

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÉRICA DE PAULA NUMATA

**EFEITOS ANTI-ADIPOGÊNICOS DA ERVA-MATE (*ILEX  
PARAGUARIENSIS*) NA EXPRESSÃO DE GENES E miRNAs  
ASSOCIADOS À VIA Wnt**

BRAGANÇA PAULISTA

2016

ÉRICA DE PAULA NUMATA – R.A. 001201401995

**EFEITOS ANTI-ADIPOGÊNICOS DA ERVA-MATE (*ILEX  
PARAGUARIENSIS*) NA EXPRESSÃO DE GENES E miRNAs  
ASSOCIADOS À VIA Wnt**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde como requisito parcial para  
obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lima  
Ribeiro

BRAGANÇA PAULISTA

2016

WD 210 Numata, Érica de Paula.

N915a Efeitos anti-adipogênicos da erva-mate (*ILEX PARAGUARIENSIS*) na expressão de genes e miRNAs associados à via Wnt / Érica de Paula Numata. -- Bragança Paulista, 2016.  
63 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

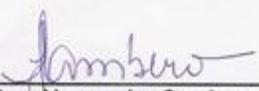
Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro.

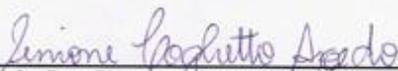
Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.



NUMATA, P., Érica, "Efeitos anti-adipogênicos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na expressão de genes e miRNAs associados à via wnt". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 29 de fevereiro de 2016 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro  
Universidade São Francisco

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alessandra Gambero  
Universidade São Francisco

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Simone Coghetto Acedo  
Universidade Estadual de Campinas

Dedico este trabalho aos meus pais, Yoshikasu e Maria Emília e ao meu querido irmão  
Éric por todo carinho, amor e apoio incondicional sempre.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente a Deus, creio que ele está diante de cada passo a ser seguido.

Ao professor Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro pela grande oportunidade oferecida ao me conceder um lugar em seu laboratório, pela paciência e por estar sempre presente pronto para atender minhas dúvidas. Muito obrigada.

Meus agradecimentos aos professores do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, principalmente a professora Dra. Alessandra Gambero e ao professor e Dr. Lúcio Fabio Caldas Ferraz.

À Vilma Tescke da secretaria da pós-graduação.

Aos amigos, mestrandos e doutorandos, gratidão e carinho, que tanto contribuíram com o trabalho, pois sempre que precisei estavam dispostos e presentes me auxiliando nas horas de dúvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP) por me conceder a bolsa de estudo.

Aos meus queridos familiares e amigos, por tantas palavras de conforto e conselhos nas horas difíceis.

Muito Obrigada a todos vocês!

“Não é o mais forte da espécie que sobrevive, nem o mais inteligente. É aquele que melhor se adapta as mudanças”.

## RESUMO

A obesidade é uma doença crônica não transmissível considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Dentre os processos biológicos associados a ela destaca-se a adipogênese, que é controlada por uma combinação de múltiplos fatores de transcrição. Já foi demonstrado que a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) desempenha um importante papel na regulação da adipogênese *in vitro* e *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos anti-adipogênicos da erva-mate na expressão de genes e miRNAs associados à via Wnt. Para o desenvolvimento dos experimentos, utilizamos cultura de células 3T3-L1. As células foram incubadas com erva mate em diferentes concentrações (0, 50, 150 e 300 µg/mL) durante todo o período de diferenciação (4 dias). As amostras foram coletadas após 0, 1, 2, 3, e 4 dias e o material armazenado a -80°C para análises subsequentes (miRNAs e mRNAs). Foram estudados os genes *Fabp4*, *Gsk3b*, *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*; e miRNAs: mmu-miR-27b-3, mmu-miR-32-5p, mmu-miR-34b -5p, mmu-miR-124-3p, mmu-miR-204-5p, mmu-miR-294-5p, mmu-miR-452-5p, mmu-miR-760-5p, mmu-miR-874-3p, mmu-miR-1192, mmu-miR-1224-5p, mmu-miR-1955-5p e mmu-miR-3094-3p. Para validar os dados obtidos *in vitro*, utilizamos o modelo de obesidade induzida por dieta. *Swiss* foram divididos em dois grupos: Controle (CN) e Dieta Hiperlipídica (DH). Após 8 semanas de intervenção dietética, o grupo DH foi subdividido em dois grupos: DH e DH + Mate, os quais foram tratados com erva-mate (1,0 g/Kg<sup>-1</sup>) por gavagem durante 60 dias. Os animais dos grupos CN e DH receberam gavagem com água. O ensaio de *Oil Red O* mostra que a erva-mate foi capaz de inibir significativamente o acúmulo de triglicerídeos em todas as concentrações testadas (50µg/mL, 150ug/mL e 300ug/mL). A expressão gênica das células 3T3-L1 em tais condições, a erva-mate foi capaz de aumentar a expressão dos genes: *Fabp4*, *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*. Além disso, reprimiu a expressão dos miRNAs (miR-27b-3p e miR-760-5p) que possuíam genes da via Wnt como alvo e auxiliou na translocação da β-catenina por imunocitoquímica. Em relação ao modelo animal, observamos que após 60 dias de intervenção o grupo DH + Mate apresentou uma redução significativa no peso (48,7±6,70g vs 55,7±2,73g), quando comparado ao grupo DH. Também foi observada uma redução significativa na quantidade de gordura epididimal. Por fim, observamos que os dados de expressão gênica e miRNAs obtidos *in vivo* corroboraram com os resultados *in vitro*. Sendo assim, este trabalho demonstrou um papel da erva-mate na modulação de miRNAs ainda pouco estudado na literatura, mostrando que ela

pode exercer um importante controle metabólico e da obesidade, principalmente quando relacionada à adipogênese.

