



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ALEXANDRE PICCININI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE ALCACHOFRA SOBRE
PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS E NEUROQUÍMICOS EM MODELO
ANIMAL DE OBESIDADE**

ALEXANDRE PICCININI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO DE ALCACHOFRA SOBRE
PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS E NEUROQUÍMICOS EM MODELO
ANIMAL DE OBESIDADE**

**LINHA DE PESQUISA: INVESTIGAÇÃO DE AGRAVOS CRÔNICOS À
SAÚDE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Gislaíne Tezza Rezin, Dra.

Tubarão
2019

P65 Piccinini, Alexandre, 1975 -
 Avaliação do efeito do extrato de alcachofra sobre parâmetros
 neuroinflamatórios e neuroquímicos em modelo animal de obesidade /
 Alexandre Piccinini. – 2019.
 101 f. : il. color. ; 30 cm

 Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-
 graduação em Ciências da Saúde.
 Orientação: Profa. Dra. Gislaine Tezza Rezin

 1. Inflamação - Tratamento. 2. Obesidade. 3. Cérebro - Doenças -
 Tratamento. 4. Alcachofra. I. Rezin, Gislaine Tezza. II. Universidade do
 Sul de Santa Catarina. III. Título.

 CDD (21. ed.) 616.0473

Ficha catalográfica elaborada por Carolini da Rocha CRB 14/1215.



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Avaliação do efeito do extrato de alcachofra sobre parâmetros neuroinflamatórios e neuroquímicos em modelo animal de obesidade

ALEXANDRE PICCININI
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 13 de dezembro de 2019.

Gislaine Tezza Rezin (orientador) _____

Doutora Patricia de Aguiar Amaral (Avaliador externo - Unesc) _____

Doutor Rafael Mariano de Bitencourt (avaliador interno) _____

Professora Doutora Fabiana Schuelter Trevisol
COORDENADORA ADJUNTA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

*Dedico minha dissertação a minha esposa
Cleonice e a meu filho Matheus, pelo
incentivo e apoio incondicional em todas
as minhas decisões.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser luz nos momentos de indecisão, mostrar os caminhos nas incertezas e me dar tranquilidade para seguir em frente!

A minha família por todo apoio, incentivo e carinho. Especialmente a minha esposa, Cleonice, por toda paciência, amor e compreensão nos meus momentos de ausência, e a meu filho, Matheus, pela compreensão e apoio. Este Mestrado não seria viável sem o apoio de vocês.

A minha orientadora, professora Gislaine Tezza Rezin, agradeço pelos ensinamentos constantes e toda ajuda durante o período do mestrado. Serei eternamente grato por todo conhecimento, atenção e apoio.

A equipe do laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos da UNISUL, sem vocês a conclusão deste trabalho não seria possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), aos seus professores e funcionários, pelo auxílio na realização de todas as atividades e pela oportunidade de estudar em uma instituição de excelência.

Enfim, agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui. Muito obrigado!

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”. (John Dewey).

RESUMO

Introdução: A obesidade é definida como o acúmulo de gordura excessivo no tecido adiposo que leva a uma inflamatória sistêmica de baixo grau, que por sua vez parece estar associada a neuroinflamação culminando em danos neuronais. Assim, devido as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da alcachofra, esta pode ser uma alternativa no tratamento da obesidade.

Objetivo: Avaliar o efeito da administração de extrato de alcachofra sobre parâmetros neuroinflamatórios e neuroquímicos.

Métodos: Foram utilizados 80 camundongos Swiss machos com 40 dias de idade. Inicialmente os animais foram pesados e pareados em 2 grupos de igual número: Dieta normolipídica (grupo controle) e Dieta hiperlipídica (grupo obeso). Os camundongos foram mantidos neste regime por 10 semanas e pesados semanalmente. Após 6 semanas de protocolo de dieta, os camundongos foram pareados em grupos para o tratamento com extrato de alcachofra 1,6g/kg, nos seguintes regimes, onde foram mantidos por 4 semanas: Dieta normolipídica + salina; Dieta normolipídica + extrato de alcachofra; Dieta hiperlipídica + salina e Dieta hiperlipídica + extrato de alcachofra. Após a morte dos animais, o peso da gordura visceral, parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no cérebro dos camundongos foram avaliados.

Resultados: O tratamento com extrato de alcachofra não teve efeito no peso corporal, mas reduziu a gordura visceral. Animais obesos apresentaram aumento da inflamação e danos oxidativos, bem como aumento da atividade de enzimas antioxidantes nas estruturas cerebrais. O tratamento com extrato de alcachofra reverteu parcialmente as alterações nos parâmetros de dano inflamatório e oxidativo e atenuou as alterações na defesa antioxidante. O extrato de alcachofra teve um efeito benéfico no cérebro de animais obesos, pois reverteu parcialmente as mudanças causadas pelo consumo de uma dieta rica em gorduras e consequente obesidade.

Conclusão: Nossos resultados apoiam estudos que indicam que o extrato de alcachofra pode contribuir para o tratamento da obesidade.

Descritores: Obesidade. Extrato de alcachofra. Cérebro. Inflamação. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is defined as the accumulation of excessive fat in adipose tissue that leads to a low grade systemic inflammation, which in turn seems to be associated with neuroinflammation culminating in neuronal damage. Thus, due to the anti-inflammatory and antioxidant properties of artichoke, this may be an alternative in the treatment of obesity.

Objective: To evaluate the effect of artichoke extract administration on neuroinflammatory and neurochemical parameters.

Methods: Eighty male 40-day-old Swiss mice were used. Initially the animals were weighed and matched in two groups of equal numbers: normolipid diet (control group) and hyperlipid diet (obese group). The mice were kept on this regimen for 10 weeks and weighed weekly. After 6 weeks of dietary protocol, mice were matched in groups for treatment with 1.6g / kg artichoke extract in the following regimens, where they were maintained for 4 weeks: Normolipid diet + saline; Normolipid diet + artichoke extract; Hyperlipid diet + saline and Hyperlipid diet + artichoke extract. After the animals' death, the visceral fat weight, inflammatory parameters and oxidative stress in the mice brain were evaluated.

Results: Treatment with artichoke extract had no effect on body weight, but reduced visceral fat. Obese animals showed increased inflammation and oxidative damage, as well as increased activity of antioxidant enzymes in brain structures. Artichoke extract treatment partially reversed changes in inflammatory and oxidative damage parameters and attenuated changes in antioxidant defense. Artichoke extract had a beneficial effect on the brain of obese animals as it partially reversed the changes caused by eating a high fat diet and consequent obesity.

Conclusion: Our results support studies indicating that artichoke extract may contribute to the treatment of obesity.

Keywords: Obesity. Artichoke extract. Brain. Inflammation. Oxidative stress.

LISTAS

Lista de abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHE – Barreira Hemato-encefálica

CA – Ácido Cafeico (do Inglês *Caffeic acid*)

CAT – Catalase

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CGA – Ácido Clorogênico (do Inglês *Chlorogenic acid*)

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DBCA – Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos

DCFH – Diclorofluoresceína

DEXA - Raios-x de dupla energia (do inglês *Dual-energy X-ray absorptiometry*)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do Inglês *Deoxyribonucleic acid*)

DTNB – 5,5 ditióbis (ácido nitro-benzóico)

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do Inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GLP-1 – Peptídeo semelhante a glucagon 1 (do inglês *Glucagon-like peptide-1*)

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathione Oxidada

HDL – Lipoproteína de alta densidade (do Inglês *High density lipoprotein*)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas

IMC – Índice de massa corporal

IL-10 – Interleucina 10

IL1- β – Interleucina 1 Beta

IL6 – Interleucina 6

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do Inglês *Low density lipoprotein*)

MS – Ministério da Saúde

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido

NE – Noradrenalina

NFKB – Fator nuclear kappa B (do inglês *Nuclear factor kappa B*)

NPY – Neuropeptídeo Y

OMS – Organização Mundial de Saúde

NO – Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic acid*)

SE – Serotonina

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α (do Inglês *Tumor necrosis factor alpha*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Desenho experimental.....	32
-------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1.1 Definição, epidemiologia e diagnóstico da obesidade	16
1.1.2 Fisiopatologia da obesidade	17
1.1.3 Tratamento da obesidade	21
1.1.4. Produtos Fitoterápicos	23
1.1.4.1 Alcachofra (<i>Cynara Scolimus</i>)	24
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MÉTODOS	30
3.1 TIPO DE ESTUDO	30
3.2 ANIMAIS.....	30
3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO	30
3.3.1 Preparo do extrato de Alcachofra	30
3.3.2 Desenho experimental	31
3.3.3 Remoção dos tecidos	32
3.3.4 Preparo material biológico análises parâmetros inflamatórios e bioquímicos	32
3.4 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E BIOQUÍMICOS	33
3.4.1 Parâmetros de inflamação.....	33
3.4.2 Parâmetros do dano oxidativo	33
3.4.3 Atividade das enzimas antioxidantes	34
3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS	35
3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	35
4. ARTIGO	36
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS.....	69
APENDICE.....	80
APENDICE A – NORMAS DA REVISTA.....	81
ANEXO	100
ANEXO 1 – PARECER DO CEUA.....	101

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo no tecido adiposo que reflete algum risco para a saúde do indivíduo, sendo considerada um problema de saúde pública. Neste sentido, a principal causadora de obesidade e sobrepeso está relacionada ao desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas¹.

