 5% farelo de trigo moído, 1% carbonato de cálcio e 66% água.

Os sacos permaneceram fechados pelo período de 4 semanas em ambiente escuro a 24°C para a propagação do micélio. Após foram perfurados e colocados em estufa a 20°C e umidade relativa 80-90% para o crescimento dos basidiomas. A colheita do macrofungo ocorreu diariamente assim que os basidiomas começaram a se formar.

3.3.3 Produção do extrato

Após a colheita, os basidiomas de *P. sanguineus* foram secos em estufa e macerados em um processador. Foram então acrescidos 400 mL de etanol 70°G a

100 g do macrofungo moído e esta mistura foi fervida em destilador a 90°C durante 30 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro e a fração líquida foi armazenada para utilização posterior. Ao sólido resultante foram adicionados 400 mL de água destilada e a mistura foi novamente fervida em destilador a 100°C durante 60 minutos e em seguida filtrada em papel filtro. Foi então preparada uma mistura com quantidades proporcionais de cada fração líquida obtida. Esta mistura foi liofilizada e armazenada a -80°C até o momento da utilização, quando foi dissolvida em água na dose definida.

3.4 Análise do extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massa (CLAE-EM)

As quantidades relativas de cinabarina e ácido cinabarínico do extrato foram mensuradas através de adaptações na metodologia proposta por Dias e Urban, 2009 (DIAS; URBAN, 2009).

Antes da análise, o extrato foi dissolvido em CH₃CN:H₂O (50:50, v/v) e filtrado em membrana PTFE de 0,22 µm. Os compostos foram separados em uma coluna de fase reversa C18 (4 µm, 250 mm x 4,6 mm) utilizando como fase móvel um gradiente de CH₃CN:H₂O (0-2 min 10% CH₃CN:H₂O; 14-24 min 75% CH₃CN:H₂O; 26-30 min 100% CH₃CN:H₂O e 32-40 min 10% CH₃CN:H₂O). O fluxo da fase móvel foi de 0,9 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada para 29 °C. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados a 450 nm. Após a saída do detector DAD um divisor de fluxo permitiu a entrada de 0,45 mL/min no EM. Os espectros de massas foram adquiridos com um *scan range* de m/z 100 a 800. Os parâmetros do MS foram os seguintes: fonte ESI no modo de ionização positivo; voltagem do capilar: 3000 V, temperatura do gás de secagem (N₂): 310° C, fluxo: 8 L/min, nebulizador: 4 bar; fragmentação no modo automático.

3.5 Tratamento com o extrato de *P. sanguineus*

Para o tratamento, o extrato de *P. sanguineus* foi diluído em água e fornecido aos animais por gavagem na dose de 10 mg/Kg/dia durante 33 dias, sempre no período da manhã, os animais controle também passaram pelo processo de gavagem durante esse período, recebendo apenas água. A dose utilizada foi

determinada a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* (DENTZ et al., 2017). Para que a dose adotada fosse mantida durante todo o tratamento, o peso dos ratos foi monitorado semanalmente e os cálculos de preparação das soluções foram refeitos com base no ganho ou perda de peso dos animais.

Após o período de tratamento os animais foram pesados e eutanasiados por decapitação com guilhotina específica para pequenos animais, no estado alimentado, em ambiente silencioso e longe de outros animais, e em seguida, os animais foram dissecados e a coleta dos tecidos foi realizada.

3.6 Experimento 1: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de *P. sanguineus* em ratos diabéticos

3.6.1 Desenho experimental

Neste experimento, os animais foram divididos em saudáveis e diabéticos, tratados ou não com o extrato de *P. sanguineus*, formando quatro grupos como indicado na figura 7: a) grupo controle tratado com água (CTR H₂O), b) grupo controle tratado com *P. sanguineus* (CTR Pyc), c) grupo diabético tratado com água (DBT H₂O) e d) grupo diabético tratado com *P. sanguineus* (DBT Pyc)

Após a indução a diabetes, a efetividade do modelo foi verificada e iniciou-se o tratamento que teve duração de 33 dias até a data da eutanásia e coleta dos tecidos (figura 8).

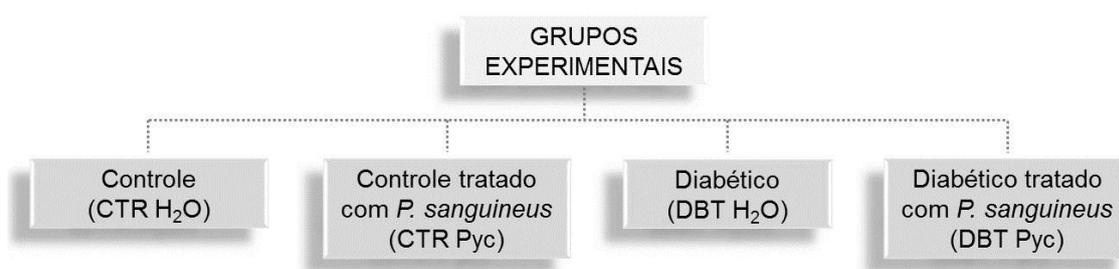


Figura 7 Grupos experimentais do experimento 1.

3.6.2 Indução a diabetes

Após o período de aclimação, a diabetes foi induzida por uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ – Sigma) na dose de 65 mg/kg (TAKEUCHI et al., 1994; RADENKOVIĆ et al., 2016) diluída em 1 mL de tampão citrato. Os grupos não diabéticos também receberam injeção intraperitoneal com o mesmo volume de tampão citrato. Foram considerados diabéticos aqueles animais que

apresentaram concentração de glicose plasmática superior a 250 mg/dL três dias após a injeção de STZ (PACKER, 2000).

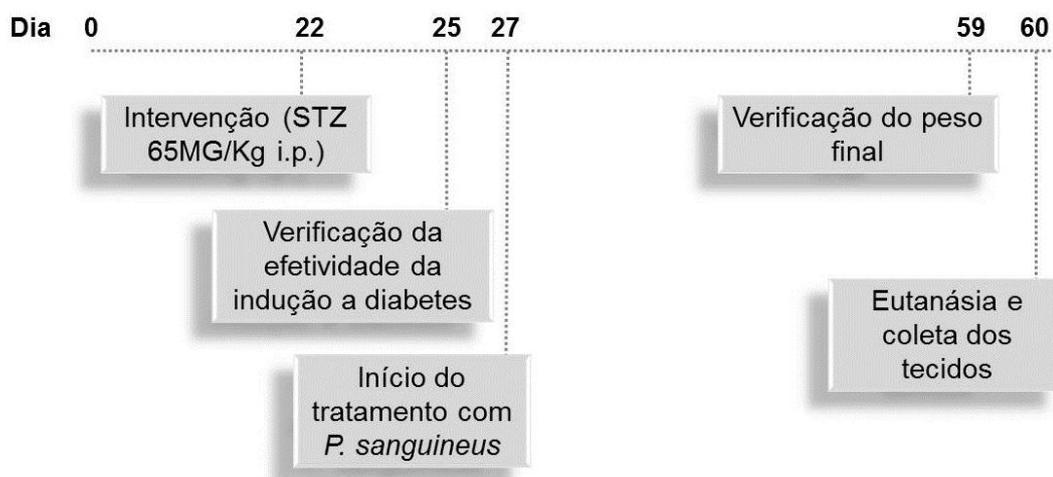


Figura 8 Desenho experimental do experimento 1.

3.6.3 Processamento dos tecidos

O sangue troncular dos ratos foi coletado para a realização de dosagens séricas de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose, ureia, creatinina, AST e ALT.

Os animais também foram dissecados e o fígado, tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo epididimal foram coletados para morfometria e realização de análises metabólicas e bioquímicas descritas na figura 9. Optou-se por não analisar a lipólise no tecido adiposo desses animais, pois o modelo de diabetes induzido por estreptozotocina é naturalmente lipolítico.

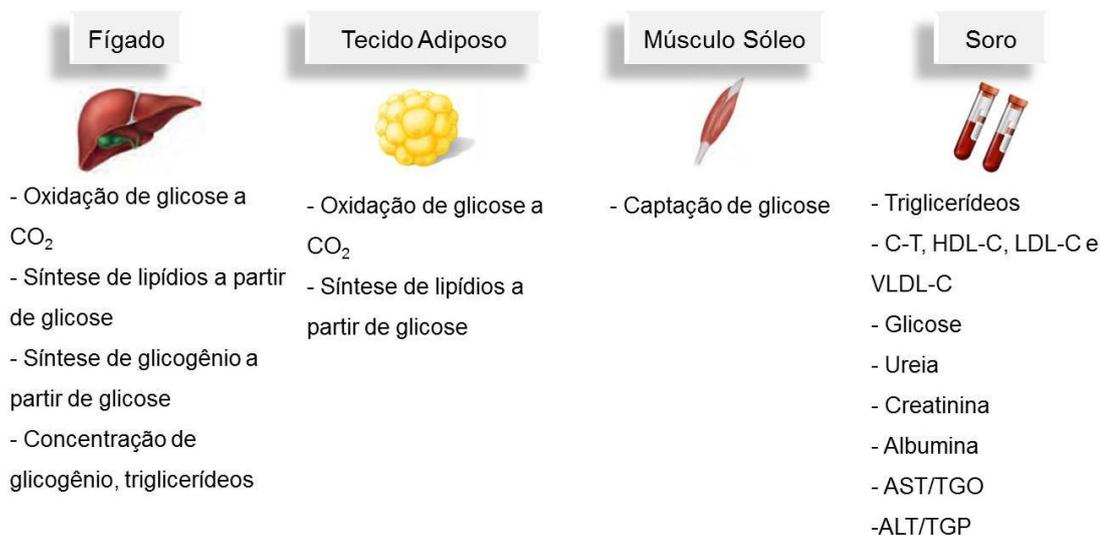


Figura 9 Dosagens metabólicas e bioquímicas realizadas no experimento 1.

3.7 Experimento 2: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de *P. sanguineus* em ratos dislipidêmicos

3.7.1 Desenho experimental

Neste experimento os animais foram divididos em saudáveis e dislipidêmicos, tratados ou não com o extrato de *P. sanguineus* formando quatro grupos como indicado na figura 10: a) grupo controle tratado com água (CTR H₂O), b) grupo controle tratado com *P. sanguineus* (CTR Pyc), c) grupo dislipidêmico tratado com água (DIS H₂O) e d) grupo dislipidêmico tratado com *P. sanguineus* (DIS Pyc).

Após a indução a dislipidemia, a efetividade do modelo foi verificada, e assim iniciou-se o tratamento que teve duração de 33 dias até a data da eutanásia e coleta dos tecidos (figura 11).

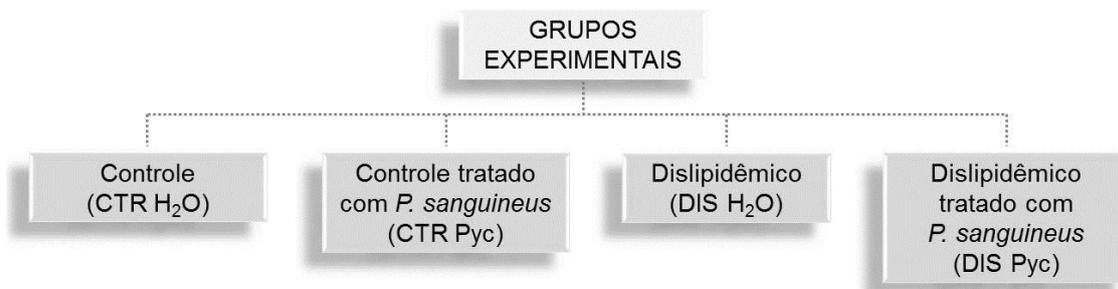


Figura 10 Grupos experimentais do experimento 2.

3.7.2 Indução a dislipidemia

Para este protocolo experimental foram utilizadas duas dietas (tabela 1 e tabela 2). Uma dieta padrão de biotério, industrializada - Nuvilab® com 347,24 cal/100g (65% de carboidratos, 12% de proteína e 5% de gordura) e uma dieta hiperlipídica formulada em nosso laboratório com 508,71 cal/100g (49% carboidrato, 8% de proteína e 31% de lipídios).

Após o período de aclimação os animais dos grupos dislipidêmicos foram submetidos durante 30 dias à dieta hiperlipídica para a indução da dislipidemia. Após esse período foi verificada a efetividade do modelo através da dosagem de colesterol e triglicerídeos plasmáticos e, posteriormente, iniciou-se o tratamento com o extrato de *P. sanguineus*.

A dieta hiperlipídica foi mantida até o final do tratamento e os animais controle receberam ração padrão ao longo de todo o período experimental.

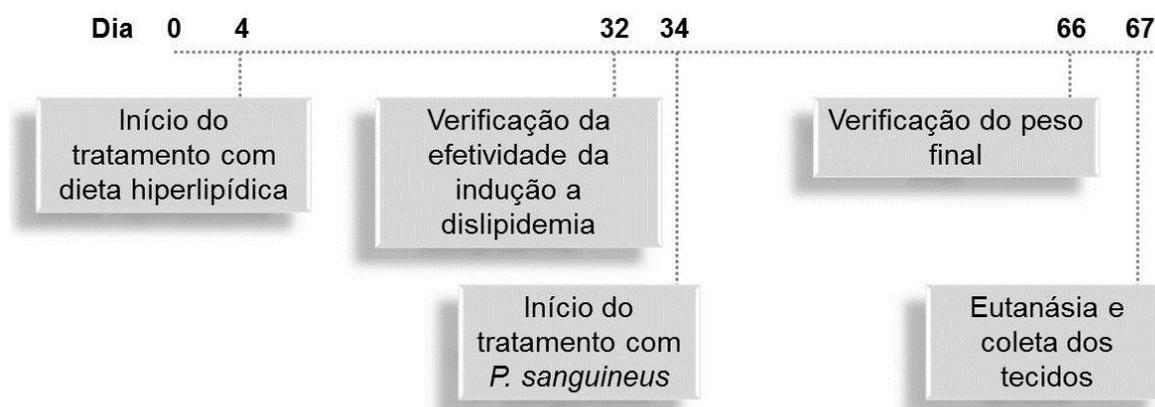


Figura 11 Desenho experimental do experimento 2.