**Palavras-chave:** Obesidade; Adipogênese; miRNAs; 3T3L1; Erva-mate.

## ABSTRACT

Obesity is a non-communicable chronic disease considered a major public health problem in the world. Among the biological processes associated, stands out adipogenesis, which is controlled by a combination of multiple transcription factors. It has been shown that yerba maté (*Ilex paraguariensis*) plays an important role in the regulation of adipogenesis *in vitro* and *in vivo*. The aim of this study was evaluate the possible anti-adipogenic effects of yerba mate in gene expression and miRNAs associated with Wnt pathway. For the development of the experiments, we used 3T3-L1 cells culture. Cells were incubated with yerba maté in different concentrations (0, 50, 150 and 300 ug/ml) throughout the differentiation period (4 days). Samples were collected after 0, 1, 2, 3, and 4 days and material was stored at -80°C for subsequent analysis (miRNAs and mRNAs). We had studied the genes *Fabp4*, *Gsk3b*, *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* and *Wnt10b*; and miRNAs: mmu-miR-27b-3, mmu-miR-32-5p, mmu-miR-34b -5p, mmu-miR-124-3p, mmu-miR-204-5p, mmu-miR-294-5p, mmu-miR-452-5p, mmu-miR-760-5p, mmu-miR-874-3p, mmu-miR-1192, mmu-miR-1224-5p, mmu-miR-1955-5p and mmu-miR-3094-3p. To validate the data obtained *in vitro*, we used a diet-induced obesity model. The animals were divided into two groups: Control (CN) and High Fat Diet (HFD). After 8 weeks of diet intervention, HFD group was subdivided into two groups: HFD and HFD + Mate, which were treated with yerba maté (1.0 g/kg<sup>-1</sup>) by gavage for 60 days. Animals of CN and HFD groups received gavage with pure water. *Oil Red O* assay shows that yerba mate was able to inhibit significantly triglycerides accumulation in all tested concentrations (50µg/mL, 150µg/mL and 300µg/mL). Regarding the gene expression, the yerba mate was able to increase genes expression: *Fabp4*, *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* and *Wnt10b*. Furthermore, repressed miRNAs expression (miR-27b-3p and miR-760-5p) that had Wnt genes with targeted and supported in β-catenin translocation. About the animal model, we observed that after 60 days intervention, the DH + Mate group showed a significant weight reduction (48.7±6.70g vs 55.7±2.73g), when compared to DH group. It was also observed a significant reduction in the amount of epididymal fat. Finally, we observed that data of gene expression and miRNAs obtained *in vivo* corroborate with *in vitro* results. Our data allow us to infer that yerba maté appears to regulate adipogenesis Wnt pathway modulation.

**Keywords:** Obesity; Adipogenesis; miRNAs; 3T3L1; Yerba maté.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACG - Ácido clorogênico

C/EBP-  $\alpha$  - Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma alfa

C/EBP-  $\beta$  - Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma beta

C/EBP-  $\delta$  - Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma delta

C/EBPs - Proteínas ligantes ao amplificador CCAAT

cAMP - AMP cíclico

CREB - Proteína de ligação do elemento responsivo a cAMP

DEX - Dexametasona

DLK-1 - Delta-like protein 1 (Pref-1)

DVL - proteínas *Disheveled*

E2F1- Fator de transcrição e zf

FBS - Soro bovino fetal

GLUT-4 - Transportador de glicose

GSK-3 - Glicogênio sintetase quinase 3

IBMX - Isobutilmetilxantina

IL - Interleucina

IL-6 - Interleucina 6

IMC- índice de massa corporal

LRP - Receptores de lipoproteínas

MCP-1- proteína quimioatrativa de macrófagos 1

miRNA - micro-RNA

OMS- Organização Mundial da Saúde

pri-miRNA - miRNA primário

PAI-1 – Inibidor de ativador de plasminogênio 1

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDK - Quinase dependente de fosfoinosítídeos

PEPCK - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PGC-1 $\alpha$  - PPAR $\gamma$  coativador 1alfa

PPAR - Receptor ativado por proliferadores peroxissomas

PPAR $\gamma$  - Receptor ativado por proliferadores peroxissomas isoforma gamma

SFRP - Proteínas *frizzled*

SREBP - Proteína ligadora do elemento regulado por esteróis

TAB - tecido adiposo branco

TAM - Tecido adiposo marrom

TCF/LEF - *T-cell factor/lymphoid-enhancing factor*

TG – Triacilglicerol

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral Alfa

UCP-1 - *Uncoupling protein 1*

WNT - *Wingless type*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Gráfico de prevalência mundial de obesidade.....	15
FIGURA 2. Esquema representativo da biogênese de ação dos miRNAs .....	20
FIGURA 3. Compostos Bioativos presentes na erva-mate .....	22
FIGURA 4. Cafeoilquínicos – ácido clorogênico (ACG) e seus isômeros. ....	23
FIGURA 5. Efeito in vitro e in vivo da erva-mate na adipogênese.....	24
FIGURA 6. Desenho experimental in vitro.....	28
FIGURA 7. Gráfico comparativo das diferentes concentrações utilizadas na cultura celular de 3T3-L1.....	39
FIGURA 8. . Efeito da erva-mate (150 µg/mL) após dia 0, 1, 2, 3 e 4 de indução da adipogênese em células 3T3L1. ....	41
FIGURA 9. Efeito da erva-mate (50 e 150 µg/mL) (após dia 0, 1, 2, 3 e 4) na translocação nuclear de β-catenina em células 3T3L1.....	43
FIGURA 10. Efeito da erva-mate (100 µg/mL) após dia 0, 1, 2, 3 e 4 de indução da adipogênese em células 3T3L1. ....	47
FIGURA 11. Evolução de peso dos animais nas primeiras 8 semanas. ....	47
FIGURA 12. Evolução de peso dos animais durante as 8 semanas de intervenção.. ....	48

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Primers utilizados no PCR em tempo real.....	31
TABELA 2. miRNAs estudados com seus respectivos genes alvos.....	32
TABELA 3. Composição das dietas utilizadas.....	35
TABELA 4. Grupos experimentais. ....	36
TABELA 5. miRNAs e seus genes WNT alvo <i>in vitro</i> .....	45
TABELA 6. Dados composição corporal, consumo alimentar e adiposidade dos animais. ....	48
TABELA 7. Genes WNT e miRNAs avaliados.....	50

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	i
1.1 Obesidade.....	14
1.2 Tecido adiposo.....	15
1.3 Via Wnt e adipogênese .....	18
1.4 Micro-RNAs envolvidos no processo da adipogênese .....	19
1.5 Estratégias para controle e tratamento da obesidade .....	20
1.6 <i>Ilex paraguariensis</i> (erva-mate).....	21
2.1 Objetivo Geral .....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Análises <i>in vitro</i> .....	27
3.1.1 Preparo do extrato aquoso de erva-mate .....	27
3.1.2 Cultura de adipócitos.....	27
3.1.3 Desenho experimental.....	27
3.1.4 Determinação de acúmulo triglicéridos – <i>Oil Red O</i> .....	29
3.1.5 Análise de expressão de genes e miRNAs associados à adipogênese .....	29
3.1.5.1 Buscas por Bioinformática.....	29
3.1.6 Análise de translocação nuclear de $\beta$ -catenina .....	32
3.2 Análises <i>in vivo</i> .....	34
3.2.1 Preparo do extrato aquoso de erva-mate .....	34
3.2.2 Experimentação - Modelo animal.....	34
3.2.3 Modelo de obesidade induzido por dieta .....	35
3.2.3.1 Desenho experimental.....	35

3.2.3.2 Avaliação da expressão dos miRNAs e genes <i>in vivo</i> .....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4.1 Acúmulo de triacilgliceróis – <i>Oil Red O</i> .....	38
4.2 Expressão de genes relacionados à adipogênese .....	40
4.3 Avaliação da translocação nuclear de $\beta$ -catenina .....	42
4.4 Expressão de miRNAs relacionados à adipogênese.....	44
4.5 Efeitos da erva-mate na adipogênese <i>in vivo</i> .....	47
5. CONCLUSÃO.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
7. ANEXO 01 .....	64