Atualmente, as taxas de obesidade vêm aumentando e o número de obesos dobrou desde 1980, tomando proporções epidêmicas em todo o mundo¹. Dados sobre a obesidade se tornaram alarmantes, uma vez que a mesma é responsável por ocasionar prejuízos à saúde humana, aumentando significativamente o risco de comorbidades, comprometendo a qualidade de vida e a longevidade da população².

O tempo tem demonstrado que a obesidade e o consumo excessivo de alimentos ricos em gorduras saturadas, favorece o desencadeamento da inflamação. Assim, a obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica de baixo grau, detectada pela elevação de citocinas pró-inflamatórias e pela presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco³. Esta inflamação pode se propagar para uma inflamação sistêmica, desestabilizando a função de vários órgãos como, fígado, pâncreas, músculo e sistema nervoso central (SNC)^{2,4} e, assim, contribuir para o início e progressão de doenças metabólicas associadas⁵.

Já foi relatado que os efeitos da obesidade no SNC podem ser causados por um processo inflamatório que tem início na periferia, com um desbalanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, sendo este desequilíbrio capaz de causar danos diretos em estruturas neuronais⁶. Além disso, a perda da integridade da barreira hematoencefálica (BHE) pode influenciar na progressão da obesidade, visto que células imunes dos tecidos periféricos podem ser recrutadas para o SNC e contribuir com o processo neuroinflamatório⁷, o qual favorecerá a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, consequentemente, o estresse oxidativo local⁸.

Devido ao aumento substancial da prevalência, bem como os riscos à saúde decorrentes da obesidade, muitos pesquisadores têm direcionado seus estudos para o controle da inflamação e das alterações relacionadas ao desenvolvimento desta doença. Neste sentido, a implementação de um plano dieto-terapêutico hipocalórico aliado à educação nutricional e ao aumento da atividade física constituem o tratamento convencional e de primeira escolha para a obesidade.

No entanto, os altos índices de insucesso dessas medidas, demonstram a necessidade de recursos terapêuticos coadjuvantes⁹.

Na obesidade, as terapias farmacológicas tem se mostrado repletas de efeitos adversos graves e muitos medicamentos foram retirados do mercado por exibirem riscos-benefícios desfavoráveis^{10,11}. O avanço das pesquisas a cerca dos mecanismos fisiológicos envolvidos na obesidade e no seu controle, tem apontado benefícios com o uso de substâncias de origem natural¹², visando além de resultados efetivos, também, uma diminuição dos efeitos colaterais provenientes dos medicamentos tradicionais¹³.

Dentre as plantas medicinais, a *Cynara scolymus*, conhecida popularmente como alcachofra¹⁴, tem sido apontada como benéfica na redução de peso em diversos estudos^{12,14-17}. Segundo o Memento Fitoterápico (2016), a alcachofra tem indicação terapêutica como antidiséptica, antiflatulenta e diurética, auxiliar na prevenção de aterosclerose, coadjuvante no tratamento de dislipidemias mistas leves a moderadas e auxiliar nos sintomas da síndrome do intestino irritável¹⁸, fazendo parte da RENAME 2018 integrando a Relação Nacional de Medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica¹⁹.

Neste contexto, a alcachofra possui princípios ativos pertencentes à classe dos ácidos fenólicos, fenilpropanóides, saponinas, flavonóides, sesquiterpenos e esteroides¹⁸. Aos ácidos fenólicos, principalmente ácidocafeico (CA) e ácido clorogênico (CGA), são atribuídas diversas atividades farmacológicas incluindo além das propriedades anti-diabéticas e anti-obesidade²⁰⁻²³, atividade antioxidante²⁴⁻²⁷, anti-inflamatória^{24,26,28,29} e neuroprotetora³⁰, o que sugere uma possível ação benéfica desses compostos sobre os danos inflamatórios associados a obesidade, tanto em tecidos periféricos como no SNC.

Assim, é de grande importância a elucidação dos benefícios da utilização do extrato de alcachofra como tratamento coadjuvante na obesidade para o controle da neuroinflamação, uma vez que esse processo inflamatório parece estar envolvido tanto nas disfunções neurológicas quanto em comorbidades associadas à doença. A comprovação dos efeitos anti-inflamatórios da alcachofra beneficiará sobremaneira os portadores de doenças crônicas inflamatórias, como a obesidade.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Definição, epidemiologia e diagnóstico da obesidade

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode atingir graus capazes de afetar a saúde do indivíduo¹. É um distúrbio complexo causado pelo desequilíbrio energético entre calorias consumidas e gastas, associado a inatividade física¹. Um grande problema que está relacionado diretamente com essa epidemia, são as comorbidades, dentre elas: Diabetes *mellitus* tipo 2, resistência à insulina (RI), dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica, doenças respiratórias crônicas, doenças articulares, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, doenças psicológicas e cognitivas³¹⁻³⁴.

A obesidade é uma doença que cresceu muito nos últimos anos, sendo considerada uma epidemia mundial. Neste sentido, 30% da população (2,2 bilhões de pessoas) tem sobrepeso ou é classificada como obesa. A prevalência da obesidade aumentou globalmente, de maneira preocupante, passando a ser classificada como a quinta principal causa de morte em todo o mundo, sendo que no ano de 2015 o índice de massa corporal (IMC) alto contribuiu para 4,0 milhões de óbitos³⁵. A projeção mundial é de que em 2025, existam cerca de 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 700 milhões com obesidade. Para crianças essa projeção pode alcançar 75 milhões³⁶.

No Brasil, medidas antropométricas obtidas na última “Pesquisa de Orçamentos Familiares”, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE), em 2017-2018, trouxeram informações importantes a respeito do estado nutricional da população brasileira. Esse estudo aponta que o excesso de peso e a obesidade são problemas de grande relevância para a saúde pública no Brasil, mostrando que mais da metade da população das capitais brasileiras está com sobrepeso³⁷. Contribuindo para este cenário, dados do Ministério da Saúde (MS) (2019)^{38,39}, demonstraram aumento significativo de 11,8% para 19,8% de obesidade entre os anos de 2006 a 2018. Assim como a obesidade, o excesso de peso também teve um crescimento, no qual mais da metade da população, 55,7%, está com excesso de peso. As taxas são maiores na população adulta, entre 35 e 64 anos, ficando entre 22,5 e 22,9%, entretanto a prevalência dobra a partir dos 25

anos. Esse levantamento aponta ainda crescimento proporcional das comorbidades associadas à obesidade como diabetes e hipertensão³⁶.

Segundo os resultados da Pesquisa Nacional em Saúde, realizada pelo IBGE no ano de 2013, o estado de Santa Catarina liderava o ranking nacional de pessoas obesas, com índice de 25,7%⁴⁰. Levantamento realizado pelo MS em 2018 mostrou que a população de Florianópolis está majoritariamente acima do peso (52,1%), sendo que 17,4% apresentam quadro de obesidade³⁸.

Diante dos altos índices de sobrepeso e obesidade, faz-se necessário a conscientização da população frente aos prejuízos ocasionados por essa doença e as consequências decorrentes. Assim, a obesidade pode ser determinada através de medidas antropométricas, sendo o IMC um bom indicador⁴¹ devido a sua facilidade de cálculo e rapidez. No entanto, seu resultado é pouco sensível, pois não leva em consideração a composição da massa corporal, não sendo um indicador preciso para diagnosticar a obesidade. Esse índice é calculado dividindo-se o peso corporal (kg) pela estatura ao quadrado (m^2). Por este parâmetro é classificado como obeso o indivíduo que apresenta $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$.

O MS³⁹ sugere acrescentar a medida da circunferência da cintura para diagnosticar a obesidade, no qual a OMS¹ estabelece que, valores acima de 94cm para homens e 80cm para mulheres, correspondem ao aumento no risco de síndrome metabólica. Também é possível utilizar as dobras cutâneas para avaliar a gordura corporal, pois é uma técnica simples, de baixo custo e com referências para diversas populações^{42,43}.

Ademais, um método portátil, seguro, não invasivo, de baixo custo e que mede a gordura corporal, mensurando massa magra e massa gorda é a bioimpedância. Esse método consiste na passagem de uma corrente elétrica alternada de baixa intensidade que influi em todo o corpo. Outros métodos como a absorciometria com raios-x de dupla energia (DEXA), pesagem hidrostática, ressonância magnética e tomografia computadorizada, são mais caros, apesar de serem mais complexos e fidedignos trazendo um resultado mais próximo da realidade³⁶.

1.1.2 Fisiopatologia da obesidade

Inúmeros fatores estão envolvidos na etiologia da obesidade, porém todos eles convergem para um ponto: o desequilíbrio energético positivo. As calorias ingeridas diariamente ultrapassam as gastas, sendo o excesso armazenado continuamente no tecido adiposo^{44,45}.

O tecido adiposo humano é subdividido em tecido adiposo marrom, que apresenta função termogênica, e tecido adiposo branco localizado nas regiões subcutânea e visceral, que armazena energia na forma de triglicérides e participa do balanço energético pelos processos de lipogênese e lipólise⁴⁶. Estudos realizados nas últimas décadas comprovaram que o tecido adiposo branco não é somente um tecido inerte responsável pelo armazenamento de gordura, mas ativo metabolicamente, apresentando função endócrina^{47,48}. Esse tecido é capaz de estimular a síntese de uma série de compostos relacionados à regulação metabólica, dentre as quais insulina, leptina, adiponectina e grelina se destacam⁴⁷.