Tabela 1 Composição das dietas utilizadas no protocolo experimental.

Nutrientes	Padrão Nuvilab®		Hiperlipídica artesanal	
	g/100g	cal/100g	g/100g	cal/100g
Proteína	11,75	47	8,18	32,72
Carboidrato	64,98	259,92	49,09	196,36
Lipídio	4,48	40,39	31,07	279,63
Umidade	11,34	-	8,19	-
Cinzas	7,46	-	3,47	-
cal/100g	347,24		508,71	

Tabela 2 Ingredientes utilizados no preparo da dieta hiperlipídica artesanal.

Composição da dieta artesanal (g/100g)	
Ração Nuvilab®	375
Banha de porco	200
Manteiga	50
Margarina hidrogenada	100
Sais	4
CMC	10
Caseína	75
Amido de milho	25
Açúcar	175

3.7.3 Processamento dos tecidos

O sangue troncular dos ratos foi coletado para a realização de dosagens séricas de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose, ureia, creatinina, AST e ALT.

Os animais também foram dissecados e o fígado, tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo epididimal foram coletados para morfometria e realização de análises metabólicas e bioquímicas descritas na figura 12.

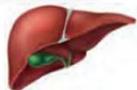
Fígado	Tecido Adiposo	Músculo Sóleo	Soro
			
<ul style="list-style-type: none">- Oxidação de glicose a CO₂- Síntese de lipídios a partir de glicose- Síntese de glicogênio a partir de glicose- Concentração de glicogênio, triglicerídeos	<ul style="list-style-type: none">- Oxidação de glicose a CO₂- Síntese de lipídios a partir de glicose- Lipólise	<ul style="list-style-type: none">- Captação de glicose	<ul style="list-style-type: none">- Triglicerídeos- C-T, HDL-C, LDL-C e VLDL-C- Glicose- Ureia- Creatinina- Albumina- AST/TGO-ALT/TGP

Figura 12 Dosagens metabólicas e bioquímicas realizadas no experimento 2.

3.8 Descrição das técnicas realizadas

3.8.1 Morfometria e relação tecido/peso corporal total

O fígado, tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo epididimal foram retirados, secos em papel filtro e pesados. A relação entre o peso do tecido e o peso corporal total (PCT) foi utilizada para a avaliação do efeito do tratamento sobre a massa dos tecidos e está representada como índice F (fígado/PCT), índice TAR (tecido adiposo retroperitoneal/PCT) e índice TAE (tecido adiposo epididimal/PCT) em mg/g.

3.8.2 Dosagens séricas

O sangue foi coletado em tubo de coleta contendo gel separador e ativador de coágulo (Vacutube®), o qual possibilita a obtenção da amostra de soro com maior qualidade e facilidade de manuseio. O perfil bioquímico dos animais foi então avaliado através da análise das concentrações séricas de colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose, ureia, creatinina e albumina. A análise de hepatotoxicidade foi realizada pela dosagem das enzimas AST e ALT, indicadoras de função hepática. Estes parâmetros foram determinados utilizando kits enzimáticos comerciais (LABTEST Diagnóstica, Brasil), e a leitura espectrofotométrica foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK).

3.8.3 Determinação da concentração de triglicerídeos no fígado

Para a determinação da concentração de triglicerídeos no fígado, amostras do tecido foram homogeneizadas em salina 0,9% na proporção 1:10 e a concentração foi então dosada através de kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica, Brasil) e a leitura espectrofotométrica foi realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK). A quantidade de triglicerídeos no fígado está expressa em mg de triglicerídeos por 100g de tecido (mg%).

3.8.4 Determinação da concentração de glicogênio no fígado

Para a determinação da concentração de glicogênio hepático, amostras do tecido foram adicionadas a tubos de vidro contendo 2 mL de KOH 30% e então fervidas em banho de água quente a 100°C durante 1 hora. Após foram adicionados aos tubos 2 mL de etanol 96°G e 50 µL de Na₂SO₄ 35% para a precipitação do glicogênio. As amostras então foram centrifugadas a 1510 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em água destilada. Para a hidrólise do glicogênio foi acrescido aos tubos 300 µL de HCl 4N e as amostras foram fervidas novamente em banho de água quente a 100°C durante 1 hora. Após foi acrescido as tubos 300 µL de Na₂CO₃ 2M para reestabelecimento do pH e a concentração de glicose das amostras foi determinada através de kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica, Brasil). A quantidade de glicogênio no

fígado está expressa em mg de glicogênio por 100g de tecido (mg%) (VAN HANDEL, 1965).

3.8.5 Oxidação de glicose (produção de $^{14}\text{CO}_2$)

Para determinação da quantidade de [U- ^{14}C]-glicose convertida a $^{14}\text{CO}_2$ amostras de fígado e tecido adiposo retroperitoneal foram fatiadas e incubadas em um agitador metabólico (60 ciclos por minuto) a 37°C por 60 minutos em frascos fechados com tampas de borracha contendo 1 mL de KRB (Krebs-Ringer-Buffer: 118 mM NaCl, 4,61 mM KCl, 2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,19 mM KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,74 mM, NaHCO_3 , 25 mM, pH 7,4), 0,1 μCi [U- ^{14}C] glicose 55mCi/mmol (Amersham, USA) e solução de glicose 5mM. A fase gasosa foi saturada com 5% de CO_2 e 95% de O_2 . A reação ocorreu em pequenos poços dentro dos frascos de vidro contendo tiras de papel Whatman de 3mm colocados acima do nível do meio de incubação. Após a incubação a reação de oxidação foi interrompida com a injeção de 0,25 mL de solução ácido tricloroacético a 50% (v/v) no meio de incubação e 0,25mL de solução NaOH 2N diretamente nos poços através das tampas de borracha dos frascos. Após os frascos foram mantidos durante 24 h a temperatura ambiente a fim de capturar o $^{14}\text{CO}_2$ formado. Após esse período as tiras de papel foram retiradas dos poços e transferidas para outros frascos contendo 2,5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi mensurada utilizando um contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ produzido está expressa em nmol de ^{14}C de glicose incorporada ao CO_2 por g de tecido, por hora (MERSMANN; HU, 1987; TORRES et al., 2001).

3.8.6 Síntese de lipídios a partir de glicose

O tecido que passou pelo protocolo de oxidação foi transferido para tubos de vidro e homogeneizado com 4 mL de clorofórmio-metano (2:1). A extração dos lipídios foi então realizada de acordo com a metodologia descrita por Folch et al. (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957). Ao homogeneizado foram adicionados 5mL de solução salina 0,9% e os tubos foram centrifugados a 1760 xg por 10 minutos. Após a centrifugação a fase superior foi descartada e a inferior contendo as gorduras foi transferida para outros tubos onde permaneceu até completa

evaporação. Após a evaporação as gorduras foram ressuspensas em 2,5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi mensurada utilizando um contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A quantidade de lipídios produzidos a partir de glicose está expressa em nmol de ^{14}C de glicose incorporada a lipídios por g de tecido, por hora.

3.8.7 Síntese de glicogênio a partir de glicose no fígado

As amostras de fígado que passaram pelo protocolo de oxidação foram transferidas para tubos de vidro contendo 1 mL de KOH 30% e então fervidas em banho de água quente a 100°C durante 1 hora. Após foram adicionados aos tubos 1 mL de etanol 96°G e 50 μL de Na_2SO_4 35% para a precipitação do glicogênio. As amostras então foram centrifugadas a 1510 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 0,2 mL de água destilada. A solução foi transferida para outros frascos contendo 2,5 mL de líquido de cintilação e a radioatividade foi mensurada utilizando um contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). A quantidade de glicogênio produzido a partir de glicose está expressa em nmol de ^{14}C de glicose incorporada a glicogênio por g de tecido, por hora (WRENDENBERG et al., 2006).

3.8.8 Análise da lipólise no tecido adiposo retroperitoneal

As amostras de tecido adiposo retroperitoneal foram fatiadas e incubadas em um agitador metabólico (60 ciclos por minuto) a 37°C por 60 minutos em tubos fechados contendo 980 μL de KRB (Krebs-Ringer-Buffer: 118 mM NaCl, 4,61 mM KCl, 2,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,19 mM KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,74 mM, NaHCO_3 , 25 mM, pH 7,4), solução 5 mM de glicose e 1% de albumina de soro bovino. A lipólise foi estimulada adicionando 20 μL de solução de adrenalina em ácido ascórbico ($2,5 \times 10^{-4}\text{M}$) a cada amostra. A fase gasosa foi saturada com 5% de CO_2 e 95% de O_2 . Após o período de incubação a reação foi interrompida colocando os tubos em gelo. As amostras de tecido foram descartadas e o meio de incubação contendo glicerol e ácidos graxos derivados do processo de lipólise foi utilizado para determinação de glicerol. O glicerol foi mensurado utilizando kit comercial enzimático (R-Biopharm®).

Os resultados estão expressos em mmol de glicerol por litro por grama de tecido por hora de incubação (STICH et al., 1997).

3.8.9 Captação de glicose no músculo sóleo

Para determinação da quantidade de 2-deoxi-D-[³H]-glicose-triciada captada amostras de músculo sóleo foram fatiadas e incubadas em um agitador metabólico (60 ciclos por minuto) a 37°C por 60 minutos em tubos fechados contendo 1 mL de KRB (Krebs-Ringer-Buffer: 118 mM NaCl, 4,61 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂*2 H₂O, 1,19 mM KH₂PO₄, MgSO₄*7 H₂O 0,74 mM, NaHCO₃, 25 mM, pH 7,4) e 0,1 µCi 2-deoxi-D-[³H]-glicose-triciada. A fase gasosa foi saturada com 5% de CO₂ e 95% de O₂. Após o período de incubação a reação foi interrompida colocando os tubos em gelo. As amostras de tecido foram adicionadas a tubos de vidro contendo 1mL de água destilada e submetidas a hidrólise celular para liberação da glicose pelas células. A hidrólise foi estimulada congelando as amostras a -20 °C e após fervendo-as em banho de água quente a 100°C durante 25 minutos – esse procedimento foi repetido três vezes. Para a medida da captação de glicose foi feita então a leitura da radioatividade nos meios interno e externo utilizando um contador de cintilação líquida (LKB-Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Os resultados estão expressos pela razão tecido/meio por hora de incubação, conforme Machado, Wassermann e Marques (1991).

3.9 Descarte de resíduos

O descarte de resíduos químicos não tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum. Os demais resíduos como o resto de material biológico e resíduo químico tóxico foi encaminhados ao Centro de Tratamento de Gestão de Resíduos Biológicos ou Químicos da UFRGS para procedimento correto de eliminação. Os resíduos radioativos foram descartados conforme a norma para gerência de rejeitos radioativos de baixo e médio níveis de radiação (Resolução CNEN 167).

3.10 Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado com a utilização do programa Minitab (versão 15) utilizando como base para cálculo os resultados de protocolos

experimentais de nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa levando em consideração o desvio padrão encontrado nos grupos de diferentes experimentos que utilizaram protocolos semelhantes (SILVA et al., 2011; RESENDE et al., 2012).

A avaliação da distribuição normal (gaussiana) foi feita pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, indicado para amostras reduzidas.

Para variáveis com distribuição gaussiana, foi utilizado o teste ANOVA. A ANOVA de duas vias foi utilizada para comparação entre grupos com mais de um fator em avaliação e foi seguida pelo pós-teste de Tukey. Os resultados foram avaliados quanto à fonte de variação (modelo, tratamento e interação modelo-tratamento) e as comparações múltiplas descritas como aumento ou diminuição da média em relação aos demais grupos.

Para variáveis que não apresentaram distribuição normal em mais de um fator em avaliação, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

Em todas as análises foi utilizado o programa GraphPad Prism ® versão 6.01 e estabelecidos a significância e o poder estatístico de 0,05 e 95% respectivamente.

4. RESULTADOS

Os resultados dessa Dissertação serão apresentados como nos materiais e métodos, como experimentos 1 e 2.

4.1 Análise do extrato por CLAE-EM

A análise do extrato por CLAE-EM identificou os compostos ácido cinabaránico (pico 1) e cinabarina (pico 2) (figura 13). A área dos picos foi de 780.230 para ácido cinabaránico e 2.393.779 para cinabarina, indicando uma concentração maior de cinabarina no extrato. Os dados obtidos por espectrometria de massa estão representados na tabela 3.

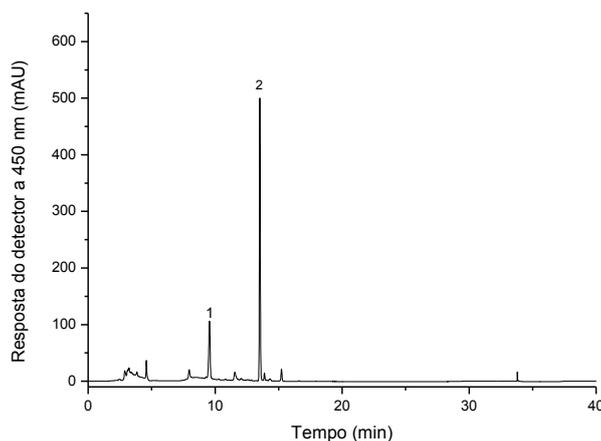


Figura 13 Cromatograma do extrato de *P. sanguineus* apresentando os componentes principais: 1 - ácido cinabaránico e 2 - cinabarina.

Tabela 3 Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos encontrados obtidas por CLAE-DAD-ESI-EM.

Pico ^a	Composto	Área	T _R (min) ^b	λ máx (nm) ^c	[M+H] ⁺	MS ² (+)
1	Metil éster de cinabarina	780230	9,8	429 / 448	301,0376	-
2	Cinabarina	2393779	13,5	428 / 447	287,0558	225,0582 – 269,0478

^a Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na figura 13.