# 1. INTRODUÇÃO

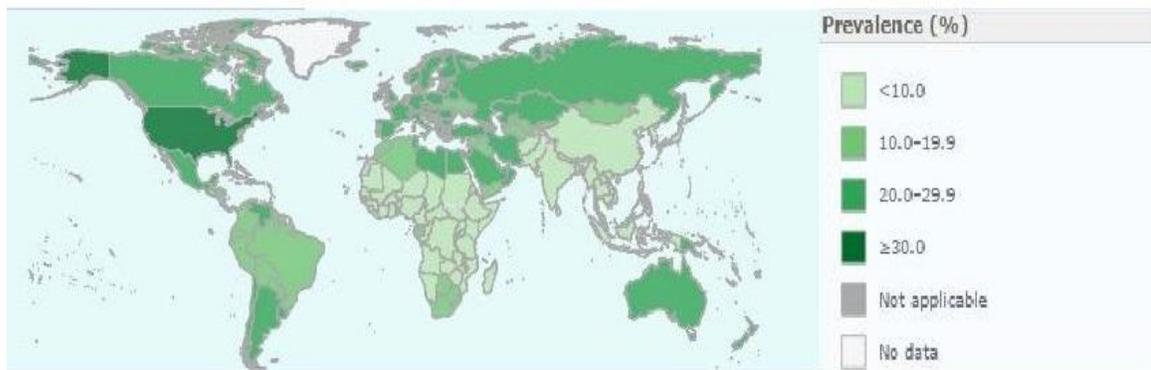
## 1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença inflamatória crônica não transmissível considerada um dos principais problemas de saúde pública no mundo (KOPELMAN, 2000). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é definida como acúmulo exacerbado de gordura que apresenta riscos à saúde. Comumente está associada a diversas outras co-morbidades como dislipidemia, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2, doenças coronarianas, entre outras (KUMANYIKA, 2001; MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2004). Com ampla magnitude, ela afeta não apenas nações industrializadas, mas também países em desenvolvimento (KOPELMAN, 2000; ABELSON; KENNEDY, 2004).

Estudos demonstram que a obesidade é causada por processos complexos, proveniente de combinações de diversos fatores, como por exemplo, variações genéticas, ambientais e nutricionais (SIPE et al., 2005). O aumento na prevalência de sobrepeso e obesidade tem sido observado em todo o mundo, e, apesar da atual consciência pública sobre as suas consequências, sua incidência continua a aumentar, atingindo quase todas as etnias, faixas etárias e ambos os sexos (HALL; GUYTON, 2011).

Para a avaliação individual corpórea, é utilizado o índice de massa corporal (IMC), que é calculado pela divisão do peso corpóreo (em Kg) pelo quadrado da altura do indivíduo (em metros). Este índice é mundialmente utilizado e, segundo os pontos de corte da OMS (1995), os indivíduos podem ser classificados em: baixo peso ( $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ ), peso adequado ( $IMC: 18,5-24,9 \text{ kg/m}^2$ ), sobrepeso ( $IMC: 25,0-29,9 \text{ kg/m}^2$ ) ou obesidade ( $IMC \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$ ). Este tipo de classificação é muito importante e amplamente utilizado em estudos epidemiológicos (SILVEIRA; KAC; BARBOSA, 2009; JOHNSON et al., 2016).

Dados recentes da OMS estimam que 39% da população mundial adulta apresenta sobrepeso e 13% já é obesa ( $IMC \geq 30 \text{ Kg}$ ) (FIGURA 1). No Brasil, dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em conjunto com o Ministério da Saúde demonstram que 56,9% da população adulta está com sobrepeso e 20,8% é obesa (IBGE, 2015). Estes dados são preocupantes e mostram que a prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil já ultrapassa a média mundial. Por este motivo, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de que novas estratégias de redução ou controle da obesidade sejam alcançadas e colocadas em prática para que a saúde e a qualidade de vida da população sejam melhoradas.



**FIGURA 1. Gráfico de prevalência mundial de obesidade.**

Fonte: <[http://gamapserver.who.int/gho/interactive\\_charts/ncd/risk\\_factors/obesity/atlas.html](http://gamapserver.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/obesity/atlas.html)>

Em indivíduos obesos, a prevalência de doenças como hipertensão arterial sistêmica (HAS), doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (MOKDAD et al., 2003; DAY e LOOS, 2011) e alguns tipos de câncer (BORUGIAN et al., 2003; CALLE et al., 2003) é maior. Segundo Kaplan (1989 apud ARÇARI, 2011, p 8), estas doenças coletivamente compõem a síndrome metabólica, que é caracterizada pelo conjunto de três ou mais anormalidades metabólicas e cardiovasculares presentes no indivíduo obeso.

## 1.2 Tecido adiposo

Embora os mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento da obesidade sejam complexos e não estejam bem estabelecidos, sabe-se que esta condição está associada a um importante papel do tecido adiposo (YUDKIN et al., 1999 e BULLÓ et al., 2003). Caracterizada pelo aumento das reservas adiposas, a obesidade está diretamente relacionada com o desenvolvimento de um padrão inflamatório crônico. Neste sentido, sabe-se que o tecido adiposo não é somente um reservatório de energia, mas também exerce importantes funções no sistema endócrino, no metabolismo e na regulação da homeostase (GUZIK; MANGALAT; KORBUT, 2006).

Do ponto de vista histológico, o tecido adiposo, além de adipócitos maduros, é composto pela fração estromal, que é formada pela matriz extra celular com fibroblastos dispersos, pré-adipócitos (precursores imaturos de adipócitos), células endoteliais e células do sistema imunológico, que possuem importante papel de limpeza e manutenção dos tecidos em condições não-obesas (MRAZ; HALUZIK, 2014). O tecido adiposo humano é dividido em dois

tipos: tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). O TAB apresenta funções abrangentes e possui diversos depósitos em diferentes regiões do organismo. Além de envolver órgãos e tecidos ou se infiltrar em estruturas internas, o TAB apresenta função como excelente isolante térmico, sendo importante na manutenção da temperatura corporal (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). O TAM possui um importante mecanismo de defesa contra a obesidade, aumentando o gasto energético através da termogênese. Localizado às regiões interescapulares e paravertebrais, as quantidades de TAM parecem diminuir ao atingir fase adulta (ALMIND et al., 2007).

As células do tecido adiposo, denominadas adipócitos, estocam energia na forma de triglicerídeos e ácidos graxos e podem mobilizar essas reservas para serem utilizadas durante períodos de privação energética (LARGE et al., 2004). Além do papel na reserva de energia, os adipócitos produzem uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas conhecidas como adipocinas. Já é sabido que a produção desregulada das adipocinas está associada com complicações cardiometabólicas (FURUKAWA et al., 2004). A expansão do tecido adiposo leva a um quadro de hipóxia, seguido da ativação da resposta inflamatória no tecido, liberando uma quantidade excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como o inibidor 1 de ativador de plasminogênio (PAI-1), interleucina-6 (IL-6), proteína 1 quimioatrativa de macrófagos (MCP-1), angiotensina, adiponectina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que interferem na ativação de células do sistema imune que estão presentes no TA. (MATSUZAWA et al., 2004; CASSETTA; CASSOL; POLI, 2011).