A insulina é um hormônio catabólico produzido pelo pâncreas e possui a função de diminuir os níveis de glicose circulantes no sangue, facilitando assim a absorção deste açúcar pelas células. No entanto, a alta ingestão de glicose leva a hiperinsulinemia, resultando em uma hipersensibilidade que pode levar à sua resistência⁴⁹. A leptina é um hormônio peptídico que exerce papel central na homeostase energética, atua no hipotálamo inibindo a produção de peptídeos orexígenos, bem como estimulando peptídeos anorexígenos, resultando em modulação do apetite e da saciedade. A adiponectina atua de forma favorável sobre o metabolismo da glicose e dos ácidos graxos, além de inibir os receptores Toll-like 4 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como aumentar os níveis de interleucina 10 (IL-10). Vale destacar que, no quadro de obesidade, leptina e insulina estão aumentadas, sendo que os níveis de leptina apresentam relação direta com IMC e adiposidade corporal, enquanto a adiponectina aparece diminuída na obesidade, possivelmente por ação do TNF- α , uma vez que essas moléculas se inibem mutuamente⁵⁰. Por fim, a grelina influencia nos movimentos do trato digestivo, secreção de ácido clorídrico, função pancreática, bem como está diretamente relacionada com o balanço energético. Este hormônio é liberado principalmente pela mucosa estomacal e estimula a ingestão de alimentos, junto com outros peptídeos, como: Neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao gene agouti (AGRP), no qual são estimuladores da ingestão alimentar⁵¹.

Em situações de balanço energético positivo, o excesso de energia é armazenado nos adipócitos na forma de triacilglicerídeos. Os adipócitos maduros presentes no tecido expandem em resposta ao aumento dos lipídios da circulação, processo conhecido como hipertrofia. Além disso, com a necessidade de maior armazenamento, pré-adipócitos presentes no tecido podem se diferenciar em adipócitos maduros, capazes de armazenar gordura promovendo hiperplasia do tecido⁴⁶.

A hiperplasia do tecido adiposo branco juntamente com a hipertrofia dos adipócitos provoca o recrutamento de monócitos e macrófagos, os quais irão contribuir para a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outros fatores inflamatórios⁴⁸. A hipertrofia, relacionada ao aumento do volume da célula adiposa, possui alta correlação com a obesidade, pois ocasiona uma redução no fluxo sanguíneo com consequente hipóxia, infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo⁵². Este estado de hipertrofia culmina num aumento do processo inflamatório crônico de baixa grau⁴⁴. Em consequência desse processo de infiltração de macrófagos, produção aumentada de adipocinas instalação de um processo inflamatório, ocorre a desregulação da secreção de leptina e insulina, agravando a doença e desencadeando comorbidades⁵³.

Os níveis aumentados de adipocinas induzem indiretamente o aumento na geração de espécies reativas, ao oxigênio e ao nitrogênio, através de várias vias de sinalização intracelular e do comprometimento dos receptores de insulina. A infiltração de leucócitos nos tecidos estimulada pelas citocinas inflamatórias também promove geração de EROs por via enzimática, sendo que ambas as vias promovem dano oxidativo^{24,54}. O mecanismo de estresse oxidativo e a sinalização inflamatória não estão apenas interrelacionados, mas seu comprometimento pode levar a uma inibição das respostas a insulina^{24,55}.

O estresse oxidativo é definido classicamente como um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, resultando em produção excessiva de EROs e/ou diminuição das defesas antioxidantes⁵⁶⁻⁵⁸. A mitocôndria é a maior fonte geradora de radicais livres, por meio da cadeia de transporte de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e do oxigênio. A maior taxa de produção de EROs ocorre quando o gradiente de prótons na membrana mitocondrial é alto e o consumo de O₂ via demanda de adenosina trifosfato é baixo, como ocorre nos casos de excesso na ingestão de calorias e baixo gasto energético⁵⁶. O aumento das EROs pode levar à

oxidação de biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA), com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático^{59,60}. A lesão do DNA mitocondrial pelas EROs promove alterações no sistema enzimático levando a disfunção mitocondrial.

Por outro lado, o organismo dispõe de um sistema antioxidante de defesa contra EROs. O funcionamento dos sistemas enzimáticos antioxidantes inclui a ação de algumas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e também a ação de antioxidantes não enzimáticos como glutathione^{57,61}. Vários estudos demonstram que a falha na ação do sistema antioxidante pode ser a causa de muitas doenças inflamatórias^{62,63}. Neste sentido, a suscetibilidade dos indivíduos obesos ao dano oxidativo é aumentada devido à depleção de antioxidantes⁶⁴.

Atualmente, sabe-se que a obesidade não leva apenas a alterações em tecidos periféricos, mas também no SNC⁶⁵⁻⁶⁷. Uma dieta rica em gordura pode levar a obesidade e, conseqüentemente, inflamação crônica periférica, onde há liberação de citocinas. Isto por sua vez tem efeitos deletérios sobre a funcionalidade cerebral, como por exemplo, alteração da BHE e neuroinflamação. A inflamação periférica e aumento de permeabilidade da BHE leva a migração de leucócitos para o cérebro, o que agrava a neuroinflamação⁶⁸.

Células imunitárias periféricas podem ser recrutadas para o SNC de um modo semelhante aos macrófagos recrutados para o tecido adiposo branco na obesidade⁷. Este recrutamento/migração de células imunológicas periféricas para o SNC, pode propiciar a ativação de células gliais, como micróglia e astrócitos, que tem um papel fundamental na resposta inflamatória no SNC^{69,70}. De fato, foi demonstrado que uma alimentação rica em gordura e a obesidade estão associadas com a ativação de micróglia e de astrócitos^{71,72,73}. Esse estado inflamatório está intimamente ligado a ao estresse oxidativo cerebral, considerando que o encéfalo se mostra especialmente vulnerável ao dano oxidativo por conta do seu alto teor de ácidos graxos insaturados facilmente peroxidáveis, alta taxa de consumo de oxigênio, bem como relativa escassez de enzimas antioxidantes em comparação com outros órgãos^{61,62}.

O primeiro local do SNC onde uma resposta altamente reativa pode ser detectada, quando animais são expostos a uma dieta hipercalórica, é uma região cerebral denominada hipotálamo^{71,72}. A resposta é caracterizada

porreatividade glial, secreção de citocinas e aumento de níveis de sinais inflamatórios intracelulares⁶⁸.

O hipotálamo é conhecido por governar diversas atividades metabólicas corporais, incluindo o controle do apetite e gasto energético⁵¹. A homeostase energética envolve uma complexa rede de neurônios hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos que transduzem sinais hormonais, nutricionais e neuronais. Estudos mostraram que nos quadros de obesidade existe uma resistência hipotalâmica aos hormônios adipostáticos (leptina/insulina)^{68,69}, cujos mediadores são induzidos por sinalização inflamatória^{6,70} ou hormonal⁷⁰.

Neste contexto, estudos utilizando dietas hipercalóricas, demonstraram que animais obesos apresentam evidências de inflamação e dano oxidativo no hipotálamo^{57,74,76-78}, hipocampo⁷⁹⁻⁸¹, córtex pré-frontal^{57,78} e estriado⁷⁸. Sugere-se que a inflamação no hipotálamo poderia surgir como consequência da inflamação sistêmica⁷⁴, ou por ação direta dos ácidos graxos livres sobre receptores *Toll-like* 4, expressos nas células microgliais⁷⁷, ou por estresse do retículo endoplasmático⁸², que levam a transcrição de mediadores inflamatórios, culminando com resistência a leptina e/ou insulina. Estudo realizado por Thaler e colaboradores⁷³, identificou que indivíduos obesos apresentam gliose no hipotálamo, semelhante à lesão hipotalâmica observada em roedores expostos a dieta hiperlipídica, sugerindo que possa haver um mecanismo comum de lesão hipotalâmica entre as espécies. Esse estudo sugere que a inflamação hipotalâmica induzida pela dieta hiperlipídica é uma manifestação de lesão neuronal que, por sua vez, desencadeia uma gliose reativa de células microgliais e astrogiais⁷³.

Vale destacar que a resistência à insulina observada na obesidade, induzida por dieta hiperlipídica, em modelos animais, afeta a plasticidade sináptica e a memória^{81,83,84}, promove redução nos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)⁸⁵ e do desempenho cognitivo^{81,84,86} e, consequentemente, prejudica a neurogênese hipocampal^{79,87}. Estudos também mostraram relação entre a obesidade e o sistema de recompensa, destacando anormalidades em regiões como córtex pré-frontal e estriado⁸⁸⁻⁹³. Pacientes obesos podem ser mais sensíveis às propriedades de recompensa do alimento do que às consequências negativas futuras de determinadas escolhas alimentares, tornando-se propensos a comer mais por impulso que pela tomada de decisão⁹⁴.

Diante da complexidade do quadro, o tratamento para obesidade ainda é um desafio, necessitando muitas vezes de intervenção cirúrgica e/ou utilização defarmacoterapia, associada a efeitos adversos significativos, elevado custo e baixa eficácia. Neste contexto, a utilização de produtos naturais como alternativa para o tratamento da obesidade está sendo amplamente explorada.

1.1.3. Tratamento da obesidade

O tratamento da obesidade é complexo e multidisciplinar. A tríade principal do tratamento clínico consiste na instituição de dietas com baixas calorias, atividades físicas e modificações no estilo de vida³⁶. Quando essas medidas não são eficazes, são indicadas dietas mais restritivas, farmacoterapia e/ou procedimentocirúrgico⁹⁵. Vale destacar que a meta terapêutica para perda de peso saudável é de 5 a 10% do peso inicial em 3 a 6 meses, considerando uma perda de no máximo 0,5 kg por semana³⁶.