^b Tempo de retenção de uma coluna C18.

^c Solvente: gradiente CH₃CN:H₂O

4.2 Experimento 1: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de *P. sanguineus* em ratos diabéticos

4.2.1 Parâmetros morfométricos

A tabela 4 descreve os parâmetros morfométricos obtidos com base no peso corporal total (PCT) e peso dos tecidos fígado, tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo epididimal coletados imediatamente após a eutanásia. A relação entre o peso dos tecidos e o PCT foi utilizada como um índice que pode indicar o efeito do modelo ou do tratamento sobre variações na massa do tecido.

O PCT foi significativamente menor nos grupos diabéticos em relação aos seus controles, porém não houve efeito do tratamento entre os grupos DBT H₂O e DBT Pyc nesse parâmetro. Houve diferença no PCT entre os grupos controles, sendo que o grupo CTR Pyc apresentou menor PCT em relação ao grupo CTR H₂O.

Quando avaliada a variação de peso ao longo do tratamento, obtida subtraindo-se o peso do animal no dia da eutanásia do seu peso no início do tratamento, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controles. Novamente observa-se a influência do modelo na questão da massa corporal total, sendo que os grupos diabéticos apresentaram ganho de peso significativamente inferior do que os grupos controles. Entre os grupos diabéticos, porém, há diferença na variação de peso, indicando efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* nesse parâmetro, aumentando o ganho de peso em relação ao grupo DBT H₂O.

Os índices F, TAR e TAE apresentaram o modelo como fonte de variação sendo que houve aumento do índice F e diminuição dos índices TAR e TAE nos grupos diabéticos em relação aos seus grupos controles. O tratamento atuou como fonte de variação no índice TAR, aumentando-o em relação ao grupo CTR H₂O.

Tabela 4 Efeito do tratamento com extrato aquoso de *P. sanguineus* sobre parâmetros morfométricos em ratos submetidos ao modelo de diabetes.

Parâmetros	Grupo Experimental				ANOVA
	CTR H ₂ O	CTR Pyc	DBT H ₂ O	DBT Pyc	
PCT(g)	444,78 ± 8,2	404,22 ± 12,39 ^b	281,70 ± 6,84 ^a	309,00 ± 7,77 ^a	M, &
Varição de peso (g)	92,56 ± 6,52	89,33 ± 6,44	9,00 ± 4,85 ^a	34,30 ± 6,5 ^{a,b}	M, T, &
Índice F (mg/g)	34,51 ± 0,87	33,71 ± 0,60	40,00 ± 0,99 ^a	39,72 ± 0,43 ^a	M
Índice TAR (mg/g)	12,98 ± 0,65	17,17 ± 1,52 ^b	1,72 ± 0,035 ^a	3,27 ± 0,49 ^a	M, T
Índice TAE (mg/g)	5,03 ± 0,79	7,04 ± 0,69	2,16 ± 0,26 ^a	1,96 ± 0,19 ^a	M, &

Os dados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey, sendo as fontes de variação representadas por (M^a) efeito do modelo, (T^b) efeito do tratamento, (&) interação entre modelo e tratamento e (NS) variação não significativa. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. São consideradas significativas as diferenças com $P \leq 0,05$. n=9 por grupo experimental. Peso corporal total (PCT) e suas relações entre o peso do fígado (F), tecido adiposo retroperitoneal (TAR) e tecido adiposo epididimal (TAE).

4.2.2 Parâmetros Séricos

Na tabela 5 estão representados os parâmetros séricos dos grupos, indicadores de função metabólica e toxicidade hepática. As diferenças estatísticas restringiram-se ao modelo, que apresentou valores maiores de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), glicose, ureia, AST e ALT e menores de colesterol LDL (LDL-C) e creatinina em relação aos grupos controles. Não houve diferença entre os grupos nas concentrações de colesterol HDL (HDL-C) e albumina.

Nos parâmetros LDL-C, creatinina e ALT, o grupo DBT Pyc não diferiu do seu grupo controle.

Tabela 5 Efeito do tratamento com extrato aquoso de *P. sanguineus* sobre parâmetros séricos em ratos submetidos ao modelo de diabetes.

Parâmetros	Grupo Experimental				ANOVA
	CTR H ₂ O	CTR Pyc	DBT H ₂ O	DBT Pyc	
TG (mg/dL)	71,62 ± 23,10	66,59 ± 11,56	686,59 ± 155,25 ^a	491,47 ± 80,51 ^a	M
CT (mg/dL)	59,78 ± 2,10	59,11 ± 2,52	105,60 ± 12,39 ^a	91,22 ± 4,32 ^a	M
HDL-C (mg/dL)	25,25 (7,37/32,00)	28,50 (17,88/41,50)	17,13 (9,25/21,19)	31,50 (13,13/33,75)	Não
LDL-C (mg/dL)	10,66 ± 0,75	8,76 ± 0,79	7,02 ± 0,59 ^a	7,39 ± 1,15	M
Glicose (mg/dL)	130,44 ± 2,56	140,22 ± 3,91	727,60 ± 40,98 ^a	723,00 ± 49,69 ^a	M
Ureia (mg/dL)	35,70 ± 5,00	42,35 ± 5,14	81,60 ± 5,89 ^a	71,74 ± 2,79 ^a	M
Creatinina (mg/dL)	0,72 (0,68/0,73)	0,68 (0,64/0,69)	0,60 (0,58/0,65) ^a	0,63 (0,61/0,65)	Sim
Albumina (g/dL)	3,33 ± 0,06	3,31 ± 0,03	3,73 ± 0,31	3,42 ± 0,15	NS
AST U/L)	12,87 ± 1,46	17,89 ± 2,09	32,12 ± 5,02 ^a	20,23 ± 2,08	M, &
ALT (U/L)	72,67 ± 2,93	71,67 ± 3,01	96,78 ± 5,18 ^a	87,10 ± 4,72 ^a	M

Os dados paramétricos foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey, sendo as fontes de variação representadas por (M^a) efeito do modelo, (T^b) efeito do tratamento, (&) interação entre modelo e tratamento e (NS) variação não significativa. Os dados não paramétricos foram submetidos à avaliação pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. A diferença entre as medianas foi destacada como presente (sim) ou ausente (não). Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). São consideradas significativas as diferenças com P ≤ 0,05. n=9 por grupo experimental.

4.2.3 Metabolismo Hepático

A avaliação da concentração hepática de triglicerídeos (figura 14 – A) e glicogênio (figura 14 – B) mostrou o modelo como fonte de variação com aumento da concentração de triglicerídeos e diminuição da concentração de glicogênio nos grupos diabéticos. O tratamento não foi identificado como fonte de variação em nenhum desses parâmetros.

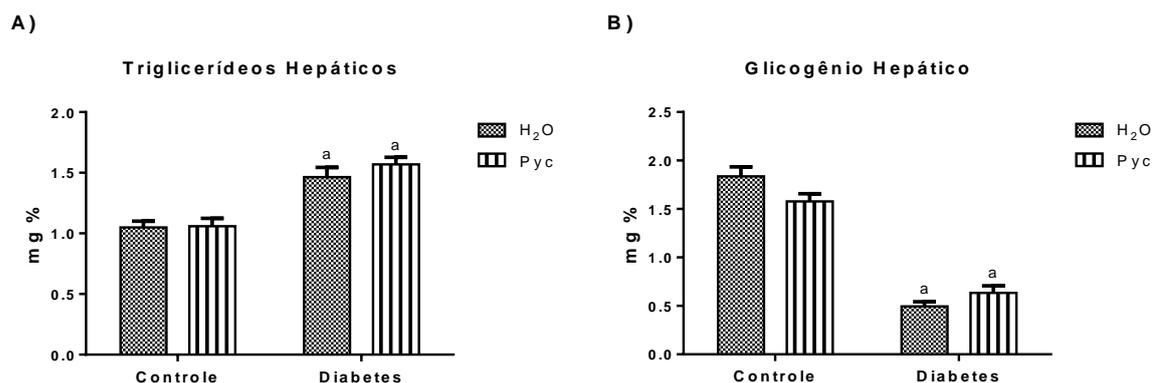


Figura 14 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a concentração hepática de triglicerídeos (A) e glicogênio (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes. Os dados são apresentados como média \pm EPM. $n=9$ por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo ($p \leq 0,05$, Tukey).

Na figura 15, é representada a oxidação hepática de glicose a CO₂. A análise estatística não identificou o modelo ou tratamento como fonte de variação; portanto, não foram observadas diferenças estatísticas.

Na análise da conversão hepática de glicose a glicogênio (figura 16 – A) foi observado diminuição desse parâmetro no grupo DBT Pyc em relação ao seu grupo controle, porém, não foram encontradas variações significativas entre os demais grupos. Também não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na análise de conversão hepática de glicose a lipídios (figura 16 - B).

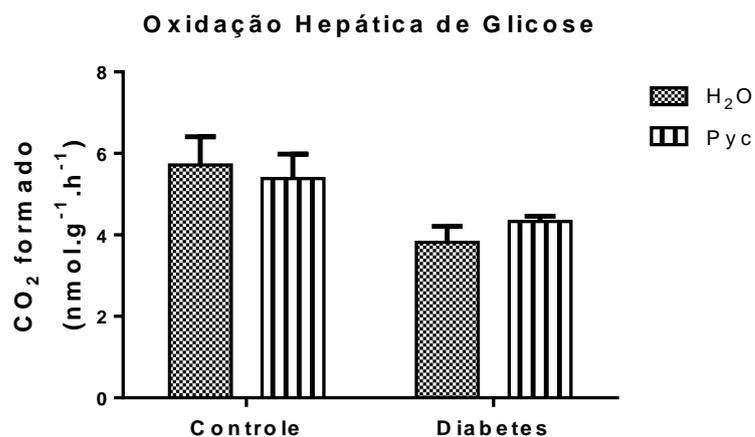


Figura 15 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a oxidação de glicose a CO₂ no fígado em ratos submetidos ao modelo de diabetes. Os dados são apresentados como média ± EPM. n=9 por grupo.

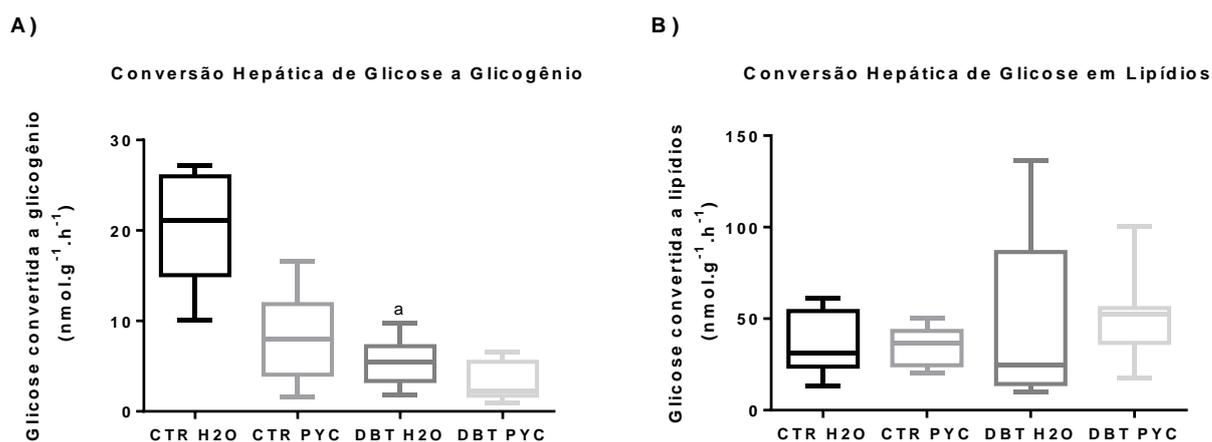


Figura 16 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a conversão hepática de glicose a glicogênio (A) e lipídios (B) em ratos submetidos ao modelo de diabetes. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). n=9 por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo ($p \leq 0,05$, Dunn).

4.2.4 Metabolismo do tecido adiposo retroperitoneal

A oxidação de glicose a CO_2 no tecido adiposo retroperitoneal (TAR) não apresentou diferença estatística em relação ao modelo, mas identificou o tratamento como fonte de variação (figura 17). Nesse parâmetro, o grupo DBT Pyc apresentou valores significativamente elevados em relação ao grupo DBT H_2O .

Foi observado efeito do tratamento também sobre a conversão de glicose a lipídios no TAR (figura 18). Nesse parâmetro, o grupo DBT Pyc apresentou valores superiores tanto em relação ao seu grupo controle quanto ao grupo DBT H_2O . Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controles e entre o grupo DBT H_2O e CTR H_2O .

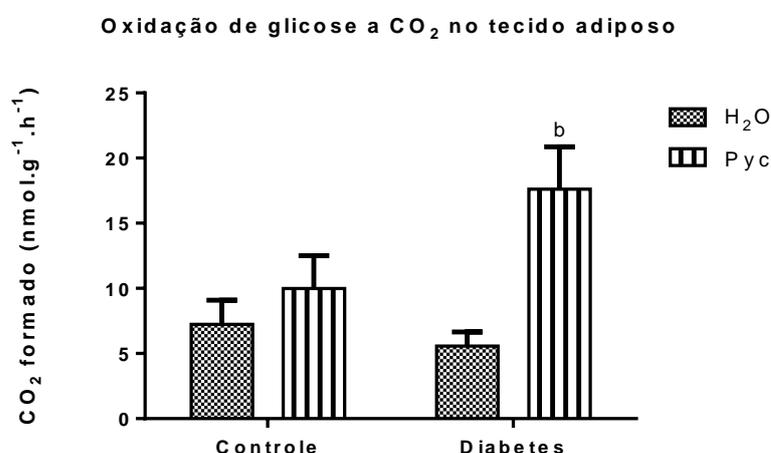


Figura 17 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a oxidação de glicose a CO_2 no tecido adiposo retroperitoneal em ratos submetidos ao modelo de diabetes. Os dados são apresentados como média \pm EPM. $n=9$ por grupo. (b) variação em relação ao grupo CTR Pyc ($p \leq 0,05$, Tukey).