O acúmulo exacerbado de tecido adiposo na obesidade envolve um extenso remodelamento a nível celular. Tais alterações são dependentes de uma coordenada interação entre hipertrofia (aumento do tamanho celular) e hiperplasia (aumento no número de células) (HAUSMAN et al., 2001 e FAJAS, 2003). As modificações no tamanho (diâmetro e volume) de adipócitos maduros ocorrem em resposta à ativação de suas ações metabólicas típicas, que são a lipogênese e a lipólise (DEFRONZO, 2004).

A hiperplasia do tecido adiposo dependente da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros é denominada adipogênese (HAUSMAN et al., 2001 e AVRAM; AVRAM; JAMES, 2007). Esta diferenciação é altamente controlada por uma combinação de múltiplos fatores de transcrição que desempenham um papel fundamental na complexa cascata transcricional (GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998). Na adipogênese observa-se uma série de eventos sequenciais, tais como parada de ciclo celular, expansão clonal e diferenciação celular. Tais eventos requerem a atuação de diversos genes, e acredita-se que todo o processo comece

com a ativação de proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma alfa (C/EBP- $\alpha$ ), proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma beta (C/EBP- $\beta$ ) e proteínas ligantes ao amplificador CCAAT isoforma delta (C/EBP- $\delta$ ), seguido da ativação de receptor ativado por proliferadores peroxidase forma gamma (PPAR $\gamma$ ) (em particular PPAR $\gamma$ 2), que age diretamente em outros genes associados a este processo (MANDRUP; LANE, 1997; ROSEN et al., 2000).

O PPAR $\gamma$ 2 é o principal regulador da adipogênese. Primariamente expresso no tecido adiposo, ele promove a diferenciação e a proliferação dos adipócitos, que são derivados dos fibroblastos. Logo, a ação do PPAR $\gamma$ 2 resulta em um aumento na adiposidade (CANOY et al., 2007). Acredita-se que a auto-regulação C/EBP- $\alpha$  e PPAR $\gamma$  é fundamental na manutenção da adipogênese (FOX et al., 2006).

A exposição de uma placa de pré-adipócitos 3T3-L1 confluentes ao coquetel adipogênico ativa receptores de glicocorticóides pela dexametasona (DEX), receptor de IGF-1 (pela insulina) e a via de sinalização do cAMP (AMP cíclico) (pelo Isobutilmetilxantina (IBMX), um inibidor de fosfodiesterases), o que leva à ativação dos eventos iniciais representados pela expressão das proteínas C/EBP- $\beta$  e C/EBP- $\delta$  (Ntamb & Young-Cheul, 2000). As células, então, reiniciam o ciclo celular, sofrem divisão celular de forma regulada (expansão clonal), saem permanentemente do processo de ciclo celular e entram em diferenciação terminal por ativação do PPAR $\gamma$  e C/EBP- $\alpha$ , os dois reguladores centrais do processo adipogênico (Farmer, 2006).

Além disso, a expressão de C/EBP- $\alpha$  e PPAR $\gamma$  são dependentes da ativação de duas outras proteínas: a *Transcription fator 1* (E2F1) e *Delta-like protein 1* (DLK1), que exercem papéis inversos. Enquanto E2F1 induz a expressão de C/EBP- $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , favorecendo a adipogênese (VENUGOPAL; HANASHIRO; NAGAMINE, 2007), DLK1 está associado com a inibição deste processo *in vitro* (GUZIK; MANGALAT; KORBUT, 2006). O aumento em E2F1 está correlacionado com a supressão em DLK1 (SHEN et al., 2009). Outro importante fator ativado no início da adipogênese é a proteína de ligação do elemento responsivo a cAMP 1 (CREB1). Sua ativação induz o aumento da expressão de C/EBP- $\beta$  e PPAR $\gamma$ 2 e consequentemente contribui para o processo de adipogênese (REUSCH; COLTON; KLEMM, 2000; ZHANG et al., 2004; FOX et al., 2006). A elevação da concentração de cAMP na célula adiposa tem sido associada às etapas iniciais do processo de diferenciação do pré-adipócito que envolve a indução de C/EBPs e a supressão da via de sinalização Wingless type (Wnt) (KRISHNAN, 2006).

### 1.3 Via Wingless type (Wnt) e adipogênese

Além de todos os genes envolvidos na cascata de transcrição da adipogênese, tem sido demonstrado que este processo requer a modulação da via Wnt. A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina está envolvida na proliferação e diferenciação celular em vários tecidos e órgãos (via de sinalização canônica). Seu mecanismo consiste na ligação de moléculas Wnt aos receptores *Frizzled*, que, junto às proteínas DVL (*Disheveled*), serão responsáveis pela cascata de sinalização celular. Na ausência da sinalização de Wnt, a  $\beta$ -catenina citosólica é capturada pelo complexo de destruição (Axina, APC e GSK3), que rapidamente fosforila os resíduos de serina na porção N-terminal de  $\beta$ -catenina e a degrada pela via de ubiquitinação proteossômica (KIMELMAN; XU, 2006). Por outro lado, quando ativada a proteína citosólica  $\beta$ -catenina não é fosforilada pelo complexo de degradação e acumula no citoplasma. Desse modo,  $\beta$ -catenina é translocada para o núcleo onde se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF1 (*T-cell specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor-1*) ativando diversos genes (RADULESCU et al., 2013).

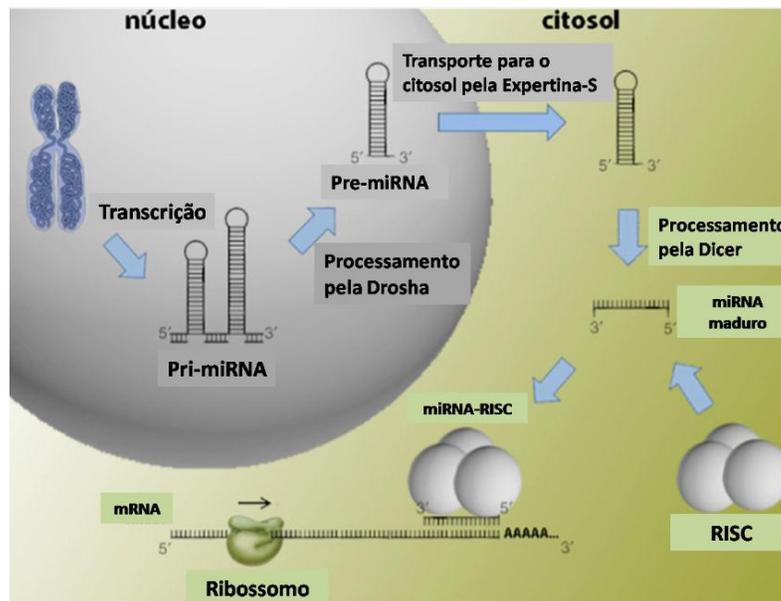
De modo complementar, tem sido sugerido que *Creb1*, na presença de insulina, reduz a expressão de Wnt10b (TSENG et al., 2005) o qual reprime a adipogênese pela via Wnt dependente de  $\beta$ -catenina (MACDOUGALD et al., 2000; MANDRUP; MANDRUP; LANE, 1997). Esta via é iniciada pela ligação de WNT1, WNT3a e WNT10b nos receptores proteínas *frizzled* (SFRP, SFRP1 e SFRP5) e receptores de lipoproteínas (LRP, LRP5 e LRP6). A expressão de WNT10b estabiliza  $\beta$ -catenina no citoplasma, inibindo a adipogênese. Acredita-se que WNT10b é o regulador primário da adipogênese, e WNT1 e WNT3a agem com sinergismo (TSENG et al., 2005). A ligação de Wnt com seus receptores (SFRP e LRP) inibem glicogênio sintetase quinase 3 (GSK-3), resultando em uma hipofosforilação de  $\beta$ -catenina. Esta então é translocada para o núcleo onde se liga ao fator de transcrição *T-cell factor/lymphoid-enhancing* (TCF/LEF), reprimindo C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , e conseqüentemente a adipogênese (ROSEN et al., 2000). Há evidências na literatura de que *Transcription factor 7-like 2* (TCF7L2), um membro da família de fatores de transcrição TCF/LEF, esteja associado ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (KANAZAWA et al., 2004; GRANT et al., 2006).