O tratamento farmacológico é indicado para os pacientes com IMC $>30\text{kg/m}^2$ e para aqueles de IMC entre 27 e $29,9\text{kg/m}^2$ com morbidades associadas que não alcançaram as metas em 6 meses com as modificações comportamentais. O tratamento farmacológico é adjuvante das terapias dirigidas com foco nas modificações dos hábitos de vida. As mudanças de estilo de vida e as técnicas cognitivo-comportamentais são fundamentais neste processo e o tratamento farmacológico não deve ser usado como tratamento na ausência de outras medidas não farmacológicas³⁶.

Existem dois grupos de medicamentos que são indicados para o tratamento farmacológico da obesidade. Os medicamentos para tratamento de longo prazo que incluem orlistate, lorcasserina, sibutramina e liraglutida e o grupo dos fármacos simpatomiméticos indicados para tratamento de curto prazo que incluem dietilpropiona, fentermina, dentre outros⁹⁶.

No Brasil, dos medicamentos indicados para o tratamento da obesidade, estão liberados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comercialização:

- Orlistate: Inibidor de lipases gastrintestinais (GI) que se liga no sítio ativo da enzima através de ligação covalente, fazendo com que cerca de um terço dos triglicérides ingeridos permanecem não digeridos e não sejam absorvidos pelo intestino, sendo eliminados nas fezes. O uso de orlistate foi associado a efeitos

secundários gastrointestinais como esteatorreia, flatus com descarga de gordura e urgência fecal. Pelo seu efeito de causar disabsorção de gorduras, há possibilidade de deficiência de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K)^{36,96}.

- Sibutramina: Bloqueia a recaptção de noradrenalina (NE) e de serotonina (SE) e leva a redução da ingesta de alimentos. O uso da sibutramina está associado à elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca, sendo contraindicado para diabéticos e pacientes com doenças cerebrovasculares e cardiovasculares^{36,96}.

- Liraglutida: Agonista do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) tem uma ação hipotalâmica em neurônios envolvidos no balanço energético, em centros ligados ao prazer e recompensa e uma ação menor na velocidade de esvaziamento gástrico. Como efeitos adversos foram relatados náuseas, vômitos e diarreia^{36,96}.

- Lorcasserina: Inibidor seletivo dos receptores de serotonina-2C, reduzindo a ingestão de alimentos. Efeitos adversos mais comuns em ensaios clínicos foram dor de cabeça, náusea, tontura, fadiga, boca seca e constipação. Lorcasserina parece ser uma opção segura e tolerável para o tratamento da obesidade, embora a magnitude de sua perda de peso seja modesta⁹⁶.

Além destes, outros medicamentos apresentam evidências científicas de potencial benefício no tratamento da obesidade, como fluoxetina, topiramato, fentermina, associação de bupropiona e naltrexona e dimesilato de lisdexanfetamina³⁶.

A descoberta da relação entre a obesidade e inflamação crônica nos tecidos metabólicos abriu um novo campo de pesquisa relacionado aos mecanismos inflamatórios na obesidade⁵³, possibilitando a investigação dos benefícios de novas terapias coadjuvantes. Neste sentido, a utilização de fitoterápicos pode ser uma estratégia interessante.

1.1.4 Produtos fitoterápicos

O fitoterápico provém de uma planta medicinal, ou seja, de uma espécie vegetal utilizada com propósitos terapêuticos. Sendo assim, o fitoterápico é o produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, que apresenta finalidade profilática, curativa ou paliativa. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais empregando-

se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco)¹⁸.

Os fitoterápicos devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etno/farmacológicos, documentações tecno/científicas em bibliografia ou publicações indexadas ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade¹⁸.

Segundo estimativa da OMS, 80% da população de países em desenvolvimento utilizam-se de práticas tradicionais na atenção primária à saúde, e deste total, 85% utilizam plantas medicinais⁹⁷. No Brasil as práticas integrativas e complementares, incluindo a Fitoterapia estão em expansão, existindo em todas as regiões do país diversos programas de Fitoterapia implantados ou em fase de implantação⁹⁸.

Neste sentido, desde o início da história da humanidade, há relatos da utilização de plantas para diversas finalidades, entre elas o alívio de dores. Algumas espécies vegetais também têm sido cada vez mais procuradas para terapêuticas que têm por finalidade a redução de peso⁹⁹. Em revisão bibliográfica realizada por Manenti(2010)¹² foram identificadas 59 plantas com indicação de benefícios sobre a obesidade, cujos mecanismos fisiológicos descritos estavam relacionados à inibição das lipases, ação termogênica e ação redutora do apetite ou aumento da saciedade¹².

Entre as plantas com ação terapêutica na obesidade, a *Cynara scolymus*, conhecida popularmente como alcachofra^{18,19}, poderia mostrar benefícios como terapia adjuvante, reduzindo a neuroinflamação associada a obesidade, uma vez que além da inibição da lipase pancreática¹⁷, mostra propriedades antioxidantes²⁵ e anti-inflamatórias²⁸.

1.1.4.2 *Cynarascolymus* (Alcachofra)

A alcachofra é uma planta nativa da região do mediterrâneo, também encontrada em alguns países europeus, pertencente à família

Asteraceae, considerada uma planta perene, própria de climas temperados-quentes. Os principais componentes ativos da planta são ácidos fenólicos (incluindo cinarina, CA e CGA), flavonóides (incluindo luteolina e derivados glicosídicos) e lactonassessquiterpênicas (incluindo cinaropicrina)¹⁰⁰.

Tradicionalmente, a alcachofra possui indicações antieméticas, antihepatotóxica e diurética¹⁰⁰. Também tem sido utilizado como colerético e colagogo, para doenças na vesícula biliar, náusea e como adjuvante para uma dieta de baixo teor de gordura no tratamento da hiperlipidemia leve a moderada¹⁰¹. De acordo com European Union Herbal Monograph, a alcachofra pode ser utilizada em forma de chás ou em formas de extrato concentrado, em disfunções gastrointestinais e como dispéptico¹⁰².

Entretanto, vários estudos têm demonstrado outras propriedades medicinais da alcachofra. Pesquisas farmacológicas pré-clínicas indicaram que a alcachofra possui, entre outros, propriedades antioxidantes^{24,25,29,103-105} e hipocolesterolêmica^{24,105,106}. Além disso, pesquisas com extrato de alcachofra mostraram também efeito anti-inflamatório em estudos *in vitro*²⁹ e *in vivo*^{24,28}.

Em humanos, foi realizada uma pesquisa avaliando extrato de alcachofra sobre o metabolismo em indivíduos com sobrepeso e glicemia elevada em jejum. Em comparação com o placebo, o grupo suplementado com extrato de alcachofra (600 mg/dia por 8 semanas) mostrou diminuição significativa na glicemia de jejum, e no perfil lipídico sobre o colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL). Estes dados demonstram a eficácia do extrato de alcachofra sobre a redução dos parâmetros glicometabólicos em indivíduos com excesso de peso e com glicemia elevada em jejum¹⁰⁷. Em estudo realizado por Englisch e colaboradores¹⁰⁸ com a utilização de extrato seco de alcachofra 1800 mg/dia por 6 semanas, os autores também observaram diminuição do colesterol total, fração LDL e melhora na relação LDL/HDL (lipoproteína de baixa densidade) nos indivíduos tratados quando comparados aos que receberam placebo. Outra investigação clínica em indivíduos com esteatose hepática não alcoólica mostrou que a suplementação com extrato de folhas de alcachofra, 600 mg/dia pelo período de 2 meses, teve efeito hepatoprotetor, promoveu redução do colesterol total, LDL e triglicerídeos¹⁰⁴. Em revisão sobre os benefícios dos extratos de alcachofra realizada por Salem e colaboradores²⁷ os autores concluíram que é um dos medicamentos fitoterápicos mais seguros, com quase nenhum efeito adverso na maioria dos indivíduos.

As folhas de alcachofra foram estudadas extensivamente e foram identificadas como ricas fontes de compostos polifenólicos, incluindo CGA e os isômeros 1,3-, 3,4- e 4,5-di-O-ácido cafeoilquínico, ácido felúrico, CA e ácidoquínico^{105,109}. Os polifenóis constituem uma classe de produtos fenólicos presentes na natureza e encontram-se disponíveis nos frutos, vegetais, sementes, flores e cascas. Nos últimos anos tem sido motivo de muitos estudos, pois foram identificados como compostos que trazem algum benefício à saúde, desde a prevenção à cárie até ao câncer.

Muito se tem dito a respeito da funcionalidade dos polifenóis que apresentam características anti-carcinogênicas, anti-aterogênicas, anti-trombóticas, anti-microbianas, vasodilatadora e analgésica¹¹⁰. O nome polifenóis vem da nomenclatura poli que quer dizer muitos e de fenol que é um composto químico. O fenol é constituído por um anel aromático ligado a um grupo hidroxila (OH). Um polifenol é uma estrutura que apresenta mais de um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel. Esta classe de produtos é uma das que apresenta o maior grupo de substâncias conhecidas no reino vegetal^{110,111}.