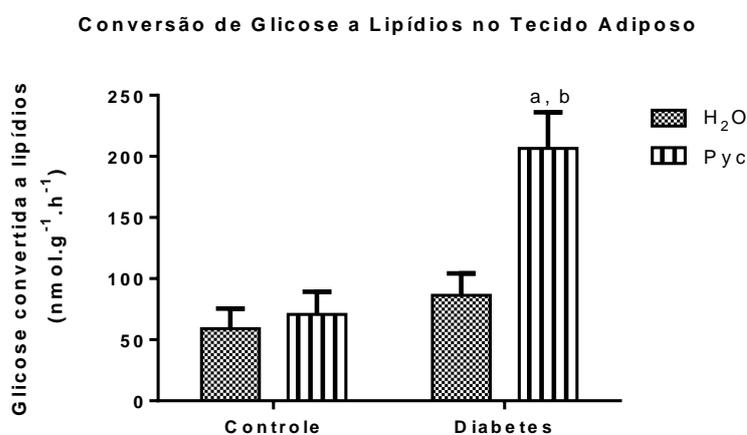


Figura 18 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a conversão hepática de glicose a lipídios em ratos submetidos ao modelo de diabetes. Os dados são apresentados como média \pm EPM. $n=9$ por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo, (b) variação em relação ao grupo CTR Pyc ($p \leq 0,05$, Tukey).

4.2.5 Metabolismo muscular

A captação de glicose no músculo sóleo não foi afetada pelo modelo ou tratamento (figura 19). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nesse parâmetro.

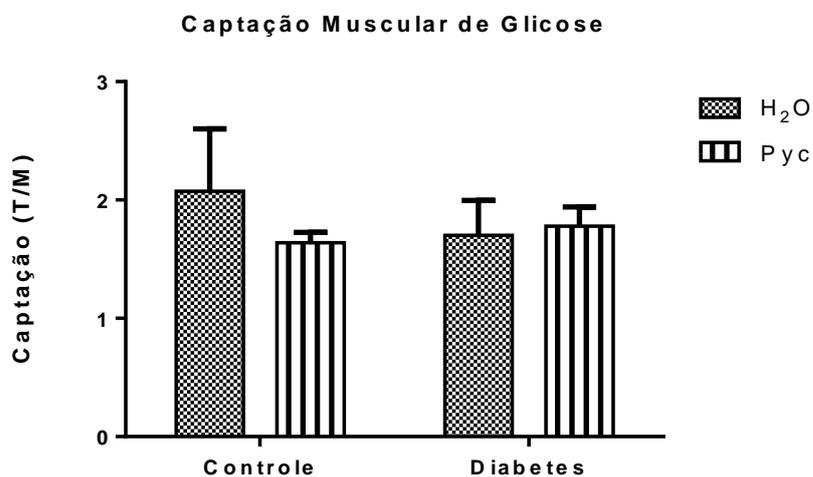


Figura 19 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a captação de glicose no músculo em ratos submetidos ao modelo de diabetes. Os dados são apresentados como média ± EPM. n=9 por grupo.

4.3 Experimento 2: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de *P. sanguineus* em ratos dislipidêmicos

4.3.1 Parâmetros morfométricos

A tabela 6 descreve os parâmetros morfométricos obtidos com base no peso corporal total (PCT) e peso dos tecidos fígado, tecido adiposo retroperitoneal e tecido adiposo epididimal coletados imediatamente após a eutanásia.

O PCT foi significativamente menor apenas no grupo DIS H₂O em relação ao seu controle e não houve diferença estatística na variação de peso entre os grupos. Quanto à relação entre PCT e tecido, o modelo atuou como fonte de variação em todos os índices calculados, sendo que os índices TAR e TAE foram maiores nos grupos dislipidêmicos. No índice F apenas o grupo DIS H₂O apresentou valores estatisticamente diferentes do seu controle, sendo estes inferiores em relação ao grupo CTR H₂O.

Apesar de não ter sido observada diferença estatística na comparação múltipla entre os grupos dislipidêmicos, a ANOVA de duas vias indicou o tratamento como fonte de variação no índice TAE.

Tabela 6 Efeito do tratamento com extrato aquoso de *P. sanguineus* sobre parâmetros morfométricos em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.

Parâmetros	Grupo Experimental				ANOVA
	CTR H ₂ O	CTR Pyc	DIS H ₂ O	DIS Pyc	
PCT (g)	444,78 ± 8,2	404,22 ± 12,39	401,50 ± 8,06 ^a	416,70 ± 13,80	&
Variação de peso (g)	92,56 ± 6,52	89,33 ± 6,44	89,70 ± 12,77	105,10 ± 10,00	NS
Índice F (mg/g)	34,51 ± 0,87	33,71 ± 0,60	32,07 ± 0,53 ^a	32,08 ± 0,55	M
Índice TAR (mg/g)	13,05 (11,48/15,65)	14,72 (14,23/20,61)	31,47 (30,23/36,13) ^a	39,03 (34,88/41,70) ^a	Sim
Índice TAE (mg/g)	5,03 ± 0,79	7,04 ± 0,69	13,38 ± 1,08 ^a	17,69 ± 1,98 ^a	M, T

Os dados paramétricos foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey, sendo as fontes de variação representadas por (M^a) efeito do modelo, (T^b) efeito do tratamento, (&) interação entre modelo e tratamento e (NS) variação não significativa. Os dados não paramétricos foram submetidos à avaliação pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. A diferença entre as medianas foi destacada como presente (sim) ou ausente (não). Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). São consideradas significativas as diferenças com P ≤ 0,05. n=9 por grupo experimental. Peso corporal total (PCT) e suas relações entre o peso do fígado (F), tecido adiposo retroperitoneal (TAR) e tecido adiposo epididimal (TAE).

4.3.2 Parâmetros séricos

Os resultados das dosagens séricas do segundo experimento estão descritos na tabela 7. Não houve diferença estatística entre os grupos nos valores de HDL-C, LDL-C e AST.

O modelo de dislipidemia atuou como fonte de variação aumentando os níveis de TG, CT, glicose e albumina, e diminuindo os níveis de creatinina e AST. Nos parâmetros CT e creatinina, apenas o grupo DIS H₂O diferiu do seu controle.

O tratamento com o extrato de *P. sanguineus* atuou como fonte de variação apenas nos valores de ureia, aumentando-os em relação ao grupo DIS H₂O. Embora a ANOVA de duas vias tenha indicado influência do modelo nesse parâmetro, não houve diferença estatística na comparação entre os grupos.

Tabela 7 Efeito do tratamento com extrato aquoso de *P. sanguineus* sobre parâmetros séricos em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia.

Parâmetros	Grupo Experimental				ANOVA
	CTR H ₂ O	CTR Pyc	DIS H ₂ O	DIS Pyc	
TG (mg/dL)	71,62 ± 23,10	66,59 ± 11,56	221,16 ± 20,04 ^a	251,21 ± 42,63 ^a	M
CT (mg/dL)	59,78 ± 2,10	59,11 ± 2,52	71,00 ± 2,71 ^a	68,10 ± 3,57	M
HDL-C (mg/dL)	25,25 (7,27/32,00)	28,50 (17,88/41,50)	10,50 (2,93/26,00)	25,00 (20,00/29,13)	Não
LDL-C (mg/dL)	10,66 ± 0,75	8,76 ± 0,79	8,84 ± 1,02	10,12 ± 2,03	NS
Glicose (mg/dL)	130,44 ± 2,56	140,22 ± 3,91	174,70 ± 4,38 ^a	187,70 ± 9,02 ^a	M
Ureia (mg/dL)	35,70 ± 5,00	42,35 ± 5,14	39,90 ± 3,02	55,07 ± 2,71 ^b	M, T
Creatinina (mg/dL)	0,72 (0,68/0,73)	0,68 (0,64/0,69)	0,60 (0,58/0,65) ^a	0,63 (0,61/0,65)	Sim
Albumina (g/dL)	3,33 ± 0,06	3,31 ± 0,03	3,90 ± 0,08 ^a	4,14 ± 0,15 ^a	M
AST U/L)	12,87 ± 1,46	17,89 ± 2,09	14,35 ± 1,19	15,54 ± 2,11	NS
ALT (U/L)	72,67 ± 2,93	71,67 ± 3,01	56,11 ± 2,01 ^a	55,30 ± 2,22 ^a	M

Os dados paramétricos foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey, sendo as fontes de variação representadas por (M^a) efeito do modelo, (T^b) efeito do tratamento, (&) interação entre modelo e tratamento e (NS) variação não significativa. Os dados não paramétricos foram submetidos à avaliação pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. A diferença entre as medianas foi destacada como presente (sim) ou ausente (não). Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). São consideradas significativas as diferenças com P ≤ 0,05. n=9 por grupo experimental.

4.3.3 Metabolismo hepático

Na figura 20, estão representadas as concentrações hepáticas de triglicerídeos (A) e glicogênio (B). As concentrações de triglicerídeos hepáticos nos grupos dislipidêmicos foram maiores em relação os grupos controles, apresentando diferença estatística e indicando o modelo como fonte de variação.

Não houve diferença estatística entre os grupos nas concentrações teciduais de glicogênio. O tratamento não foi identificado como fonte de variação em nenhum desses parâmetros.

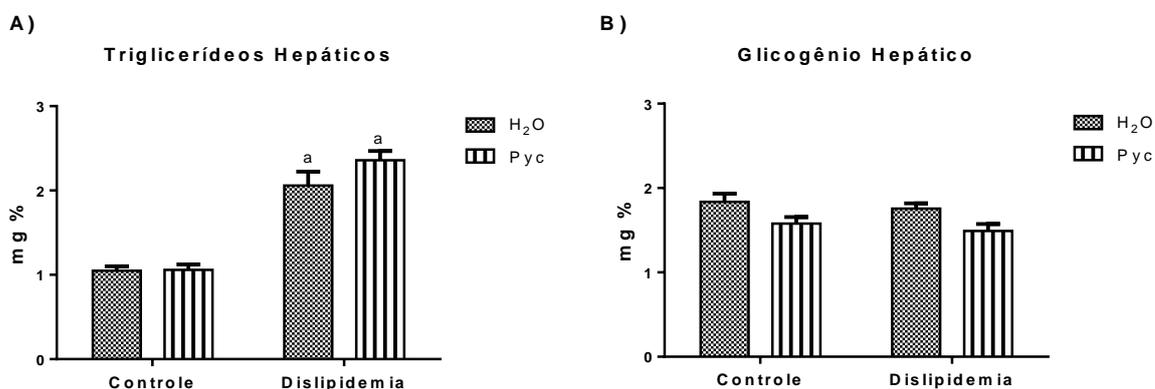


Figura 20 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a concentração hepática de triglicerídeos (A) e glicogênio (B) em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia. Os dados são apresentados como média \pm EPM. n=9 por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo ($p \leq 0,05$, Tukey).

Na figura 21, é representada a oxidação hepática de glicose a CO₂. A análise estatística não identificou o tratamento como fonte de variação desse parâmetro, porém, o modelo provocou variação e a síntese de CO₂ nos grupos dislipidêmicos foi significativamente menor em relação aos grupos controles.

A conversão de glicose a glicogênio no fígado apresentou variações tanto em função do modelo quanto em função do tratamento (figura 22 – A). Os grupos dislipidêmicos apresentaram valores menores em relação aos grupos controles, porém apenas o grupo DIS H₂O apresentou diferença estatística. O grupo CTR Pyc também apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo CTR H₂O. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na análise de conversão hepática de glicose a lipídios (figura 22 - B).

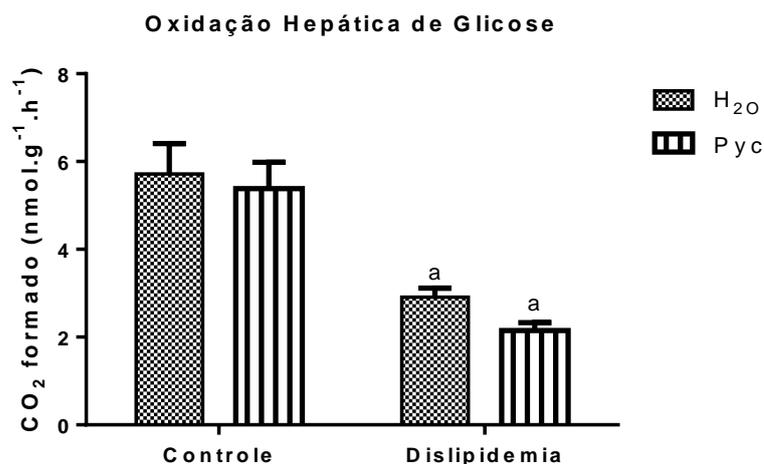


Figura 21 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a oxidação de glicose a CO₂ no fígado em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia. Os dados são apresentados como média ± EPM. n=9 por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo ($p \leq 0,05$, Tukey).

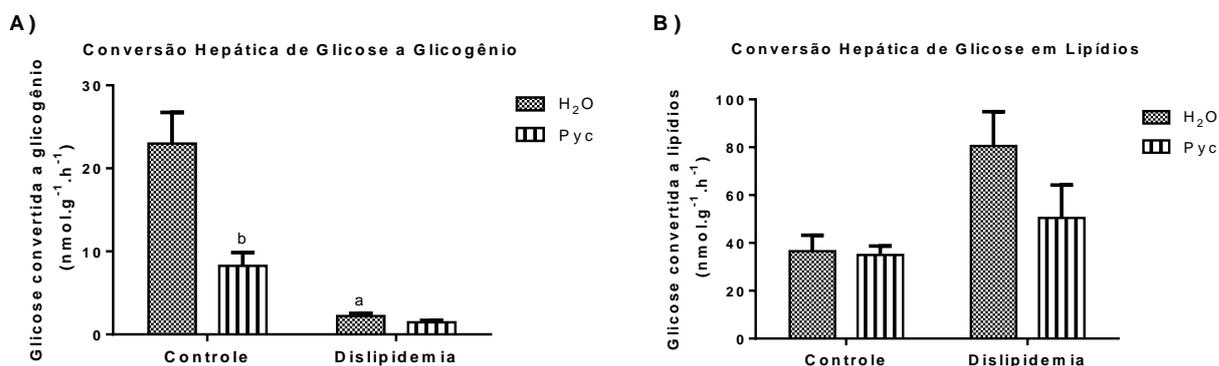


Figura 22 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a conversão hepática de glicose a glicogênio (A) e lipídios (B) em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia. Os dados são apresentados como média ± EPM. n=9 por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo, (b) variação em relação ao grupo CTR H₂O ($p \leq 0,05$, Tukey).