## 1.4 Micro-RNAs envolvidos no processo da adipogênese

Os micro-RNAs (miRNAs) são uma classe de pequenas moléculas de RNA não codificantes, com cerca de 18-25 nucleotídeos, que possuem grande importância como reguladores pós transcricionais. Os miRNAs regulam negativamente a expressão gênica por meio de sua capacidade de ligação com a região 3' não traduzida (3'UTR) do(s) RNA mensageiro(s) alvo(s), o que conseqüentemente levaria a uma redução no processo de tradução (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009 e GUO et al., 2010). Atualmente mais de 900 miRNAs já foram identificados e validados, e cerca de 2000 já foram preditos em seres humanos, regulando cerca de 30% do genoma (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009 e HULSMANS; DE KEYZER; HOLVOET, 2011).

Sabe-se que grande parte dos miRNAs está localizada em regiões intragênicas, ou na orientação reversa de certos genes, possuem regiões promotoras e elementos regulatórios próprios. Assim como genes não codificantes, os miRNAs são transcritos no núcleo pela RNA polimerase II, produzindo um miRNA primário (pri-miRNA). Após a transcrição os pri-miRNAs são processados por um complexo composto por Drosha-DGCR8 e exportados, pela exportina-5, para o citosol como precursor de miRNA (pré-miRNA). Subseqüentemente, este é processado pelo complexo Dicer-TRBP formando um duplex miRNA/miRNA, contendo o miRNA maduro e sua fita complementar. Apenas uma das fitas do duplex será montada dentro do complexo silenciador induzido por RNA (RISC - *RNA-Induced Silencing Complex*), que atua sobre o seu RNAm alvo, reprimindo a tradução ou promovendo sua degradação (FIGURA 2). Tal ação depende do grau de complementaridade do miRNA com o seu RNAm alvo (BERNSTEIN et al., 2001; VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006).

Além disso, alguns estudos mostram que os miRNAs podem regular mecanismos epigenéticos, tais como metilação do DNA e alterações em histonas (WEBER et al., 2007). Por outro lado, também existem trabalhos na literatura indicando que os miRNAs podem ser silenciados epigeneticamente por meio de hipermetilação das ilhas CpG adjacentes aos miRs e/ou por modificações em histonas (KUNEJ et al., 2011).



**FIGURA 2. Esquema representativo da biogênese de ação dos miRNAs**

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2012

Embora nos últimos anos muita atenção tenha sido dada aos efeitos de certos fatores de transcrição relacionados à adipogênese, pouco se sabe sobre a influência regulatória dos miRNAs neste processo (ORTEGA et al., 2010). Estudos recentes têm demonstrado que os miRNAs desempenham um importante papel modulador na adipogênese *in vitro* e *in vivo* (XIE; LIM; LODISH, 2009; ORTEGA et al., 2010; KELLER et al., 2011). Dentre os resultados apresentados destacam-se aqueles em que o aumento na expressão dos miRNAs (miR17-92, miR-21, miR-103, miR-107, miR-143, miR371 e miR378/378\*) estavam associados a uma indução na adipogênese (XIE; LIM; LODISH, 2009; ORTEGA et al., 2010; HULSMANS; DE KEYZER; HOLVOET, 2011). Análises de bioinformática sugerem que os miR-27 e miR130a podem ter com alvo PPAR $\gamma$  na região 3' não traduzida (UTR). Em células 3T3-L1, a expressão do miR-27a e miR-130a são gradualmente diminuídas durante a adipogênese, a qual é inversamente correlacionada com a expressão de PPAR $\gamma$ . Estes resultados sugerem que tanto miR-27a quanto miR-130a, regulam negativamente a expressão de PPAR $\gamma$  (LEE et al., 2003; LUND et al., 2004). Deste modo, acredita-se que a avaliação funcional destes miRNAs seria de fundamental importância na pesquisa científica e ajudaria a encontrar possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da obesidade.

## 1.5 Estratégias para controle e tratamento da obesidade

Atualmente, diversas estratégias têm sido utilizadas com o objetivo de obter redução de peso corporal, melhora do perfil lipídico e de outras co-morbididades associadas à obesidade. Dentre elas, podemos destacar o uso de compostos naturais que possuem componentes bioativos como, por exemplo: a *Ephedrasinica*, conhecida como Cipó-de-areia, o guaraná (*Paullinia cupana*), psylla (*Plantago psyllium*), embaúba (*Cecropia obtusifolia*), chá-verde (*Camellia sinensis*) e a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) (ANDERSEN; FOGH, 2001; BRACESCO et al., 2011).

Dentre estes compostos, destacaremos o *Ilex paraguariensis*, que está diretamente envolvido com o objetivo deste trabalho. Na década de 90 foram publicados os trabalhos pioneiros onde foi demonstrada a ação antioxidante da erva-mate (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996). Segundo BASTOS et al. (2007), quando comparado com chá verde (*Camelia sinensis*), os extratos de erva-mate verde e tostada possuem atividade antioxidante superior.

Diversos trabalhos mostram que os compostos detectados na erva-mate possuem uma série de funções biológicas, tais como: ação antioxidante (GUGLIUCCI, 1996; BASTOS et al., 2007), antiinflamatória (ARÇARI et al., 2011b; PIMENTEL et al., 2013; LIMA et al., 2014), efeitos de proteção contra danos induzidos DNA (MIRANDA et al., 2008a) modificação do metabolismo de glicose (HUSSEIN et al., 2011; KANG et al., 2012; PEREIRA et al., 2012), redução do risco cardiovascular (PAGANINI STEIN et al., 2005a), modificação do metabolismo do colesterol (RIBEIRO et al., 2012) controle do ganho de peso (ARÇARI et al., 2011; LIMA et al., 2014) e reversão do quadro de resistência à insulina (ARÇARI et al., 2011; BRACESCO et al., 2011).