O CA é um composto fenólico amplamente encontrado em plantas medicinais, incluindo frutas, vegetais, vinho, café e azeite, entre outros, e, portanto, está presente no plasma humano em uma concentração diretamente dependente da dieta. O CA é um composto intrigante porque possui várias atividades farmacológicas, incluindo ação antioxidante, agente quelante de metais, anti-hipertensiva, antifibrose, antiviral, antineoplásico, antidepressivo, potentes propriedades anti-inflamatórias e antidiabéticas¹¹². Além disso, efeito neuroprotetivo do CA também foi sugerido em estudos, possivelmente devido à ação antiinflamatória e antioxidante no SNC^{30,113}.

Em estudo realizado com ratos o CA mostrou efeito anti-inflamatório no tecido cerebral e medula espinhal inibindo a produção de EROs, pela supressão da ativação transcricional do fator nuclear kappa B (NF-kB), e inibindo a atividade catalítica da óxido nítrico sintase induzida em modelo experimental de encefalomielite autoimune¹¹⁴. Estudos em modelos murinos mostraram que a administração oral e intraperitoneal de CA promoveu atividade neuroprotetora em animais submetidos a dano cerebral, o mecanismo sugerido está relacionado a inibição da 5-lipoxigenase e as propriedades antiinflamatórias e antioxidantes^{30,113}. A administração oral de 30 mg/Kg de CA em camundongos 1 hora antes dos mesmos

serem submetidos a administração de Lipopolissacarídeos (LPS) promoveu diminuição dos níveis de citocinas (TNF- α e Interleucina-6) e de marcadores de estresse oxidativo no tecido cerebral dos animais¹¹⁵.

Outro polifenol presente na alcachofra é o CGA ao qual é atribuído papel terapêutico, como antioxidante, hepatoprotetor, cardioprotetor, anti-inflamatório, antipirético, neuroprotetor, anti-obesidade, antiviral, antimicrobiano, anti-hipertensivo, eliminador de radicais livres e estimulador do SNC¹¹⁶.

Em pesquisa realizada com camundongos o CGA conseguiu reduzir significativamente o peso corporal, bem como o tecido adiposo do epidídimo e perirrenal nos animais alimentados com dieta rica em gordura. Os animais tratados com CGA, mostraram menores concentrações de leptina e insulina plasmáticas e aumento da concentração de adiponectina. Além disso, as concentrações de triglicerídeos, colesterol total e ácidos graxos livres também estavam menores que nos ratos não tratados. Por fim, a suplementação de CGA aumentou significativamente a proporção da HDL no colesterol total¹¹⁷. Estas características hipolipemiantes podem ser explicadas bioquimicamente devido ao CGA reduzir a atividade das enzimas como a ácido graxo sintase, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-Coenzima-A redutase e da acil-Coenzima-A colesterol aciltransferase. Assim, o CGA inibe a síntese de ácidos graxos e de colesterol e estimula a oxidação dos ácidos graxos no fígado^{116,118,119}. Estudos mostraram ainda, que o CGA pode modular o metabolismo lipídico e da glicose em distúrbios relacionados com o metabolismo, como síndrome metabólica, diabetes *mellitus* tipo 2, esteatose hepática não alcoólica, doenças cardiovasculares e obesidade²⁶.

Os CGA possuem ação sobre o metabolismo energético, e como este metabolismo e o sono são controlados por fatores regulatórios comuns, acredita-se que o consumo de CGA possa ter uma capacidade modulatória do sono. Foi verificado que o consumo de CGA encurtou a latência do sono, aumentou a oxidação de gordura sem afetar o gasto energético e sem afetar negativamente a qualidade do sono⁸⁵.

Em estudo com modelo animal de controle de amnésia com escopolamina, os autores observaram que o CGA inibiu a atividade da enzima acetilcolinesterase e reduziu os níveis de malondialdeído no hipocampo e córtex pré-frontal, sugerindo atividade antiamnésica¹²⁰. Atuando sobre a transmissão da serotonina, os CGAs também demonstraram exercer efeitos antidepressivos significativos, em modelo

animal¹²¹. Em outro estudo exploratório observou-se que bebidas ricas em CGAs (540 mg) exerceram efeitos sobre o humor, incluindo maior atenção e diminuição de dores de cabeça e fadiga mental¹²². Os CGAs apresentaram efeitos anti-inflamatórios no SNC através da inibição significativa da concentração de mRNA e a diminuição da produção de TNF e IL-6 na micróglia³⁰.Dentre as ações do CGA no SNC, podemos citar ainda melhoria da SOD, CAT e glutathione peroxidase (GPx) no cótex cerebral de camundongos. Também a diminuição dos níveis de substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo e cótex cerebral em camundongos¹²³.

Embora seja assumido que a transferência de polifenóis através da BHE é limitada, um número considerável de publicações confirma a presença de compostos de ácido fenólico absorvidos no cérebro.

Considerando que a obesidade é uma doença inflamatória crônica de baixo grau e que uma inflamação leva ao processo de estresse oxidativo, podendo comprometer o desenvolvimento celular, levando à morte dessas células devido a peroxidação lipídica e/ou carbonilação proteica, a alcachofra possui compostos com capacidade antioxidante e antiinflamatória capaz de reverter a lesão encontrada na obesidade, agindo diretamente na redução do estresse oxidativo. Perante a isto, o extrato de alcachofra poderá ter participação na melhora do quadro de obesidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato de alcachofra sobre parâmetros neuroinflamatórios e neuroquímicos em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar o consumo alimentar, o peso corporal e o peso da gordura mesentérica em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica e tratados com extrato de alcachofra;
- ✓ Verificar os níveis de TNF- α , Interleucina-1 β e IL-10 no hipotálamo, hipocampo, córtex, pré-frontal e estriado em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica e tratados com extrato de alcachofra;
- ✓ Mensurar os níveis de 2,7-diclorofluoresceína (DCF) e óxido nítrico (NO) no hipotálamo, hipocampo, córtex, pré-frontal e estriado em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica e tratados com extrato de alcachofra;

- ✓ Avaliar o dano oxidativo a proteínas, através de carbonilação de proteínas e formação de sulfidrilas, no hipotálamo, hipocampo, córtex, pré-frontal e estriado em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica e tratados com extrato de alcachofra;
- ✓ Quantificar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e os níveis de glutathione (GSH) no hipotálamo, hipocampo, córtex, pré-frontal e estriado em camundongos submetidos à obesidade induzida por dieta hiperlipídica e tratados com extrato de alcachofra.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental com modelo animal de obesidade induzido pelo consumo de dieta hiperlipídica.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 80 camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com 40 dias de idade, pesando inicialmente entre 30-40g. Os animais foram obtidos junto ao Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os camundongos tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12 horas cada e temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

3.3.1 Preparo do extrato de alcachofra

Folhas secas de *Cynara scolymus* foram mantidas em maceração com água na relação planta:solvente 1:10 por 48 horas. O extrato foi filtrado e o solvente retirado por liofilização. O extrato bruto obtido foi novamente mantido em maceração com etanol por 24 horas, filtrado e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida a temperatura de 40 graus Celsius.

A presença dos compostos ativos, CGA e AC no extrato de alcachofra foi verificada por Cromatografia de Camada Delgada. Foram preparadas soluções de extrato de alcachofra, CGA (Sigma Aldrich, USA), AC (Sigma Aldrich, USA) e luteolina (Sigma Aldrich, USA) na concentração de 1 mg/mL em metanol. Amostra de 20 microlitros foi aplicada em cromatoplasas de sílica gel 60 F254. A corrida foi realizada utilizando fase móvel produzida com 25mL de acetato de etila, 2,75mL de ácido fórmico, 2,75mL de ácido acético e 6,75mL de água destilada. A placa foi colocada em cuba cromatográfica e as amostras foram eluídas por 7 cm. A placa foi revelada com reagente natural A e após seca, o cromatograma foi visualizado na câmara com luz ultravioleta¹²⁴. Extrato na concentração de 370g por ml foi administrado nos animais.

3.3.2 Desenho experimental

O objetivo deste estudo foi induzir um quadro de obesidade em camundongos – a partir do consumo de dieta hiperlipídica por 10 semanas – e avaliar o efeito da administração do extrato de alcachofra (4 semanas de tratamento). Inicialmente os animais foram pesados e pareados em 2 grupos de igual número:

- Dieta normolipídica (grupo controle; n=40);
- Dieta hiperlipídica (grupo obeso; n=40).

Os camundongos foram mantidos neste regime por 10 semanas, bem como foram pesados semanalmente. A ração dos animais foi adquirida de empresa especializada em desenvolvimento e produção de dietas padronizadas para experimentação animal (PragSoluções Biociências – PragSoluções Comércio e Serviços Ltda – ME). A dieta hiperlipídica forneceu mais calorias e maior percentual de gordura saturada que a dieta normolipídica. O percentual de gordura saturada em torno de 60% na dieta hiperlipídica é preconizado para a indução da obesidade em camundongos⁷⁶.

Após 6 semanas de protocolo de dieta, o peso corporal foi aferido e verificado se havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Após confirmada a diferença, os camundongos foram pareados em grupos para o tratamento com extrato de alcachofra, nos seguintes regimes, onde foram mantidos por 4 semanas:

- Dieta normolipídica + salina (n=20);
- Dieta normolipídica + extrato de alcachofra (n=20);
- Dieta hiperlipídica + salina (n=20);
- Dieta hiperlipídica + extrato de alcachofra (n=20).