4.3.4 Metabolismo no tecido adiposo retroperitoneal

Na análise de oxidação de glicose a CO₂ no TAR, houve diferença estatística apenas entre o grupo DIS Pyc em relação ao seu controle, os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si (figura 23).

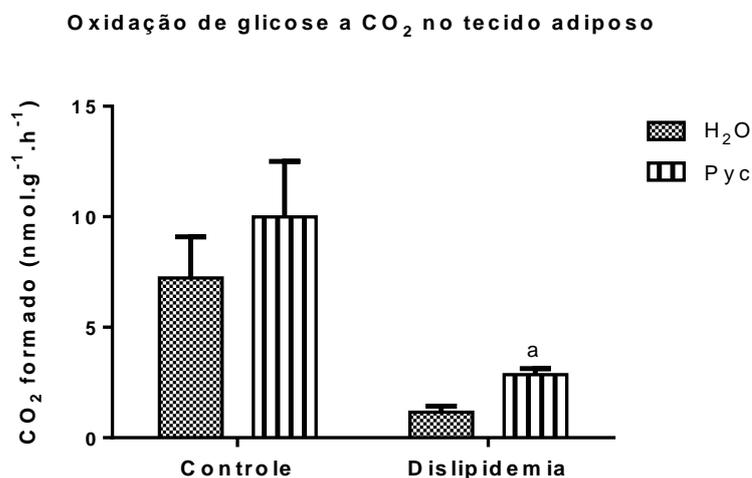


Figura 23 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a oxidação de glicose a CO₂ no tecido adiposo retroperitoneal em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia. Os dados são apresentados como média ± EPM. n=9 por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo ($p \leq 0,05$, Tukey).

Na figura 24, estão representados os resultados das análises de conversão de glicose a lipídios no TAR (A) e liberação de glicerol a partir de triglicerídeos neste mesmo tecido (B). O modelo e o tratamento não atuaram como fonte de variação na via de produção de lipídios a partir de glicose, não havendo diferença estatística entre resultados.

Por outro lado, a liberação de glicerol a partir de lipídios, uma medida da lipólise no TAR, apresentou diferença significativa devido ao modelo, sendo que os grupos dislipidêmicos possuíram uma taxa de lipólise maior do que os grupos controles. Não houve influência do tratamento em nenhum dos parâmetros metabólicos analisados no TAR.

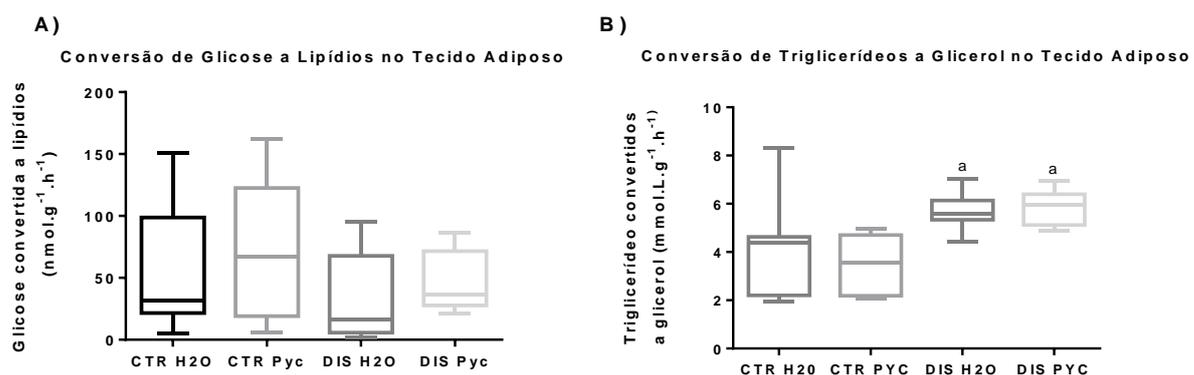


Figura 24 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a conversão de glicose a lipídios (A) e de triglicerídeos a glicerol (B) no tecido adiposo retroperitoneal em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil (25/75). n=9 por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo ($p \leq 0,05$, Dunn).

4.3.5 Metabolismo muscular

A captação de glicose no músculo sóleo sofreu variações em função do modelo e tratamento (figura 25). Os grupos DIS H₂O e CTR Pyc apresentaram valores significativamente mais baixos em relação ao grupo CTR H₂O. Não houve diferença estatística entre os demais grupos.

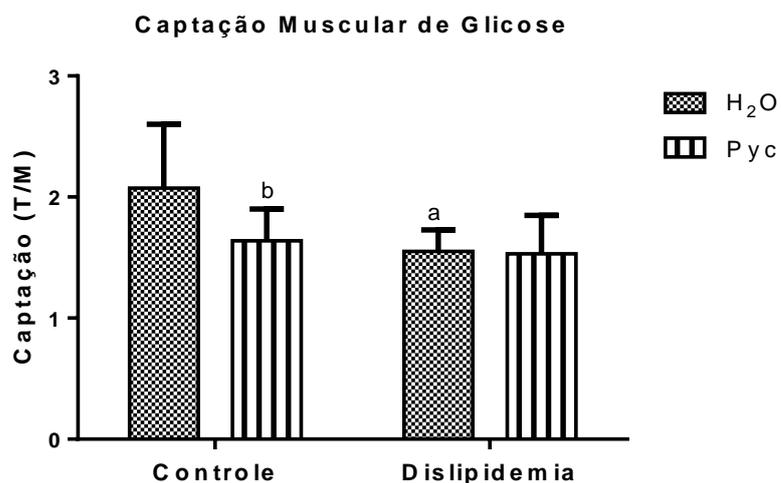


Figura 25 Efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre a captação de glicose no músculo em ratos submetidos ao modelo de dislipidemia. Os dados são apresentados como média \pm EPM. n=9 por grupo. (a) variação referente ao grupo controle respectivo, (b) variação em relação ao grupo CTR H₂O ($p \leq 0,05$, Tukey).

5 DISCUSSÃO

Cogumelos e outros alimentos naturais já se destacaram em estudos científicos por suas propriedades no controle do metabolismo lipídico. (ANANDHI et al., 2013; DE MIRANDA et al., 2014; ZHENG et al., 2014; RONY; AJITH; JANARDHANAN, 2015). Os compostos bioativos encontrados nos alimentos podem ser concentrados através da produção do extrato e ter seus efeitos amplificados pelo aumento da dose. Esse efeito esperado sobre o metabolismo lipídico pode ser alcançado por diferentes vias, e por isso estudos que identifiquem as rotas bioquímicas afetadas quando há a administração do composto auxiliam na compreensão do mecanismo de ação.

Identificar as moléculas que compõe determinado extrato também é um meio de especular um possível mecanismo de ação. Dentz et al. (2017), identificaram no extrato de *P. sanguineus* as moléculas alcaloides cinabarina e ácido cinabarínico. Embora não existam estudos que identifiquem o mecanismo de ação dessas moléculas na regulação do metabolismo lipídico, outros alcaloides já apresentaram efeitos sobre a expressão da enzima 3-hidroxy-3-methyl-glutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase), do gene CYP7A1, dos receptores de LDL, sobre ativação de receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) e sobre o aumento da sensibilidade a insulina (BOUREBABA et al., 2016; HE et al., 2016; YU et al., 2016).

A análise por CLAE-EM identificou no extrato utilizado neste estudo os compostos cinabarina e ácido cinabarínico e o cromatograma obtido apresentou perfil muito semelhante ao cromatograma obtido por Dentz et al. (2017), inclusive quanto às áreas dos picos, que estão relacionadas com a concentração dessas moléculas.

Ressalta-se que essa Dissertação corresponde a um projeto que foi proposto como continuidade do documento patentário BR1020170229440 de Dentz et al. (2017), que utilizou o mesmo extrato no tratamento de ratos diabéticos. Portanto comparações quanto à composição do extrato e resultados discrepantes tornam-se necessárias.

5.1 Experimento 1: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de *P. sanguineus* em ratos diabéticos

Os parâmetros morfométricos observados neste experimento indicam a eficácia do modelo de indução a diabetes utilizado. A intensa depleção dos estoques energéticos em vista da impossibilidade de utilização da glicose afeta o ganho de massa corporal pela diminuição das reservas de gordura do corpo. Esse efeito é observado na diminuição dos índices TAR e TAE e aumento do índice F nos grupos diabéticos, indicando que o baixo ganho de peso foi provavelmente devido à diminuição da massa muscular e do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal.

Embora o PCT não tenha diferido entre os grupos DBT H₂O e DBT Pyc, a variação do peso durante o tratamento foi maior no grupo tratado. Uma vez que o PCT não considera a massa corporal dos ratos no início do experimento e é uma medida obtida para o cálculo dos índices, a variação de peso se torna uma medida mais confiável para relacionar o tratamento e a massa corporal total.

Dessa forma, o tratamento aumentou o ganho de peso dos animais diabéticos em relação aos animais diabéticos que não receberam tratamento. Nesse caso, o ganho de peso corporal costuma ser atribuído à melhora da secreção de insulina e controle glicêmico, fato que não pode ser aplicado a esse estudo, pois o tratamento não alterou a glicemia e produziu alterações hepáticas típicas desta patologia. Além disso, o modelo de DM induzido por streptozotocina lesiona as células beta do pâncreas a ponto de não serem mais capazes de sintetizar e secretar insulina (KAHRAMAN et al, 2015; RADENKOVIĆ et al., 2016). Portanto o aumento do ganho de peso observado provavelmente ocorreu de forma independente de insulina.

Apesar de não observarmos diferenças nos índices calculados, Dentz et al. (2017) identificaram diminuição do índice hepático em animais diabéticos tratados com o extrato de *P. sanguineus* e sugeriram que estes deveriam ter perdido menos massa nos tecidos adiposo e muscular do que os ratos diabéticos não tratados. Vale ressaltar que é possível observar que índice TAR no grupo DBT Pyc é quase duas vezes maior do que no grupo DBT H₂O, apesar de não haver diferenças estatísticas devido à alta variabilidade dos animais. Acreditamos que um aumento no número amostral seria capaz de produzir resultados mais claros.

O aumento da glicemia a valores superiores a 250 mg/dL em função da diminuição dos níveis de insulina mostrou eficiência do modelo na indução a

diabetes (AL-MALKI; EL-RABEY, 2015). Os níveis de lipídios no sangue também foram alterados. No diabetes a dislipidemia é estabelecida por diversos fatores, entre eles a inativação da lipoproteína lipase na ausência de insulina (SALTIEL; KAHN, 2001). O fígado está envolvido na captação e metabolismo de ácidos graxos livres, TG e colesterol, sem essa enzima não ocorre a quebra dessas moléculas que se acumulam no sangue (MOODLEY et al., 2015). Essa dislipidemia foi observada pelo aumento dos níveis de TG e CT.

Foi observada diminuição da concentração de LDL-C nos grupos diabéticos. A alteração das concentrações de LDL-C em diabéticos nem sempre é observada do ponto de vista quantitativo. Porém a redução dos níveis desse tipo de colesterol é proposta como meta terapêutica, pois do ponto de vista qualitativo, as partículas de LDL-C nesses indivíduos apresentam elevada aterogenicidade, por possuírem alterações físicas que aumentam sua densidade e diminuem seu tamanho (SANTOS et al., 2001; MILECH et al., 2015). Portanto, embora não fosse esperada diminuição dos níveis de LDL-C nos grupos diabéticos, o perfil qualitativo dessas partículas deveria ser investigado para verificar seu potencial aterogênico.

Na diabetes, a disfunção renal é caracterizada pelo aumento dos níveis de ureia e creatinina no plasma, considerados produtos do metabolismo que não são devidamente excretados devido à diminuição da taxa de filtração glomerular que então permanecem no sangue (DABLA, 2010; PARVIZI et al., 2014; AZARKISH et al., 2017). Além disso, a ureia é o principal produto final do metabolismo de proteínas e a creatinina é um metabólito formado pelo músculo no metabolismo da creatina. Dessa forma ambos os parâmetros também podem ser indicadores do catabolismo proteico (AHMED et al., 2016; SHI et al., 2018). Enquanto um aumento dos níveis de ureia indica aumento da degradação de proteínas, a diminuição dos níveis de creatinina também pode estar relacionada à diminuição dos níveis de massa muscular esquelética (DABLA, 2010; ADEJOR et al., 2017). Nesse estudo, foi observado aumento dos níveis de ureia e diminuição dos níveis de creatinina, indicando que pode ter ocorrido o comprometimento dos rins e também diminuição da síntese proteica e da massa muscular.

Em contrapartida, os níveis de albumina permaneceram normais no modelo de diabetes. Nessa patologia a diminuição da síntese proteica pode ser observada pela diminuição dos níveis de albumina no sangue (DENTZ et al., 2017). Existe,

portanto, um conflito entre os valores de creatinina e albumina obtidos nos grupos diabéticos. Uma análise da quantidade de massa muscular esquelética poderia mostrar se realmente houve diminuição desse tecido ou não, apesar do indicado pelos parâmetros séricos.