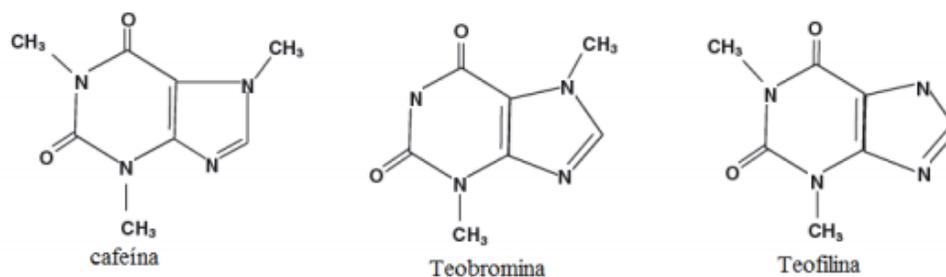
### **1.6 *Ilex paraguariensis* (erva-mate)**

A *Ilex paraguariensis* conhecida como erva-mate ou apenas mate, é uma planta nativa da América do Sul incluindo países como a Argentina, Uruguai, Paraguai e no sul do Brasil (MOSIMANN; WILHELM-FILHO; DA SILVA, 2006). As folhas da planta *Ilex paraguariensis* são consumidas por milhares de pessoas no mundo. Preparada a partir de seu extrato aquoso, seu consumo pode ser feito na forma de tererê, uma bebida feita a partir da maceração da erva em

água fria ou gelada, chimarrão preparado com água quente e chá mate, produzido a partir da infusão da erva-mate que sofreu processo de torrefação. Geralmente a erva-mate verde é comercializada em sacos vendidos como chá mate (BASTOS et al., 2007).

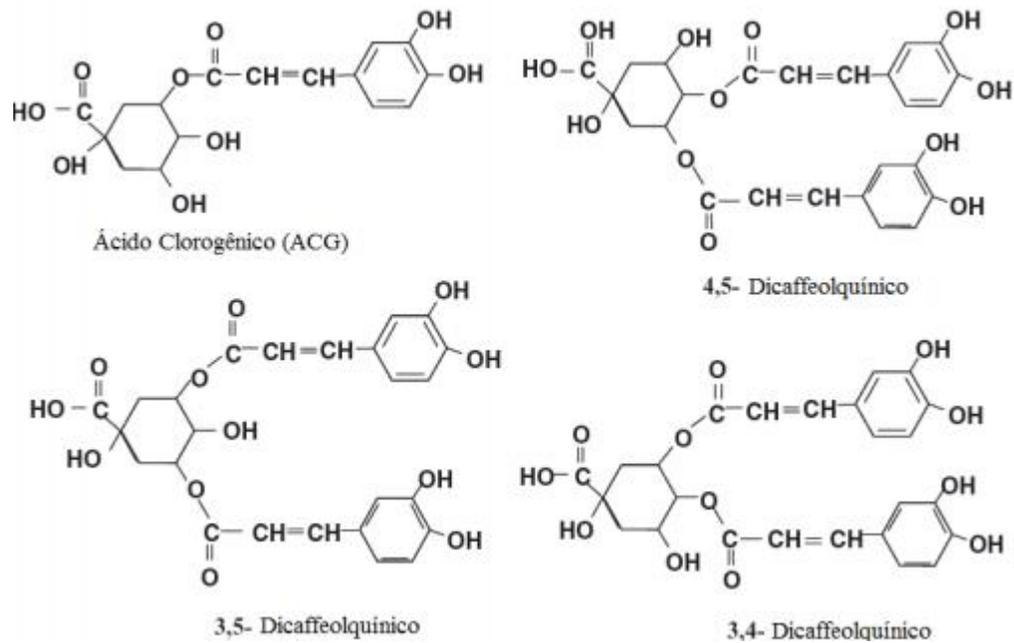
Na medicina popular a *Ilex paraguariensis* é utilizada e recomendada por herboristas para tratar doenças como: artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas (RIL et al., 2011).

Os principais compostos bioativos presentes na erva-mate são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. Nesta última classe de compostos podemos citar a cafeína, a teobromina e a teofilina (FIGURA 3) (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996). Dentre a classe de saponinas encontram-se tripenóides como as gliconas, os ácidos ursólico e oleanólico (SCHINELLA et al., 2000). Entre os compostos fenólicos destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico (ACGs) e seus isômeros (FIGURA 4). Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e a cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (FILIP et al., 2001; CHANDRA; DE MEJIA GONZALEZ, 2004; BASTOS et al., 2007).



**FIGURA 3. Compostos Bioativos presentes na erva-mate.**

Fonte: (GNOATTO et al., 2007)



**FIGURA 4. Cafeoilquinicos – ácido clorogênico (ACG) e seus isômeros.**

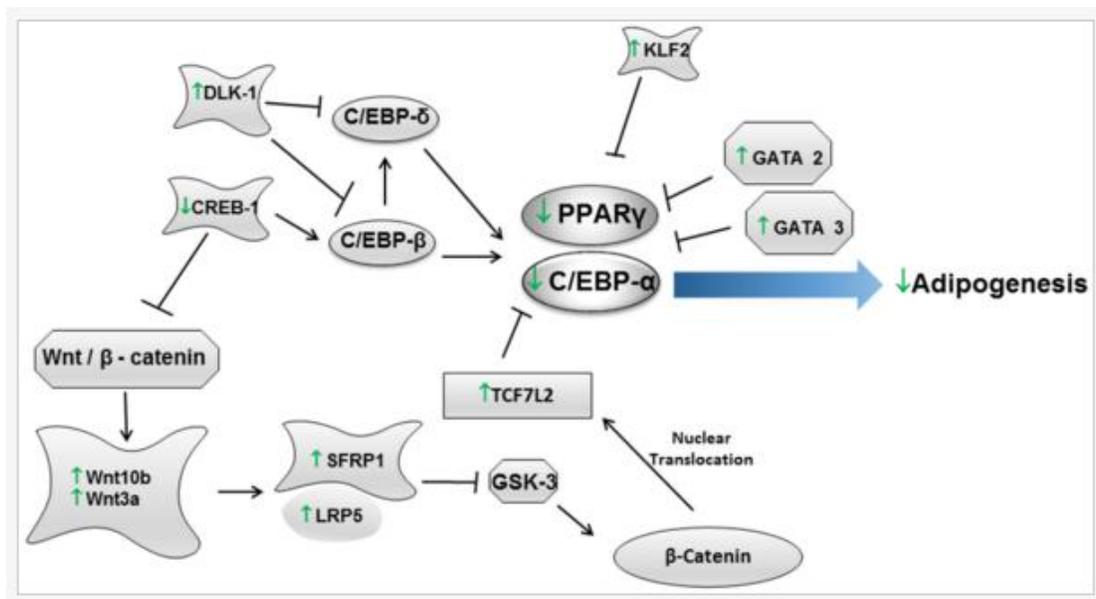
Fonte: (HECK; DE MEJIA, 2007)