Os animais receberam, uma vez ao dia, por 4 semanas, administração oral, por gavagem, de água ou extrato de alcachofra 1,6g/kg¹¹³. Durante este período de 4 semanas, os animais continuarão sendo pesados semanalmente e o consumo alimentar mensurado. O procedimento esquematizado, segue na figura 01:

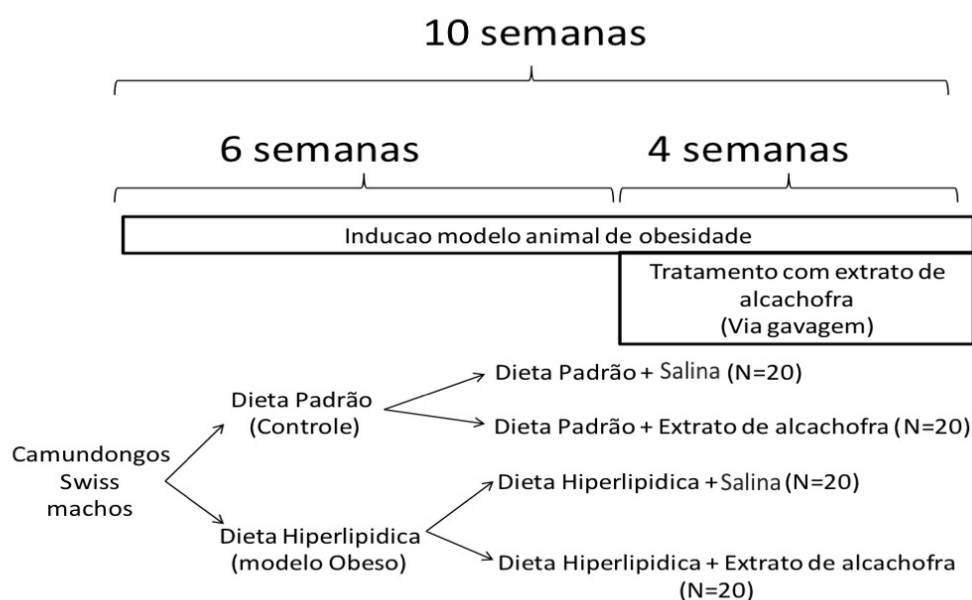


Figura 01 – Desenho experimental

Após este período, quando o experimento completou 10 semanas, os animais foram pesados e submetidos a morte incolor assistida. O método físico para a morte dos animais (decapitação) se justifica pelo fato de que os métodos químicos interferem nas análises neuroquímicas que foram realizadas e podem, portanto, invalidar o estudo¹²⁵.

3.3.3 Remoção dos tecidos

Após a morte dos animais, a cavidade abdominal foi aberta e o tecido adiposo da região mesentérica foi retirado, lavado e pesado em balança de alta precisão. O cérebro dos animais também foi rapidamente removido e o hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado isolados e, posteriormente, acondicionados em tubos tipo eppendorf e armazenados em ultrafreezer (-80°C) para posterior análise.

3.3.4 Preparo do material biológico para as análises de parâmetros inflamatórios e bioquímicos

No momento das análises bioquímicas e inflamatórias, as estruturas cerebrais foram descongeladas e homogeneizadas em solução tampão com posterior centrifugação para coleta do sobrenadante que foi utilizado nas avaliações laboratoriais.

3.4. PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E BIOQUÍMICOS

3.4.1 Parâmetros de inflamação

Os níveis dos marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-10 nas estruturas cerebrais foram determinados pela técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) em leitor de microplacas com a utilização de kits comerciais (R&D Systems, Minneapolis, MN), seguindo as recomendações do fabricante. O princípio da técnica se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas.

3.4.2 Parâmetros de dano oxidativo

A produção intracelular de ERO foi avaliada utilizando o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA)¹²⁶. O DCFH (subproduto) é uma técnica bastante utilizada como meio de detecção da produção de radicais livres totais. A oxidação do 2'7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) pelas células causa a fluorescência da difluoresceína que pode facilmente ser lida em fluorímetro. Neste ensaio, 100 μ L de água e 75 μ L de DCFH-DA foram adicionadas a 25 μ L de homogeneizado de amostra, homogeneizados em vórtex e levados ao banho-maria

37°C ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde foi utilizado como padrão o DCFH-DA 0,1 µM diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. As amostras e a curva de calibração foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos foram feitas as leituras no fluorímetro (525 nm excitação e 488 nm de emissão). Os resultados foram expressos em nmol de DCF por mg de proteínas¹²⁶.

A presença de espécies reativas ao nitrogênio foi avaliada pela concentração de nitrito/nitrato analisada espectrofotometricamente usando reagentes de Griess (sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e dicloridrato de N - 1-naftiletilenodiamina a 0,1% em H₂O bi-destilada) e cloreto de vanádio (III) como descrito anteriormente¹²⁷. Uma curva padrão foi executada simultaneamente com cada conjunto de amostras e a densidade óptica a 550 nm (OD550) foi medida usando um leitor de microplacas ELISA.

O dano oxidativo em proteínas foi avaliado pela determinação de grupamentos carbonilas em proteínas oxidadas, com base na reação com dinitrofenilhidrazina, conforme método descrito por Levine et al.¹²⁸. As amostras obtidas serão precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilhidrazina. Os grupamentos carbonilas serão medidos pela absorbância em 370nm. Os resultados serão expressos por carbonilação por mg de proteínas. As análises de TBARS e carbonil serão normalizadas pelo conteúdo de proteínas, que serão determinadas pelo método de Lowry¹²⁹. Reagente fenol de Folin será adicionado a amostras de tecido, sua principal função é ligar-se a proteínas, onde é posteriormente reduzido. A alteração de cor resultante a partir de amarelo para azul, pode ser seguido através da medição da absorbância a 700nm. Albumina de soro bovino será utilizada como padrão de proteínas¹²⁹.

3.4.3 Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da enzima antioxidante SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente, conforme descrito por Bannister e Calabrese (1987)¹³⁰.

As amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15µL foram retirados da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/ml de água destilada), tampão de glicina 175-185 mL (0,75g em

200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5µL adrenalina (60 mM em água destilada +15 mL/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976)¹³¹, com algumas adaptações. GSH foi mensurado após precipitação de proteína com 1 mL de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e DTNB 500 µM. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras. A GSSG foi mensurada a partir da reciclagem da GSSG redutase com monitoramento NADPH espectrofotometricamente na presença de 2-vinilpyridina. A concentração de GSH total e GSSG foram determinadas usando uma curva de regressão gerada a partir de vários padrões de GSH¹³².

Todas as análises de atividade de enzimas antioxidantes serão normalizadas pelo conteúdo de proteínas, que serão determinadas pelo método de Lowry et al.¹²⁹.

3.5.PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico *GraphPadPrism* (versão 6). As análises entre dois grupos foram determinadas pelo teste t de student e as diferenças entre três grupos experimentais ou mais foram determinadas por análise de variância (ANOVA) seguido pelo *post hoc* de Tukey. Os resultados foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão e a significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), sob o seguinte protocolo: 19.001.2.08.IV. A utilização dos animais seguiu a Diretriz Brasileira para o

Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), publicada em 2013 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4. ARTIGO

***Cynara scolymus* L. (artichoke) leaf extract decrease neuroinflammatory and neurochemical parameters in a mouse model of diet-induced obesity.**

Alexandre Piccinini¹; Gislaine Tezza Rezzin¹.

¹*Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Av. José Acácio Moreira, 787, Tubarão, SC 88704-900, Brazil*

Abstract

The aim of this study was to induce obesity in mice from a high-fat diet and to evaluate the effect of administration *Cynara scolymus* (artichoke) leaf extract. Inflammatory parameters and oxidative stress in the brain of mice were evaluated, as well body weight and visceral fat weight. Male Swiss mice were divided into control (purified low-fat diet) and obese (purified high-fat diet). After 6 weeks, the groups were divided into control + water, control + artichoke leaf extract, obese + water, and obese + artichoke leaf extract. Artichoke leaf extract (1,6 g/kg/day) or saline solution

was administrated orally, during 4 weeks. When the experiment completed 10 weeks, the animals were euthanized and the brain and visceral fat were removed. The brain structures (hypothalamus, hippocampus, prefrontal, total cortex and striatum) were isolated. Treatment with artichoke leaf extract had no effect on body weight, but reduced the visceral fat. Obese animals showed increased inflammation and oxidative damage as well increased antioxidant enzymes activity in the brain structures. Artichoke leaf extract treatment partially reversed the changes in the inflammatory and in the oxidative damage parameters and attenuated the alterations in the antioxidant defense. Artichoke leaf extract had a beneficial effect on the brain of obese animals, as it partially reversed the changes caused by the consumption of a high-fat diet and consequent obesity. Our results support studies that indicate artichoke leaf extract may contribute to obesity treatment.

Key-words: Obesity; *Cynara scolymus* leaf extract; oxidative stress; inflammation.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A administração de extrato de alcachofra mostrou-se benéfica no tratamento dos camundongos obesos, pois mesmo não tendo efeito sobre o peso corporal dos animais, reduziu a gordura visceral, que é um fator de risco importante para diabetes, hipertensão, síndrome metabólica, problemas cardiovasculares, dentre outros.