Também foi constatada lesão hepática através do aumento dos níveis de AST e ALT. As transaminases hepáticas são comumente encontradas no soro de indivíduos diabéticos, o aumento dessas enzimas no estado de resistência a insulina ou diabetes é devido ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Quando ocorre aumento dessas enzimas no soro é caracterizado dano hepático em função da necrotização do fígado que libera essas enzimas do citosol para o sangue (EIDI; EIDI; ESMAEILI, 2006; MOODLEY et al., 2015; RONY; AJITH; JANARDHANAN, 2015).

O aumento das concentrações de ALT em ambos os grupos diabéticos indica que as lesões que possivelmente ocorreram nos hepatócitos são devido ao estado hiperglicêmico dos animais e não a algum efeito gerado pelo extrato. Por outro lado, embora os níveis de AST não tenham sido diferentes no grupo DBT Pyc em relação ao grupo DBT H₂O, estes valores também foram semelhantes aos dos grupos CTR, indicando que pode haver um efeito protetor do extrato sobre os hepatócitos.

Diferentemente do esperado, o tratamento com o extrato de *P. sanguineus* não atuou sobre os parâmetros lipídicos do soro. Apesar disso, nota-se um perfil semelhante em todas as análises lipídicas sorológicas: diminuição de 28% na concentração de TG, 13,6% na concentração de CT e aumento de 33,6% na concentração de HDL-C. É importante destacar que os dados apresentaram alta variabilidade, algo incomum para esse tipo de análise, e assim as diferenças estatísticas não foram significativas.

O metabolismo hepático também é normalmente afetado pelo modelo de diabetes. Com a diminuição da insulina e ineficiência do músculo em captar glicose pelo transportador GLUT 4, o excesso de glicose é desviado para o fígado que converte essa molécula em triglicerídeos (NELSON et al., 2011). No entanto esse processo está relacionado à DM II. Nessa condição ainda há insulina circulante que atua ativando enzimas necessárias para síntese de TG como a citrato liase, acetil CoA carboxilase, glicerol cinase, piruvato desidrogenase e ácido graxo sintase (SALTIEL; KAHN, 2001; NELSON et al., 2011).

Na ausência de insulina, como ocorre no modelo de diabetes induzida por estreptozotocina, as vias de síntese de ácido graxos e TG estão diminuídas pelo comprometimento destas enzimas. E apesar do aumento dos depósitos de TG no fígado, não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à lipogênese hepática a partir de glicose. Via que também está comprometida na ausência de insulina em função da inativação da LPL. Dessa forma, o acúmulo de TG hepáticos observado pode não estar relacionado a um aumento da síntese de lipídios e sim a uma diminuição do seu transporte e utilização.

Juntamente com a diminuição da concentração tecidual de glicogênio no fígado, a glicogênese hepática também diminuiu. O metabolismo do glicogênio é mediado pelas enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase, enzimas estas reguladas pela disponibilidade de insulina. Na ausência desse hormônio, a atividade da glicogênio sintase é comprometida e da glicogênio fosforilase é aumentada (SALTIEL; KAHN, 2001; RONY; AJITH; JANARDHANAN, 2015; ELAIDY; HUSSAIN; EL-KHERBETAWY, 2017). Dessa forma, a via glicogênica fica comprometida durante a diabetes e ocorre a redução dos depósitos de glicogênio, como observado neste estudo.

Visto que a captação de glicose no fígado ocorre via GLUT 2 e é independente de insulina, sendo assim é diretamente proporcional aos níveis de glicose no organismo, pode-se esperar por um aumento da oxidação hepática de glicose nos grupos diabéticos. Por outro lado, a ligação da insulina ao seu receptor tirosina cinase, no fígado, e inicia a cascada de sinalização que converte glicose a glicose-6-fosfato, cuja via fica comprometida na ausência desse hormônio (HALL, 2011). Todavia, não foram observadas diferenças estatísticas nesse parâmetro, mas é importante lembrar que o organismo atua sempre de forma compensatória buscando a homeostase do sistema, o que pode ter refletido nesse resultado.

O extrato de *P. sanguineus* pareceu exercer papel importante no metabolismo do TAR, aumentando a oxidação e lipogênese a partir de glicose nesse tecido. Nesse ponto, é possível relacionar o aumento da variação de peso no grupo DBT Pyc com o aumento da conversão de glicose a lipídios no tecido adiposo, e enfatizar o aumento do índice TAR nesse mesmo grupo, que não pode ser identificado pela análise estatística.

Apesar de ser esperada uma diminuição na captação muscular de glicose pela ausência do transportador GLUT 4 dependente de insulina, não houve diferença entre os grupos. Destaca-se que a captação de glicose muda nos diferentes músculos esqueléticos em função da composição de suas fibras e que pode haver ainda compensação e outros transportadores envolvidos além do GLUT 4, como o GLUT 1, na captação dessa molécula (KAINULAINEN et al., 1994).

Em resumo, o tratamento com o extrato de *P. sanguineus* em ratos submetidos ao modelo de diabetes foi capaz de aumentar o ganho de peso corporal, aumentar a oxidação de glicose a CO₂ e sua utilização na síntese de lipídios no TAR. Embora não tenha sido observada diminuição nos parâmetros TG, CT e aumento de HDL-C como foi observado por DENTZ et al. (2017), o extrato continua apresentando claramente um perfil de atuação sobre o metabolismo lipídico.

Baseado nesse perfil, podemos sugerir que o extrato pode estar ativando PPARs. Os PPARs γ (gama) especificamente, atuam regulando a expressão de genes que promovem o armazenamento de gordura, aumentando a oxidação de lipídios no músculo esquelético e tecido adiposo. Tais reguladores são altamente expressos no tecido adiposo e em menor nível no tecido muscular e no fígado, o que pode explicar o perfil notável do extrato apenas sobre o tecido adiposo (HALL, 2011).

Ao mesmo tempo em que promove a lipogênese, a ativação dos PPARs γ induz ao aumento da secreção de adiponectina e aumenta a sensibilidade à insulina (MARTEL et al., 2016). Embora não tenham sido dosadas as concentrações plasmáticas de insulina nem tenham sido realizados estudos de ligação ao receptor tirosina cinase, os resultados de glicemia e captação no músculo sóleo não sugerem efeito do extrato sobre a resistência à insulina.

Assim como os PPARs γ , os PPARs α (alfa) também aumentam a utilização de lipídios aumentando a oxidação de ácidos graxos livres e exercendo papel anti-esteatótico. Os fibratos são medicamentos amplamente utilizados no tratamento da hipertrigliceridemia e atuam ativando os PPARs α que em consequência aumentam os níveis de LPL, regulando a hidrólise de TG, assim como a degradação e síntese de ácidos graxos livres e HDL-C (SPOSITO et al., 2007).

A atuação de moléculas sobre a ativação dos PPARs já é conhecida. O fármaco saroglitazar, comercializado na Índia, é um agonista dos PPARs γ e α

indicado para o tratamento de dislipidemia (JAIN et al., 2015). Esse fármaco já mostrou atuar de forma dose dependente sobre o metabolismo de lipídios e carboidratos diminuindo os níveis séricos de TG, AGL e glicose em modelo de diabetes induzido por dieta (JAIN et al., 2015).

Cogumelos também já demonstraram atuar sobre o tratamento da dislipidemia através desse mecanismo. O extrato de *Pleurotus giganteus* atuou *in vitro* sobre pré-adipócitos aumentando sua proliferação, lipogênese e captação de glicose pelo aumento da expressão da proteína SREBP pela ativação dos PPARs γ . Esses efeitos foram atribuídos a ácidos graxos saturados e monoinsaturados como o ácido palmítico e ácido linoleico que estão presentes no cogumelo e foram concentrados durante o fracionamento do extrato (PARAVAMSIVAM et al., 2016). O extrato metanólico do cogumelo *Cantharellus cibarius* também exibiu papel importante na ativação do PPAR γ , posteriormente foi observado que o ácido acetilênico extraído deste cogumelo era o responsável por tal efeito (HONG et al., 2012).

O aumento da expressão gênica do PPAR α em ratos induzidos a obesidade e diabetes também foi observado após o tratamento com polissacarídeos extraídos do cogumelo *Pleurotus tuber-regium*. Nesse modelo, foi observada diminuição dos depósitos de gordura e das concentrações séricas de TG, CT e LDL-C e aumento da concentração de HDL-C (HUANG et al., 2014).

Alguns alcaloides também já demonstraram efeito antihiperlipídico *in vivo* como as moléculas coptisina, berberina, jatrorrizina, palmitato e epiberberina extraídas da planta *Rhizoma coptidis*, que atuaram na supressão de enzima HMG-CoA redutase, no aumento da expressão do gene CYP7A1 e no aumento da expressão dos receptores de LDL (HE et al., 2016). Outro estudo identificou a berberina como um potente agonista do PPAR α (YU et al., 2016).

A calistegina extraída da planta *Hyoscyamus albus* foi outro alcaloide que exibiu efeitos anti-hiperglicêmicos e anti-hiperlipídicos *in vivo*. Entretanto, o efeito da calistegina sobre o metabolismo lipídico foi atribuído a uma melhora na sensibilidade à insulina (BOUREBABA et al., 2016).

Portanto, o uso de cogumelos que agem no controle da dislipidemia, ativando PPARs, já é documentado e pode ser um efeito atribuído ao extrato utilizado neste estudo. Alguns alcaloides também já atuaram sobre o controle do metabolismo

lipídico através da ativação dos PPARs, mas estes podem estar relacionados a outras vias que envolvem a síntese e degradação de colesterol.

Assim, fica clara a necessidade de novos estudos que avaliem a composição de *P. sanguineus* e seu extrato, a fim de mapear sua formulação e avaliar o efeito individual das moléculas constituintes desse composto.

Considerando que alguns estudos caracterizam extratos produzidos a partir do gênero *Pycnopus* sp. pela sua alta concentração de cinabarina, acreditamos que as diferenças entre este estudo e outros, produzidos com este mesmo extrato, não se devem a diferenças na composição (SMÂNIA et al., 1997; DIAS; URBAN, 2009). Obviamente, análises mais profundas na busca por outros compostos bioativos, que podem ter influência no mecanismo de ação do extrato, devem ser realizadas para confirmar essa suspeita.

Outra questão que pode ter influenciado no efeito deste extrato foi a sua forma de administração. DENTZ et al. (2017) ofereceram uma solução desse extrato a ratos Wistar submetidos ao mesmo modelo de diabetes. Essa solução substituiu o consumo de água dos animais, permitindo um consumo constante. Em nosso trabalho, oferecemos uma única dose diária do extrato. Comparando as diferentes formas de administração, a diferença entre os resultados pode ser atribuída à meia vida ainda desconhecida do composto atuante.

Não foram encontrados estudos que avaliassem a farmacocinética das moléculas cinabarina e ácido cinabarínico, porém, um estudo recente verificou a biodisponibilidade de cinco tipos de alcaloides administrados por via oral e nenhum deles continuou disponível no plasma após 13 horas (SUN et al., 2017). Considerando que a cinabarina possa ser o composto bioativo responsável pelo efeito anti-hiperlipídico do extrato utilizado neste estudo, é provável que seu comportamento farmacocinético seja semelhante ao de outros alcaloides. Assim, a administração contínua ou o aumento na quantidade de doses diárias pode ser capaz de otimizar o efeito do extrato sobre o metabolismo lipídico.

5.2 Experimento 2: Avaliação da atividade anti-hiperlipídica do extrato de *P. sanguineus* em ratos dislipidêmicos

A alimentação com dieta hiperlipídica não induziu ao aumento de peso nos animais e diferenças na variação de peso não foram encontradas. Esse fenômeno já foi observado em outros estudos que utilizaram dieta rica em lipídios. Esses estudos, porém, não avaliaram a composição corporal para identificar porque essa alteração não ocorreu (ARASE et al., 1988; CHAVEZ et al., 1996). Por outro lado, a não alteração da variação de peso pode não estar relacionada a diferenças na composição corporal e sim a menor ingestão calórica, uma vez que alimentos ricos em gorduras promovem maior saciedade pela liberação de leptina (JANG et al, 2003)

Muitas diferenças em relação ao modelo foram observadas nos parâmetros séricos e nos índices morfométricos. A dieta hiperlipídica foi capaz de aumentar os níveis de TG, CT e glicose, essas alterações confirmam a indução a dislipidemia. Somando esses dados ao aumento dos índices TAR e TAE, o modelo obtido nesse experimento pode ser comparado a um modelo de síndrome metabólica.

É importante destacar que a utilização de índices ao invés de pesos absolutos dos tecidos é interessante, pois permite inferir a “porcentagem” do tecido no animal. O peso absoluto, porém, é um dado bruto que não pode ser usado para fins de comparação, sendo que não se sabe o peso total do animal e a relação do tecido com este.

Houve aumento nos índices TAR e TAE de 58,2% e 62,4% no grupo DIS H₂O em relação ao seu controle e 57% e 60,2% no grupo DIS Pyc em relação ao seu controle, respectivamente. Esses dados mostram que apesar de não haver diferença no ganho de massa total ao longo do tratamento, houve um aumento desses depósitos de gordura. Woods et al. (2003) também verificaram que apesar de um aumento modesto de 10% no peso corporal, os depósitos de gordura aumentaram cerca de 45% em relação aos ratos que receberam dieta padrão, caracterizando de fato a obesidade. Dessa forma, é provável que tenha ocorrido diminuição da síntese de massa magra durante o tratamento, o que pode explicar a não variação de peso entre os grupos controles e dislipidêmicos.

Também ocorreu diminuição do índice F no grupo DIS H₂O em relação ao grupo CTR H₂O. Esse fenômeno pode ser atribuído à diminuição da densidade do

fígado pelo aumento dos depósitos de gordura no mesmo, levando a esteatose. Uma análise histológica seria necessária para confirmar essa suspeita.

O tratamento não atuou modificando os parâmetros morfométricos dos ratos submetidos a esse modelo de dislipidemia. Muito embora esses dados não apresentem diferença estatística, a ANOVA de duas vias indicou o tratamento como fonte de variação do índice TAE. Mais uma vez o extrato de *P. sanguineus* atuou sobre o tecido adiposo promovendo o aumento desse depósito em relação ao grupo DIS H₂O.