Resultados publicados a partir de ensaios com infusões da erva-mate demonstraram alguns dos efeitos farmacológicos atribuídos a esta planta: inibição da glicação, reação na qual, açúcares reagem com proteínas e lipídeos plasmáticos que se acumulam formando locais propícios à formação de radicais livres (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005); efeito vasodilatador e vaso relaxante (MUCCILLO BAISCH; JOHNSTON; PAGANINI STEIN, 1998; PAGANINI STEIN et al., 2005); atuação na progressão da aterosclerose (MOSIMANN; WILHELM-FILHO; DA SILVA, 2006). Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram diversos efeitos benéficos do uso de erva-mate no combate ao estresse oxidativo e oxidação da LDL (ARÇARI et al., 2011). Trabalhos sobre as alterações na estrutura e no sistema de reparo do DNA, sugerem que o consumo de erva-mate poderia contribuir para prevenção da aterosclerose e câncer (FILIP et al., 2000; GUGLIUCCI; MENINI, 2002; BRACESCO et al., 2003; RAMIREZ-MARES; CHANDRA; DE MEJIA, 2004; BASTOS et al., 2007). Esses dados são condizentes com dados realizados por nosso grupo (MIRANDA et al., 2008), que mostrou uma grande capacidade da erva-mate em atuar no sistema de reparo e proteger o DNA contra danos oxidativos. Outro trabalho do nosso grupo indica que o uso de erva-mate foi capaz de melhorar o quadro de algumas condições associadas à obesidade como dislipidemia, redução de peso, resistência à insulina e ainda modificar a expressão de diversas citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, PAI-1, leptina,

angiotensina, adiponectina, PPAR- $\gamma$  e uncoupling protein-1 (UCP-1) no tecido adiposo (ARÇARI et al., 2009).

Diversos dados publicados por nosso grupo de pesquisa indicam que a erva-mate é capaz de reduzir a adipogênese por meio da repressão da expressão de diversos genes como *Ppar $\gamma$ 2*, *C/ebp $\alpha$* , leptina, (*Tnf- $\alpha$* ), *Creb-1* e *E2f1* (GOSMANN et al., 2012; ARÇARI et al., 2013) e ativação da expressão de genes associados a via Wnt como *Dlk-1*, *binding protein3 (GATA-3)*, *Lrp-5*, *Sfrp-1*, *TCF7L2*, *Wnt10b* e *Wnt3a*. O resultado final dessa ativação é a repressão significativa de *C/ebp $\alpha$*  e *Ppar $\gamma$ 2*, principais fatores de transcrição necessários para que ocorra a etapa final do processo de diferenciação dos adipócitos (ARÇARI et al., 2013).

Em revisão recente, Gambero e Ribeiro (2015) mostraram que a erva-mate pode modular diversos genes envolvidos com o processo de adipogênese. Dentre os principais genes conhecidos (como PPAR $\gamma$  e C/EBP's), observou-se também a modulação de genes da via Wnt (como *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*) e seus receptores (como SFRP1 e LRP5). A figura 5 mostra estas possíveis interações.



**FIGURA 5.** Efeito *in vitro* e *in vivo* da erva-mate na adipogênese.

Fonte: (GAMBERO; RIBEIRO, 2015)

Tendo em vista os resultados descritos acima e o papel regulatório dos miRNAs ainda pouco descrito no período de diferenciação dos adipócitos, nosso trabalho teve como foco investigar os efeitos anti-adipogênicos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na expressão de genes e miRNAs associados à via Wnt.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos anti-adipogênicos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na expressão de genes e miRNAs associados à adipogênese na via Wnt em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão dos genes: *Fabp4*, *Gsk3b*, *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*; em 0, 1, 2, 3 e 4 dias em células 3T3L1 tratadas e não tratadas com extrato aquoso de erva-mate;
- Avaliar a expressão dos miRNAs : mmu-miR-27b-3, mmu-miR-32-5p, mmu-miR-34b -5p, mmu-miR-124-3p, mmu-miR-204-5p, mmu-miR-294-5p, mmu-miR-452-5p, mmu-miR-760-5p, mmu-miR-874-3p, mmu-miR-1192, mmu-miR-1224-5p, e mmu-miR-3094-3p em 0, 1, 2, 3 e 4 dias em células 3T3 - L1 tratadas e não tratadas com extrato aquoso de erva-mate;
- Avaliar os efeitos da erva-mate na modulação da expressão gênica e de miRNAs associados com a via WNT no tecido adiposo epididimal de camundongos com obesidade induzida por dieta tratados com erva-mate.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Análises *in vitro***

##### **3.1.1 Preparo do extrato aquoso de erva-mate**

Para este trabalho, utilizamos o extrato aquoso de erva-mate liofilizado (*Ilex paraguariensis*) (Leão Jr. Curitiba, Paraná). Para os ensaios celulares usamos concentrações que variaram de 0 a 300 µg/mL (0, 50, 150 e 300 µg/mL), previamente testadas e publicadas por nosso grupo de pesquisa (ARÇARI et al., 2013).

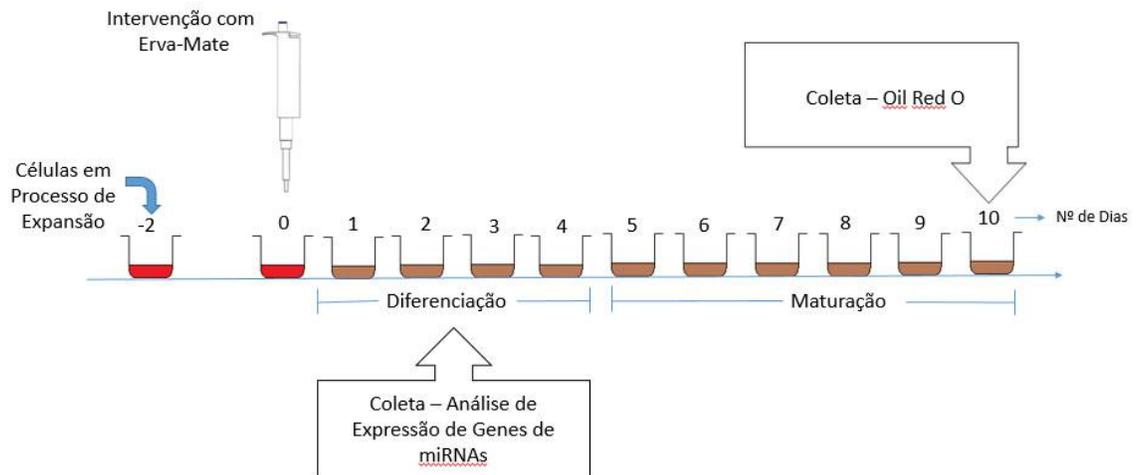
##### **3.1.2 Cultura de adipócitos**

Para o desenvolvimento do trabalho *in vitro* foi utilizada a linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1 (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, que foram cultivadas no meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA) e 1% penicilina e estreptomicina (Gibco BRL, NY, USA). As placas foram cultivadas em estufa condicionada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. Após 2 dias de confluência, as células foram estimuladas à diferenciação em um meio contendo DMEM com 10% FBS, 243 µL de insulina (100 UI), 0,5 mM Isobutilmetilxantina (IBMX) (Sigma, USA), 1mM dexametasona (DEX) e incubadas por 4 dias. No quarto dia, as células foram colocadas em meio de maturação com 10% FBS/DMEM contendo 243 µL de insulina (100 UI), e incubadas por 2 dias, seguido por cultura em meio 10% FBS/DMEM por mais 10 dias.