O tratamento com extrato de alcachofra também reverteu parcialmente as alterações nos parâmetros inflamatório e oxidativo e atenuou as alterações na defesa antioxidante, o que poderia reduzir os danos neuronais associados a obesidade. Efeito anti-inflamatório e antioxidante mais pronunciados foram observados no estriado e hipotálamo, regiões cerebrais associadas a saciedade e sistema de recompensa. Possivelmente esses efeitos estejam relacionados ao ácido clorogênico, ácido fenólico presente em maior proporção no extrato utilizado nesse estudo e que apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

Os benefícios da utilização do extrato de alcachofra podem ser melhor investigados, podendo-se utilizar diferentes concentrações do extrato para tentar melhorar os efeitos, principalmente sobre parâmetros neuroinflamatórios. A quantificação dos compostos ativos presentes no SNC após administração oral poderia auxiliar na determinação de doses mais efetivas. A incorporação do extrato

de alcachofra a formas farmacêuticas que melhorem a biodisponibilidade dos princípios ativos no SCN também pode ser avaliada. Além de parâmetros neuroquímicos e neuroinflamatórios, os benefícios do uso do extrato da alcachofra sobre parâmetros comportamentais poderia também ser investigado.

REFERÊNCIAS

1. WHO, World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 18 nov. 2019.
2. Knight JA. Diseases and disorders associated with excess body weight. *Annals of clinical and laboratory science*. 2011; 41(2): 107–21.
3. Cancellato R, Clément K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*. 2006;113(10):1141–1147.
4. de Mello AH, Souza Lda R, Cereja AC, et al. Effect of subchronic administration of agomelatine on brain energy metabolism and oxidative stress parameters in rats. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2016;70(4):159–166.
5. Ohashi K, Shibata R, Murohara T, Ouchi N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 2014; 25(7):348–55.
6. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005; 146(10):4192–4199.
7. Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun*. 2014;35:33–42.
8. Cooney SJ, Bermudez-Sabogal SL, Byrnes KR. Cellular and temporal expression of NADPH oxidase (NOX) isoforms after brain injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2013; 10(1):17.
9. Fortes RC, Guimarães NG, Haack A, Torres AAL, Carvalho KMB. Orlistat e sibutramina : bons coadjuvantes para perda e manutenção de peso? *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*. 2006;21(3): 244–51.
10. Paumgarten FJR. Tratamento farmacológico da obesidade: a perspectiva da saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*. 2011; 27(3):404.
11. Pucci A, Finer N. New medications for treatment of obesity: metabolic and cardiovascular effects. *Can J Cardiol*. 2015; 31(2):142–152.
12. Manenti AV. Plantas Medicinais Utilizadas No Tratamento Da Obesidade: Uma Revisão. [TCC]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense 2010.
13. da Rocha Brito AG, de Freitas CL, Galvão RC, et al. Fitoterapia: uma Alternativa Terapêutica para o Cuidado em Enfermagem - Relato de Experiência. *Biota Amazônia*. 2014;4(4):15–20.
14. Mattos MIS. Avaliação dos potenciais efeitos de toxicidade sub-aguda, teratogenicidade e imunotoxicidade da *Cynara scolymus* (alcachofra): estudo em ratos. [tese]. São Paulo. Universidade de São Paulo, 2014.
15. Corrêa ECM, Dos santos JM, Ribeiro PLB. Uso de fitoterápicos no tratamento da obesidade: uma revisão bibliográfica. [dissertação]. Goiânia: Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2012.
16. Rondanelli M, Giacosa A, Orsini F, Opizzi A, Villani S. Appetite control and glycaemia reduction in overweight subjects treated with a combination of two highly standardized extracts from *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus*. *Phytother Res*. 2011; 25(9):1275–1282.
17. Souza SP, Pereira LLS, Souza AA, Santos CD. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. *Rev. bras. plantas med*. 2012; 14(4):643-8.
18. ANVISA. Memento Fitoterápico. 2016: 113.

19. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
20. Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(3):937–943.
21. Huang K, Liang XC, Zhong YL, He WY, Wang Z. 5-Caffeoylquinic acid decreases diet-induced obesity in rats by modulating PPAR α and LX α transcription. *J Sci Food Agric.* 2015;95(9):1903–1910.
22. Jin S, Chang C, Zhang L, Liu Y, Huang X, Chen Z. Chlorogenic acid improves late diabetes through adiponectin receptor signaling pathways in db/db mice. *PLoS One.* 2015; 10(4):e0120842.
23. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed Pharmacother.* 2018; 97:67–74.
24. Ben Salem M, Affes H, Athmouni K, et al. Chemicals Compositions, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Cynara scolymus* Leaves Extracts, and Analysis of Major Bioactive Polyphenols by HPLC. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017; 2017:4951937.
25. Gebhardt R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 144(2):279–286.
26. Gebhardt R. Prevention of tauroolithocholate-induced hepatic bile canalicular distortions by HPLC-characterized extracts of artichoke (*Cynara scolymus*) leaves. *Planta Med.* 2002; 68(9):776–779.
27. Ben Salem M, Affes H, Ksouda K, et al. Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2015;70(4):441–453.
28. Yasukawa K, Matsubara H, Sano Y. Inhibitory effect of the flowers of artichoke (*Cynara cardunculus*) on TPA-induced inflammation and tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *J Nat Med.* 2010; 64(3):388–391.
29. Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Naruszewicz M, Siennicka A, Krasnodebska B, Kołodziej B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sci.* 2002;71(24):2897–2898.
30. Liang G, Shi B, Luo W, Yang J. The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Behav Brain Funct.* 2015;11:18.
31. Barroso TA, Marins LB, Alves R et al. Association of Central Obesity with The Incidence of Cardiovascular Diseases and Risk Factors. *International Journal of Cardiovascular Sciences.* 2017; 30(5):416-24
32. Almeida LM, Campos KFC, Randow R et al. Estratégias e desafios da gestão da Atenção Primária à saúde no controle e prevenção da obesidade. *Rev. Gestão & Saúde (Brasília).* 2017; 8(1):114-39.
33. Hruby AE, Frank BH. A Epidemiologia da Obesidade: Um Grande Quadro. *Pharmaco Economics.* 2015; 33:673–89.
34. Popkin BM. Nutrition Transition and the Global Diabetes Epidemic. *Curr Diab Rep.* 2015; 15(9):64.
35. Gregg E, Shaw J. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med* 2017; 377:13-27.

36. ABESO. A visão distorcida e o preconceito em relação a remédios para emagrecer. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/artigos>. Acessado em: 19 de novembro de 2019.
37. IBGE. pesquisa orçamentaria familiar. 2018. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/8cfb31944ce83176b89b588ce541252e.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2019.
38. ABESO. Mapa da Obesidade 2019. Associação Brasileira de estudos sobre a Obesidade e Síndrome Metabólica, 2019.
39. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de SaúdeBrasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão. Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiro. 2019. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2011_fatores_risco_doencas_cronicas.pdf>.
40. Pesquisa Nacional de Saúde - PNS | IBGE. 2013. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/saude/9160-pesquisa-nacional-de-saude.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 17 maio 2019.
41. Mancini MC. Associação Brasileira para Estudo da Obesidade: Diretrizes brasileiras de obesidade. 2016:7–186.
42. Mancini MC, et al. Tratado de Obesidade, Segunda Edição – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2015:239-49.
43. Souza IL, Guedes EP, Benchimol AK. Definições antropométricas da obesidade. *Guanabara Koogan*, 2015.
44. Leite LD, Rocha EDM, Brandão-Neto J. Obesidade: uma doença inflamatória. *Ciência & Saúde*. 2009; 2(2):85–95.
45. Mattes RD. Energy intake and obesity: Ingestive frequency outweighs portion size. *Physiology & Behavior*. 2014; 134:110–18.
46. Roman S, Agil A, Peran M, et al. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl Res*. 2015; 165(4):464–479.
47. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*. 2013;9(2):191–200.
48. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 316(2):129–139.
49. Caron A, Richard D. Neuronal systems and circuits involved in the control of food intake and adaptive thermogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2017; 1391(1):35–53.
50. Godoy-Matos AF. The role of glucagon on type 2 diabetes at a glance. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):91.
51. Damiani D, Damiani D. Sinalização cerebral do apetite. *Rev Bras Clin Med*. 2011; 9(2):138–45.
52. Queiroz JCF, Alonso-Vale MIC, Curi R; Lima FB. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(5):582-94.
53. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415–445.
54. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(3):400–418.
55. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem*. 2012;68(4):701–711.
56. Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of

- oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(5):445–456.
57. Maciejczyk M, Żebrowska E, Zalewska A, Chabowski A. Redox Balance, Antioxidant Defense, and Oxidative Damage in the Hypothalamus and Cerebral Cortex of Rats with High Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:6940515.
 58. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2014; 16(1):378–400.
 59. Lipchock JM, Hendrickson HP, Douglas BB, et al. Characterization of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibition by Chlorogenic Acid and Cichoric Acid. *Biochemistry*. 2017; 56(1):96–106.
 60. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1762(2):164–180.
 61. Lowe MT, Kim EH, Faull RL, Christie DL, Waldvogel HJ. Dissociated expression of mitochondrial and cytosolic creatine kinases in the human brain: a new perspective on the role of creatine in brain energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(8):1295–1306.
 62. Dickinson CJ. Cerebral oxidative metabolism in hypertension. *Clinical Science*. 1996; 91(5):539–50.
 63. Nunomura A, Honda K, Takeda A, et al. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006(3):82323.
 64. Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women? *ARYA Atherosclerosis*. 2007; 2(4):189–92.
 65. Cai D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(1):40–47.
 66. Convit A. Obesity is associated with structural and functional brain abnormalities: where do we go from here?. *Psychosom Med*. 2012; 74(7): 673–674.
 67. Shefer G, Marcus Y, Stern N. Is obesity a brain disease?. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(10 Pt 2):2489–2503.
 68. Mauro C, De Rosa V, Marelli-Berg F, Solito E. Metabolic syndrome and the immunological affair with the blood-brain barrier. *Front Immunol*. 2015;5:677.
 69. Kälén S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi CX. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(6):339–351.
 70. Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2014;42:10–21.
 71. Argente-Arizón P, Freire-Regatillo A, Argente J, Chowen JA. Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:42.
 72. Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J Neurochem*. 2012;120(6):1060–1071.
 73. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2012;122(1):153–162.
 74. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35(12):1455–1465.
 75. Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*. 2012;821:421–433.
 76. de Bona Schraiber R, de Mello AH, Garcez ML, et al. Diet-induced obesity causes hypothalamic neurochemistry alterations in Swiss mice. *Metab Brain Dis*.