Além de atuar sobre as concentrações de lipídios no soro, a dieta hiperlipídica também diminuiu os níveis séricos de creatinina. A creatinina é um produto residual o qual é formado a partir do metabolismo muscular da creatina. Essa molécula é produzida no fígado, passa para a circulação e é quase inteiramente absorvida pelo músculo esquelético (SHI et al., 2018). O aumento nos níveis séricos de creatinina pode indicar insuficiência renal (ADEJOR et al., 2017) e a diminuição pode estar relacionada à diminuição dos níveis de massa muscular esquelética (DABLA, 2010). Considerando esse resultado e o fato de que os grupos submetidos à dieta hiperlipídica não apresentaram aumento na variação de peso apesar do aumento do tecido adiposo, a dieta pode ter promovido uma diminuição da síntese proteica. A diminuição dos níveis de creatinina também pode estar associada ao aumento do risco de desenvolvimento de diabetes tipo II, por refletir um menor volume de músculo esquelético e conseqüentemente na diminuição dos receptores de insulina (DABLA, 2010).

Assim como no primeiro experimento, há um conflito entre as concentrações de creatinina e albumina sérica. Uma diminuição da síntese proteica estaria relacionada também a uma diminuição da concentração de albumina. No entanto as alterações nas concentrações de albumina observadas neste estudo podem estar ligadas simplesmente a necessidade de uma quantidade maior dessa molécula para o transporte de ácidos graxos no sangue. O aumento dos níveis de albumina também poderia estar relacionado a danos hepáticos, porém, embora os hepatócitos trabalhem para produzir albumina sérica, não são considerados bons indicadores de disfunção hepática aguda ou leve (MOHAMED et al., 2016).

O modelo da dieta hiperlipídica foi capaz de causar danos ao fígado, produzindo aumento dos níveis séricos da enzima ALT. Além de o aumento dos

níveis de ALT serem excelentes indicadores de hepatotoxicidade, o incremento dessa transaminase no sangue pode ocorrer independente do desenvolvimento de diabetes e está relacionado com o desenvolvimento da resistência à insulina hepática, dislipidemia e síndrome metabólica (NANNIPIERI et al., 2005; MOHAMED et al., 2016).

Assim como no experimento 1, o tratamento não alterou de forma significativa os parâmetros lipídicos do soro. Seu único efeito foi o aumento dos níveis de ureia. Esse efeito era desconhecido até este momento, não ocorrendo em ratos saudáveis e diabéticos. Desta forma, mais estudos devem ser realizados para identificar se o efeito do tratamento com o extrato de *P. sanguineus* sobre os níveis de ureia em ratos dislipidêmicos está relacionado à diminuição da função renal ou aumento do catabolismo proteico.

O metabolismo hepático também foi alterado pela indução à dislipidemia. Apesar de as reservas de glicogênio continuarem estatisticamente iguais aos grupos controles, os grupos dislipidêmicos apresentaram altas concentrações de triglicerídeos no fígado. Novamente, essa medida que pode ser usada para relacionar o desenvolvimento de esteatose e a diminuição do índice F.

Neste experimento, ao contrário do primeiro, a oferta de substrato é aumentada pelo oferecimento de uma dieta hiperlipídica. Quando isso ocorre, a glicose é oxidada preferencialmente para a produção de estoques energéticos como glicogênio e lipídios (GHAFOORY et al., 2013).

Embora os estoques de glicogênio não tenham sido modificados pela dieta, houve diminuição da oxidação da glicose e sua conversão a glicogênio no fígado. É provável que o intenso processo anabólico promovido pela alta oferta de lipídios da dieta tenha levado a saturação das vias de oxidação e glicogênese.

Nas análises de glicogênese e lipogênese a partir de glicose, mais uma vez nota-se que a alta variabilidade interferiu no resultado estatístico. São notáveis as diferenças entre grupos dislipidêmicos e saudáveis e provavelmente um aumento do número amostral seria capaz de identificar essas diferenças. O aumento da via de conversão de lipídios a partir de glicose, se demonstrado de forma estatística, poderíamos relacionar ao aumento de triglicerídeos hepáticos e desenvolvimento de esteatose.

O tratamento atuou sobre o metabolismo hepático, diminuindo a síntese de glicogênio a partir de glicose no grupo CTR Pyc. Essa diminuição já havia sido observada no primeiro experimento, porém não resultou em diferença estatística. Mesmo assim, é um resultado importante pois deixa de relacionar o tratamento com o extrato de *P. sanguineus* apenas ao metabolismo lipídico, ao mesmo tempo em que mostra que seu efeito pode mudar em função do modelo em que é aplicado.

O tratamento não apresentou efeito sobre o metabolismo do TAR, porém, diferenças interessantes relacionadas ao modelo foram obtidas. O modelo induziu a diminuição da oxidação de glicose a CO₂ e aumentou a lipólise.

A captação de glicose no tecido adiposo é feita principalmente via GLUT4, receptor de glicose dependente de insulina, a diminuição da captação dessa molécula para sua posterior oxidação pode estar relacionada à resistência à insulina e não translocação do receptor GLUT4 para a membrana do adipócito (NELSON et al., 2011).

Sabe-se que a insulina também inibe fortemente a lipólise no tecido adiposo através da inibição da enzima lipoproteína lipase pela diminuição dos níveis de AMPc. Dessa forma, o aumento da lipólise observado nesse estudo pode estar relacionado ao aumento da resistência à insulina, culminando na maior atividade da LPL e conseqüentemente maior hidrólise de TG e liberação de ácidos graxos e glicerol pelo tecido adiposo.

Na obesidade, a resistência à insulina e DM II podem ser desenvolvidas por diversos fatores como diminuição da concentração e atividade do receptores tirosina cinase, diminuição da concentração e fosforilação de IRS-1 e IRS-2, na atividade da enzima PI3-K, defeitos na translocação do transportador de glicose e diminuição da ativação das proteíno-cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (SALTIEL; KAHN, 2001). Um estudo demonstrou que animais tratados pelo período de oito semanas com dieta hiperlipídica apresentaram um aumento da lipólise nas células adiposas (GAIDHU et al., 2010).

Portanto, ambas as alterações observadas no metabolismo do tecido adiposo indicam o desenvolvimento de resistência à insulina e novamente caracterizam esse método de indução não apenas como um modelo de dislipidemia, mas também como um modelo de síndrome metabólica. Apesar do aumento dos índices TAR, não foi observada diferença estatística na conversão de glicose a lipídios no TAR, mais

uma vez confirmando que adequações na metodologia e no número amostral devem ser adotadas para minimização da variabilidade dos resultados.

O modelo também foi capaz de reduzir a captação de glicose no músculo, que assim como no adipócito, ocorre principalmente via GLUT4, mais uma vez indicando resistência à insulina. Também foram observadas diferenças entre os grupos CTR Pyc e CTR H₂O, nesse caso o tratamento também diminuiu a captação muscular de glicose.

Em resumo, podemos destacar que o extrato de *P. sanguineus* modulou o metabolismo de ratos dislipidêmicos, aumentando os níveis séricos de ureia em ratos dislipidêmicos, assim como diminuindo conversão hepática de glicose a glicogênio e a captação muscular de glicose em ratos saudáveis. Tais efeitos não observados no primeiro experimento, nem no estudo conduzido por DENTZ et al (2017). Novos experimentos devem ser conduzidos, com as padronizações na forma de administração propostas anteriormente, para verificar esses resultados e compreender melhor o papel do extrato no metabolismo muscular.

A forma de administração do extrato pode ter modificado seu efeito sobre o metabolismo lipídico, como discutido no experimento anterior. Acreditamos que os efeitos do extrato poderão ser amplificados com mudanças na sua forma de administração e aumento no número amostral.

Diferentemente do observado no experimento 1, não é notável a existência de um perfil de atuação do extrato sobre o perfil lipídico. Ainda não é possível afirmar um mecanismo de ação, mas se pode sugerir que, se esse perfil se repetir novamente em experimentos futuros, o mecanismo de ação do extrato pode ser dependente de uma via desequilibrada em função da patologia do diabetes, que ainda não está bem estabelecida no modelo de dislipidemia.

O modelo de dislipidemia desenvolvido em nosso laboratório se mostrou viável e adequado não apenas para dislipidemia, mas também para mimetizar outras patologias. O aumento dos índices TAR e TAE somado ao aumento das concentrações séricas de TG e CT validam o modelo de dislipidemia proposto neste experimento, mas os aumentos na glicemia, diminuição na oxidação de glicose a CO₂ no TAR, aumento da lipólise no TAR e diminuição da captação de glicose muscular sugerem também um modelo de resistência à insulina e desenvolvimento

diabetes tipo 2 ou pré-diabetes. Somadas todas essas alterações, fica estabelecido também um provável modelo de síndrome metabólica.

Para ratos, considera-se diabetes quando os níveis glicêmicos estão acima de 250 mg/dL, portanto nosso modelo não foi capaz de induzir a essa patologia uma vez que a diferença nas concentrações foi de importância estatística e não fisiológica. Porém, acreditamos que com adequações no tempo de indução com a dieta, como sugerido por outros estudos (JANG et al., 2003; WOODS et al., 2003, 2004; GAIDHU et al., 2010), poderemos propor um modelo de diabetes tipo 2 e síndrome metabólica a partir da ração produzida em nosso laboratório.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste estudo, foi possível observar que o extrato de *P. sanguineus*, quando administrado de forma crônica em ratos diabéticos, atua predominantemente sobre o metabolismo de lipídios no tecido adiposo.

Somando esses resultados a estudos anteriores com este mesmo extrato e modelo animal, podemos afirmar que as mudanças no metabolismo que ocorrem a nível tecidual podem provocar mudanças em nível sistêmico modificando o metabolismo de lipídios.

Os resultados indicaram diferenças em relação a estudos anteriores, e isso mostra o quanto ainda deve ser estudado sobre esse extrato em termos de farmacocinética, biodisponibilidade e composição.

Aparentemente o extrato atua de forma diferente no modelo de dislipidemia, mas como acreditamos que a forma de administração adotada neste estudo alterou os efeitos do tratamento, novos estudos devem ser conduzidos para verificar as vias que de fato são afetadas.

Os estudos com extratos da espécie *P. sanguineus* em modelos animais ainda são muito recentes e poucas informações sobre seus efeitos na área da saúde estão disponíveis. Por outro lado, um leque de possibilidades quanto aos estudos futuros está aberto.

Estudos investigando o tempo de meia vida do extrato, a administração crônica ou aguda e diferentes doses devem ser realizados. O mecanismo de ação sobre os PPARs α e γ e a identificação de novos compostos bioativos deste extrato também devem ser explorados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, F. *et al.* Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. **Journal of the American College of Cardiology**. 40(5):937–943, 2002.

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2016**. 4. ed. São Paulo: ABESO, 2016.

ABESO - Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. **Mapa da Obesidade**. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>>. Acesso em: 23 ago. 2017.

ADEJOR, E. B. *et al.* Effects of *Garcinia kola* biflavonoid fractions on serum lipid profile and kidney function parameters in hyperlipidemic rats. **Clinical Phytoscience**. 2(1):19-27, 2017.

AHMED, S. *et al.* Diosmin Modulates the NF-κB Signal Transduction Pathways and Downregulation of Various Oxidative Stress Markers in Alloxan-Induced Diabetic Nephropathy. **Inflammation**. 39(5):1783–1797, 2016.

AKIYAMA, T. *et al.* High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes research and clinical practice**. 31(1–3):27–35, 1996.

ALAM, N.; YOON, K. N.; LEE, T. S. Antihyperlipidemic activities of *Pleurotus ferulae* on biochemical and histological function in hypercholesterolemic rats. **Journal of research in medical sciences**. 16(6):776–786, 2011.

AL-MALKI, A. L.; EL RABEY, H. A. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. **BioMed Research International**. 2015:1-13, 2015.

ANANDHI, R. *et al.* Antihypercholesterolemic and antioxidative effects of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, and its major constituent, chrysin, in Triton WR-1339-induced hypercholesterolemic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**. 69(2):313–323, 2013.

ARASE, K. *et al.* Intracerebroventricular infusions of 3-OHB and insulin in a rat model of dietary obesity. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 255(6):974–981, 1988.

AZARKISH, F. *et al.* Effect of the administration of *Solanum nigrum* fruit on prevention of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacognosy Research**. 9(4):325-332, 2017.

BAHIA, L.; ARAÚJO, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. 13(1):13–17, 2014.

BAHIA, L. *et al.* The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. **BMC Public Health**. 12: 440-447, 2012.

BENOIT, S. C. *et al.* Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. **Journal of Clinical Investigation**. 119(9):2577–2589, 2009.

BORDERES, J. *et al.* Antioxidant activity of the extracts from *Pycnoporus sanguineus* mycelium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 54(6):1167–1174, 2011.

BOUREBABA, L. *et al.* Evaluation of antidiabetic effect of total calystegines extracted from *Hyoscyamus albus*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 82: 337–344, 2016.

BRANDÃO, A. P. *et al.* I Diretriz Brasileira De Diagnóstico E Tratamento Da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 84: 1–28, 2005.

BRASIL. Constituição Federal. Lei n. 11.794 (Lei Arouca), de 08 de outubro de 2008. **Lex:** Estabelece procedimentos para uso científico de animais.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e Comissão Nacional de Energia Nuclear. Resolução n. 167, de 30 de abril de 2014. **Lex:** Norma CNEN NN 8.01 - Gerência de rejeitos de baixo e médio níveis de radiação.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill, 2012.

CAMARERO, S. *et al.* Engineering Platforms for Directed Evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Applied and Environmental Microbiology**. 78(5):1370–1384, 2012.

CAMASSOLA, M. *et al.* Secretion of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus* strains cultivate in solid-state using *Pinus* spp. sawdust. **Brazilian Journal of Microbiology**. 44(1):207–213, 2013.

CHAN, J. M. *et al.* Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. **Diabetes Care**. 17(9):961–969, 1994.

CHANG, S.-T. Overview of Mushroom Cultivation and Utilization as Functional Foods. In: **Mushrooms as Functional Foods**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p. 1–33.

CHAVEZ, M. *et al.* Central insulin and macronutrient intake in the rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 271(3):727–731, 1996.

COLDITZ, G. *et al.* Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. **American journal of epidemiology**. 132(3):501–513, 1990.

DABLA, P. K. Renal function in diabetic nephropathy. **World Journal of Diabetes.** 1(2):48-56, 2010.

DE MIRANDA, A. M. *et al.* Hypolipidemic effect of the edible mushroom *Agaricus blazei* in rats subjected to a hypercholesterolemic diet. **Journal of Physiology and Biochemistry.** 70(1):215–224, 2014.

DE SILVA, D. D. *et al.* Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. **Fungal Diversity.** 62(1):1–40, 2013.

DEEDWANIA, P. C.; GUPTA, R. Management issues in the metabolic syndrome. **The Journal of the Association of Physicians of India.** 54: 797–810, 2006.

DENTZ, M. C. V. *et al.* **Uso de um composto ou um extrato obtido a partir do fungo *Pycnoporus sanguineus* na preparação de uma composição nutracêutica, medicamento, suplemento, alimento funcional e/ou composição fitoterápica para redução de gorduras ou índices lipídicos.** Brasil, BR1020170229440, 2017.

DIAS, D. A.; URBAN, S. HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. **Natural product communications.** 4(4):489–498, 2009.

DOBBS, R. *et al.* **Overcoming obesity: An initial economic analysis.** McKinsey Global Institute, 2014.

DOURMASHKIN, J. *et al.* Different forms of obesity as a function of diet composition. **International Journal of Obesity.** 29: 1368–1378, 2005.

EGGERT, C. Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. **Microbiological Research.** 152(3):315–318, 1997.

EIDI, A.; EIDI, M.; ESMAEILI, E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine**. 13: 624–629, 2006.

ELAIDY, S. M.; HUSSAIN, M. A.; EL-KHERBETAWY, M. K. Time-dependent therapeutic roles of nitazoxanide on high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes in rats: Effects on hepatic PPAR- γ receptors. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 2017.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven, Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; OPS – Organización Panamericana de la Salud. **Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional**. Santiago: FAO/OPS, 2017.

FAZIO, F. Cinnabarinic Acid, an Endogenous Metabolite of the Kynurenine Pathway, Activates Type 4 Metabotropic Glutamate Receptors. **Molecular Pharmacology**. 81(5):643–656, 2012.

FAZIO, F. *et al.* Cinnabarinic acid, an endogenous agonist of type-4 metabotropic glutamate receptor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **Neuropharmacology**. 81: 237–243, 2014.

FIGUEIREDO, Á.; SILVA, A. C. e. Atividade “*in vitro*” de extratos de *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinus crinitus* sobre o fitopatógeno *Fusarium* sp. **Acta Amazonica**. 44(1):1–8, 2014.

FINKELSTEIN, E. A. *et al.* Annual Medical Spending Attributable To Obesity: Payer-And Service-Specific Estimates. **Health Affairs**. 28(5):822–831, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**. 226(1):497–509, 1957.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica - Fundamentos da Terapêutica Racional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

GAIDHU, M. P. *et al.* Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. 298(4):961-971, 2010.

GAMBATO, G. *et al.* Evaluation of productivity and antioxidant profile of solid-state cultivated macrofungi *Pleurotus albidus* and *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**. 207: 46–51, 2016.

GARCIA, T. A. Purificação e caracterização de lacases de *Pycnoporus sanguineus*. **Tese (Doutorado em Biologia Molecular)**. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GHAFOORY, S. *et al.* Zonation of Nitrogen and Glucose Metabolism Gene Expression upon Acute Liver Damage in Mouse. **PLoS ONE**. 8(10):e78262, 2013.

GIAVASIS, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**. 26: 162–173, 2014.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton e Hall Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HASLER, C. M. Functional foods: benefits, concerns and challenges-a position paper from the american council on science and health. **The Journal of nutrition**. 132(12):3772–81, 2002.

HE, K. *et al.* Hypolipidemic Effects of Alkaloids from *Rhizoma Coptidis* in Diet-Induced Hyperlipidemic Hamsters. **Planta Medica**. 82(8):690–697, 2016.

HONG, S. S. *et al.* Acetylenic acid analogues from the edible mushroom Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) and their effects on the gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 22(6):2347–2349, 2012.

HUANG, H.-Y. *et al.* Effect of *Pleurotus tuber-regium* Polysaccharides Supplementation on the Progression of Diabetes Complications in Obese-Diabetic Rats. **The Chinese Journal of Physiology**. 57(4):198–208, 2014.

HWANG, H.-J. *et al.* Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**. 76(26):3069–3080, 2005.

IDF – International Diabetes Federation. **The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome**. IDF, 2006.

IDF – International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas**. 7. ed. IDF, 2015.

ISOMAA, B. *et al.* Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome. **Diabetes Care**. 24(4):683–689, 2001.

JAIN, M. R. *et al.* Saroglitazar, a novel PPAR α / γ agonist with predominant PPAR α activity, shows lipid-lowering and insulin-sensitizing effects in preclinical models. **Pharmacology research & perspectives**. 3(3):e00136, 2015.

JANG, I. *et al.* Physiological difference between dietary obesity-susceptible and obesity-resistant Sprague Dawley rats in response to moderate high fat diet. **Experimental animals**. 52(2):99–107, 2003.

JOSHI, A. D. *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor–Dependent Stanniocalcin 2 Induction by Cinnabarinic Acid Provides Cytoprotection against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. 353: 201–212, 2015.

KAHRAMAN, S. *et al.* Diabetes- Resistant NOR Mice Are More Severely Affected by Streptozotocin Compared to the Diabetes-Prone NOD Mice: Correlations with Liver and Kidney GLUT2 Expressions. **Journal of Diabetes Research**. 2015:8, 2015.

KAINULAINEN, H. *et al.* In vivo glucose uptake and glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT4 in heart and various types of skeletal muscle from streptozotocin-diabetic rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**. 1225(3):275–282, 1994.

KAUR, J.; JASPINDER. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology research and practice**. 2014: 1-21, 2014.

KELLY, T. *et al.* Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **International Journal of Obesity**. 32(9):1431–1437, 2008.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 89(6):2548–2556, 2004.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KROTKIEWSKI, M. *et al.* Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. **Journal of Clinical Investigation**, 72(3):1150–1162, 1983.

LEVASSEUR, A. *et al.* The genome of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: a basidiomycete model with a versatile arsenal for lignocellulosic biomass breakdown. **BMC Genomics**. 15(1):486-510, 2014.

LOWE, M. M. *et al.* Identification of Cinnabarinic Acid as a Novel Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand That Drives IL-22 Production. **PLoS ONE**. 9(2):87877, 2014.

MACHADO, V. L.; WASSERMANN, G. F.; MARQUES, M. In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and alpha-aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorbigni*). **General and comparative endocrinology**. 82(1):8–13, 1991.

MARTEL, J. *et al.* Anti-obesogenic and antidiabetic effects of plants and mushrooms. **Nature Reviews Endocrinology**. 13(3):149–160, 2016.

MARTINELLO, F. *et al.* Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. **Food and Chemical Toxicology**. 44(6):810–818, 2006.

MASCARO, M.B. *et al.* Effects of Dietary Supplementation with *Agaricus sylvaticus* Schaeffer on Glycemia and Cholesterol after Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2014:10, 2014.

MERSMANN, H. J.; HU, C. Y. Factors affecting measurements of glucose metabolism and lipolytic rates in porcine adipose tissue slices in vitro. **Journal of animal science**. 64(1):148–164, 1987.

MILECH, A. *et al.* **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014-2015)**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2015.

MILECH, A. *et al.* **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

MOHAMED, J. *et al.* Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage: The role of oxidative stress and inflammation. **Sultan Qaboos University Medical Journal**. 16(2):132-141, 2016.

MOLINA, S. *et al.* Oxidative degradation of model lipids representative for main paper pulp lipophilic extractives by the laccase–mediator system. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 80(2):211–222, 2008.

MOODLEY, K. *et al.* Antioxidant, antidiabetic and hypolipidemic effects of *Tulbaghia violacea* Harv. (wild garlic) rhizome methanolic extract in a diabetic rat model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 15: 408-421, 2015.

MORAIS, R.L. Remoção de hormônios sexuais sintéticos por carbonização hidrotermal e por fungos de decomposição branca. **Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente)**. Escola de Engenharia Civil, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2012.

NANNIPIERI, M. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. **Diabetes care**. 28(7):1757–1762, 2005.

NCEP. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA: The Journal of the American Medical Association**. 285(19):2486–2497, 2001.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

O'NEILL, S.; O'DRISCOLL, L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. **Obesity Reviews**. 16: 1–12, 2015.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Alma-Ata 1978 - Relatório da conferência internacional sobre cuidados primários de saúde**. Brasília: UNICEF, 1979.

PACKER, L. et al. **Antioxidants in diabetes management**. New York, Ed. Marcel Dekker, 2000.

PARAVAMSIVAM, P. et al. Giant Oyster Mushroom *Pleurotus giganteus* (Agaricomycetes) Enhances Adipocyte Differentiation and Glucose Uptake via Activation of PPAR γ and Glucose Transporters 1 and 4 in 3T3-L1 Cells. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. 18(9):821–831, 2016.

PARHOFER, K. G. Interaction between Glucose and Lipid Metabolism: More than Diabetic Dyslipidemia. **Diabetes & Metabolism Journal**. 39(5):353-362, 2015.

PARVIZI, M. R. et al. Protective effect of magnesium on renal function in STZ-induced diabetic rats. **Journal of diabetes and metabolic disorders**. 13(1):84-97, 2014.

POLAK, J. et al. Laccase-mediated synthesis of a phenoxazine compound with antioxidative and dyeing properties – the optimisation process. **New Biotechnology**. 33(2):255–262, 2016.

RADENKOVIĆ, M. et al. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 78: 13-31. 2016.

RAMACHANDRAN, A. et al. Cost-Effectiveness of the Interventions in the Primary Prevention of Diabetes Among Asian Indians: Within-trial results of the Indian Diabetes Prevention Programme (IDPP). **Diabetes Care**. 30(10):2548–2552, 2007.

RAMÍREZ-CAVAZOS, L. I. et al. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 108: 32–42, 2014.

REIS, F. S. *et al.* Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**. 50(2):191–197, 2012.

RESENDE, P. E. de *et al.* The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 144(3):735–740, 2012.

RONY, K. A.; AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of the Cracked-Cap Medicinal Mushroom *Phellinus rimosus* (Higher Basidiomycetes) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **International journal of medicinal mushrooms**. 17(6):521–531, 2015.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**. 414(6865):799–806, 2001.

SANTOS, R. D. *et al.* III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 77(3):1–48, 2001.

SHI, F. *et al.* Hypolipidemic effect and protection ability of liver-kidney functions of melanin from Lachnum YM226 in high-fat diet fed mice. **Food & function**. 2018.

SICHERI, R.; NASCIMENTO, S. do; COUTINHO, W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. 23(7):1721–1727, 2007.

SILVA, R. D. *et al.* The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**. 82(6):818–826, 2011.

SIRTORI, C. R. *et al.* Nutraceutical Approaches to the Metabolic Syndrome. **Annals of Medicine**. 49(8):678-697, 2017.

SMÂNIA, A. *et al.* Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnopus sanguineus* (Fr.) Murr. **Phytotherapy Research**. 17(9):1069–1072, 2003.

SMÂNIA, E. F. A. *et al.* Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnopus sanguineus*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. 70(1):57–59, 1997.

SPOSITO, A. C. *et al.* IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 88: 2–19, 2007.

STICH, V. *et al.* Adipose Tissue Lipolysis and Hormone-Sensitive Lipase Expression during Very-Low-Calorie Diet in Obese Female Identical Twins. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 82(3):739-744, 1997.

SUN, L. *et al.* Development and Validation of an UPLC-MS/MS Method for Pharmacokinetic Comparison of Five Alkaloids from JinQi Jiangtang Tablets and Its Monarch Drug *Coptidis Rhizoma*. **Pharmaceutics**. 10(1):4, 2017.

TAKEUCHI, K. *et al.* Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. **Digestive Diseases and Sciences**. 39(3):626–634, 1994.

TORRES, I. L. *et al.* Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Brazilian journal of medical and biological research**. 34(1):111–116, 2001.

VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. **Analytical Biochemistry**. 11: 256-265, 1965.

WHO – World Health Organization. **Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation**. Geneva: WHO, 2000.

WHO – World Health Organization. **Global Report on Diabetes**. Geneva: WHO, 2016.

WHO – World Health Organization. **Overweight and obesity**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/>. Acesso em: 23 ago. 2017.

WOODS, S. C. *et al.* A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **The Journal of nutrition**, 133(4):1081–7, 2003.

WOODS, S. C. *et al.* Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. **Physiology & Behavior**. 83(4):573–578, 2004.

WRENDENBERG, A, *et al.* Respiratory chain dysfunction in skeletal muscle does not cause insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**. 350(1):202-207, 2006.

XAVIER, H. T. *et al.* V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 101(4):01–22, 2013.

YU, H.; LI, C. *et al.* Berberine is a potent agonist of peroxisome proliferator activated receptor alpha. **Frontiers in bioscience**. 21: 1052–1060, 2016.

ZHENG, L. *et al.* Antihyperlipidemic and hepatoprotective activities of mycelia zinc polysaccharide from *Pholiota nameko* SW-02. **International Journal of Biological Macromolecules**. 70: 523–529, 2014.

ZJAWIONY, J. K. Biologically Active Compounds from Aphylophorales (Polypore) Fungi. **Journal of Natural Products**. 67(2):300–310, 2004.