- 2019; 34(2):565–573.
77. Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 2009; 29(2):359–370.
 78. Souza LR. Avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em cérebros de camundongos após indução de obesidade.[dissertação]. Tubarão: Universidade do Sul de Santa Catarina; 2016.
 79. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol*. 2006;13(12):1385–1388.
 80. Stranahan AM. Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience*. 2015;309:125–139.
 81. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*. 2008; 18(11):1085–1088.
 82. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008; 135(1):61–73.
 83. Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, et al. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis*. 2014;67:79–87.
 84. Hwang LL, Wang CH, Li TL, et al. Sex differences in high-fat diet-induced obesity, metabolic alterations and learning, and synaptic plasticity deficits in mice. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(3):463–469.
 85. Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*. 2010;482(3):235–239.
 86. Porter DW, Kerr BD, Flatt PR, Holscher C, Gault VA. Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycaemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12(10):891–899.
 87. Qin LQ, Xun P, Bujnowski D, et al. Higher branched-chain amino acid intake is associated with a lower prevalence of being overweight or obese in middle-aged East Asian and Western adults. *J Nutr*. 2011; 141(2):249–254.
 88. Farr OM, Li CR, Mantzoros CS. Central nervous system regulation of eating: Insights from human brain imaging. *Metabolism*. 2016;65(5):699–713.
 89. García-García I, Horstmann A, Jurado MA, et al. Reward processing in obesity, substance addiction and non-substance addiction. *Obes Rev*. 2014; 15(11):853–869.
 90. Murray S, Tulloch A, Gold MS, Avena NM. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(9):540–552.
 91. Nummenmaa L, Hirvonen J, Hannukainen JC, et al. Dorsal striatum and its limbic connectivity mediate abnormal anticipatory reward processing in obesity. *PLoS One*. 2012;7(2):e31089.
 92. Stice E, Figlewicz DP, Gosnell BA, Levine AS, Pratt WE. The contribution of brain reward circuits to the obesity epidemic. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(9 Pt A):2047–58.
 93. Tomasi D, Volkow ND. Striatocortical pathway dysfunction in addiction and obesity: Differences and similarities. *Critical Reviews in Biochemistry and*

- Molecular Biology. 2013;48(1):1–19.
94. Landeiro FM, Quarantini LDC. Obesidade: Controle Neural e Hormonal do Comportamento Alimentar. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2011; 10(3):236.
 95. Bluher M. Konservative Therapie der Adipositas – wann und wie? *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2015; 140(1):24–8.
 96. Bray GA, Ryan DH. Update on obesity pharmacotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014; 1311:1–13.
 97. Da Rosa C, Câmara SG, Béria JU. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. *Ciencia e Saude Coletiva*. 2011; 16:311–18.
 98. Ibiapina WV, Leitão BP, Batista MM, Pinto DS. Inserção da Fitoterapia na Atenção Primária aos Usuários do Sus. *Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança*. 2014; 2:58–68.
 99. Fontenele RP, Sousa DMP, Carvalho ALM, Oliveira FA. Fitoterapia na Atenção Básica : olhares dos gestores e profissionais da Estratégia Saúde da Família de Teresina (PI), Brasil. *Ciência e Saude Coletiva*. 2011;2385–94.
 100. Kuhn MA, Winston D. Herbal therapy and supplements: a scientific and traditional approach. Philadelphia: Lippincott, 2th ed. 2001.
 101. Chinou B. Assessment report on *Cynara scolymus* L., folium. European medicines agency. 2011; 44:1–41.
 102. HMPC, Committee on Herbal Medicinal Products. European Union herbal monograph on *Cynara cardunculus* L. (syn. *Cynara scolymus* L.), folium. 2010. Disponível em: <www.ema.europa.eu/contact>. Acesso em: 22 abr. 2019.
 103. Juzyszyn Z, Czerny B, Pawlik A, Drożdżik M. The effect of artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on ROS generation in HUVEC cells. *Phytother Res*. 2008;22(9):1159–1161.
 104. Panahi Y, Kianpour P, Mohtashami R, et al. Efficacy of artichoke leaf extract in non-alcoholic fatty liver disease: A pilot double-blind randomized controlled trial. *Phytother Res*. 2018;32(7):1382–7.
 105. Tang X, Wei R, Deng A, Lei T. Protective Effects of Ethanolic Extracts from Artichoke, an Edible Herbal Medicine, against Acute Alcohol-Induced Liver Injury in Mice. *Nutrients*. 2017;9(9):1000.
 106. Bundy R, Walker AF, Simpson HCR. Artichoke Leaf Extract (*Cynara Scolymus*) Reduces Plasma Cholesterol in Otherwise Healthy Hypercholesterolemic Adults: A Randomized, Double Blind Placebo Controlled Trial. *Phytomedicine*. 2008;15(9):668-7.
 107. Rondanelli M, Opizzi A, Faliva M, et al. Metabolic management in overweight subjects with naive impaired fasting glycaemia by means of a highly standardized extract from *Cynara scolymus*: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Phytother Res*. 2014;28(1):33–41.
 108. Englisch W, Beckers C, Unkauf M, Ruepp M, Zinserling V. Efficacy of Artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia. *Arzneimittelforschung*. 2000; 50(3):260–5.
 109. Mocelin R, Marcon M, Santo GD, et al. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of *Cynara scolymus* in cholesterol-fed rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2016; 26(2):233–9.
 110. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 2000; 33(6):423–

- 447.
111. Wilhelm Filho D, Silva EL, Boveris A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentares: importância e perspectivas terapêuticas. In: Calixto JB. Plantas medicinais sob ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argus. 2001; 523:317-34.
 112. Espíndola KMM, Ferreira RG, Narvaez LEM, et al. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Front Oncol*. 2019;9:541.
 113. Yang JQ, Zhou QX, Liu BZ, He BC. Protection of mouse brain from aluminum-induced damage by caffeic acid. *CNS Neurosci Ther*. 2008;14(1):10–16.
 114. İlhan A, Akyol O, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(3):386–394.
 115. Basu Mallik S, Mudgal J, Nampoothiri M, et al. Caffeic acid attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and neuroinflammation in mice. *Neurosci Lett*. 2016;632:218–223.
 116. Meng S, Cao J, Feng Q, Peng J, Hu Y. Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:801457.
 117. Shimoda H, Seki E, Aitani M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complement Altern Med*. 2006;6:9.
 118. Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*. 2011;221(2):555–563.
 119. Karthikesan K, Pari L, Menon VP. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chem Biol Interact*. 2010;188(3):643–50.
 120. Kwon SH, Lee HK, Kim JA, et al. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur J Pharmacol*. 2010;649(1-3):210–17.
 121. Wu J, Chen H, Li H, et al. Antidepressant Potential of Chlorogenic Acid-Enriched Extract from *Eucommia ulmoides* Oliver Bark with Neuron Protection and Promotion of Serotonin Release through Enhancing Synapsin I Expression. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2016; 21(3):260.
 122. Camfield DA, Silber BY, Scholey AB, Nolidin K, Goh A, Stough C. A randomised placebo-controlled trial to differentiate the acute cognitive and mood effects of chlorogenic acid from decaffeinated coffee. *PloS one*. 2013; 8(12):e82897.
 123. Wang X, Fan X, Yuan S, et al. Chlorogenic acid protects against aluminium-induced cytotoxicity through chelation and antioxidant actions in primary hippocampal neuronal cells. *Food and Function*. 2017; 8(8): 2924–34.
 124. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 9th Edition. 2017.
 125. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRNM. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*. 2007; 28(1):11-23.
 126. Lebel CP, Ali SF, Mckee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1990; 104:17–24.
 127. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126 (1):131-8.

128. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1994; 233:346–57.
129. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951; 193(1):265–75.
130. Bannister JV, Calabrese L. Assays for SOD. *Meth Biochem. Anal.* 1987; 32:279–312.
131. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74:214–26.
132. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1:3159–65.

ANEXO 1- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



Pró Reitoria de Ensino, Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais (Res. CONSUN 46/2009)

Palhoça, 29 de maio de 2019

Palhoça, 29 de maio de 2019
Registro na CEUA (código): 19.001.2.08.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Gislaine Tezza Rezin

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do efeito da alcachofra sobre parâmetros neuroinflamatórios e neuroquímicos em modelo animal de obesidade", registrada com o 19.001.2.08.IV, sob a responsabilidade de Gislaine Tezza Rezin - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 10 de julho de 2019.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

Prof. Sandro Melim Sgroff
Coordenador da Comissão

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - Código de Financiamento 001.