##### **3.1.3 Desenho experimental**

As células 3T3-L1 foram submetidas ao processo de expansão inicial, até atingirem confluência. Após atingir expansão e confluência, as células foram transferidas para as placas de cultura, e estimuladas à diferenciação (designado como

dia 0). Neste momento as mesmas foram divididas em dia 0 até dia 10, onde dia 0 ao dia 4 e dia 0 ao dia 10, receberam meio de diferenciação mais intervenção com erva-mate, e o dia 5 ao dia 10 ficaram em processo de maturação para o protocolo *Oil Red O*. Do dia 0 ao dia 4, as células receberam juntamente com o coquetel de diferenciação (DMEM com 10% FBS, 243  $\mu$ L de insulina (100 UI), 0,5 mM (IBMX), 1mM Dexa) o extrato aquoso de erva-mate nas diferentes concentrações (50 mg/mL, 150 mg/mL e 300 mg/mL). Após 4 dias da etapa de diferenciação as células, foram retiradas e armazenadas apropriadamente para análise. No período de diferenciação (4 dias), as células foram incubadas apenas com meio de diferenciação (Controle) e com diferentes concentrações de erva-mate (50  $\mu$ g/mL, 150  $\mu$ g/mL e 300  $\mu$ g/mL). Para maior controle do experimento, utilizamos células incubadas apenas com meio DMEM (controle negativo). As células do dia 0 ao dia 10, usadas para avaliar a adipogênese, receberam o coquetel de maturação contendo DMEM com 10% FBS, 243  $\mu$ L de insulina (100 UI), que foi substituído a cada 2 dias. Ao final de 10 dias do início da diferenciação, os adipócitos foram retirados para determinação do acúmulo de triglicerídeos por da coloração com *Oil Red O* (Sigma). Como mostra a figura 6.



**FIGURA 6. Desenho experimental in vitro** (Consideramos dia -2 o processo de expansão e confluência das células 3T3-L1. Dia 0, células com meio de diferenciação e intervenção de erva-mate, dia 1 ao dia 4 células em processo de diferenciação com intervenção de erva-mate e coleta para análise, células do dia 0 ao dia 10 com intervenção de erva-mate e processo de diferenciação receberam o meio de maturação no dia 5, e no dia 10 coleta e protocolo Oil Red O).

### 3.1.4 Determinação de acúmulo triglicérideos – *Oil Red O*

Para determinar o acúmulo de triglicérideos (TG) foi utilizado o ensaio *Oil Red O* (Sigma) conforme protocolo do fabricante. Inicialmente, as células 3T3-L1 foram semeadas em placa de 96 poços e cultivadas conforme descrito anteriormente. Após os 10 dias de maturação, aproximadamente 180  $\mu$ L de meio foi retirado de cada poço e substituído por formalina 10% para que as células fossem fixadas. Após a adição da formalina, as células foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente ( $23 \pm 1$  °C). Posteriormente, a formalina foi retirada e adicionada a mesma quantidade novamente, incubando por 1 hora. Após a incubação, a formalina foi retirada e os poços lavados com isopropanol 60%. A placa foi colocada em temperatura ambiente para total secagem dos poços. Depois de secos, 200  $\mu$ L de solução de trabalho de *Oil Red O* foi adicionada e a placa mantida em repouso por 10 minutos. Após 10 minutos, o *Oil Red O* foi retirado e a placa imediatamente lavada com 200  $\mu$ L de água ultrapura por 4 vezes. Nesta etapa, é possível observar as células coradas e as fotos são capturadas em microscópio invertido (AXIO ZEISS-Jena, Germany) acoplado a câmera (AXIO CAM MRC 5-Jena, Germany). A placa foi colocada até total secagem em temperatura ambiente e os pellets ressuspendidos com 200  $\mu$ L de isopropanol 100%, e incubados por 10 minutos. Após ressuspensão, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm (Thermo/Lab Systems Multiskan RC/MS/EX Microplate Reader – Vantaa, Finland) os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.1.5 Análise de expressão de genes e miRNAs associados à adipogênese

#### 3.1.5.1 Buscas por Bioinformática

Os genes selecionados para a busca de bioinformática foram identificados através da plataforma *Metacore*. Esta plataforma contém dados de ensaios de *array* e expressão de RNAm e permite avaliar centenas de listas de redes de interações entre os objetos estudados. Levando em consideração que os experimentos foram realizados com a finalidade de estudar a adipogênese, as redes de interações mais importantes envolviam a regulação do ciclo celular e diferenciação.

A identificação de possíveis miRNAs foi realizada através da ferramenta de bioinformática *miRDB* encontrada em <http://mirdb.org/miRDB/>. Esta ferramenta é de livre acesso e pode ser utilizada para identificar a complementariedade de bases para miRNAs e regiões 3' não traduzidas (3'UTR) de RNAs. A partir da região 3'UTR do gene desejado, a ferramenta encontra os possíveis miRNAs dentro do banco de dados, que potencialmente se ligam a alguma sequência de bases daquela região. Inversamente, partindo do miRNA desejado, a ferramenta busca todos os genes que possuam em sua região 3'UTR alguma sequência homóloga às bases constituintes do miRNA.

O *miRDB* apresenta a ferramenta Target Rank que é um escore decrescente utilizado para indicar quais dos miRNAs tem maiores chances de sucesso na ligação com seu alvo. Para este trabalho, foram escolhidos 12 miRNAs apresentados na Tabela 2. Os miRNAs candidatos foram escolhidos por terem como alvo sequências de bases homólogas nas regiões 3'UTR do RNAm de genes de reparo da via de interesse (Wnt).

Para os miRNAs escolhidos foi feita uma nova busca de alvos nas regiões 3'UTR em duas novas ferramentas, também de livre acesso, encontradas em <http://www.microrna.org/microrna/home.do> (micrornaorg) e <http://targetscan.org/> (targetscan) com o intuito confirmar os miRNAs envolvidos com os alvos de interesse.

### **- Expressão de RNAm**

Para a análise de expressão gênica, a extração de RNA e síntese de cDNA foi realizada utilizando o RNeasy® tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, aproximadamente 50 ng de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para a realização da PCR em tempo real, utilizamos ensaios Platinum® qPCR Supermix UDG (Invitrogen, USA) por meio de ensaios inventoriados e seguindo as recomendações do fabricante. Os genes selecionados para esta etapa do trabalho foram os seguintes: *Fabp4*, *Gsk3b*, *Srfp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*. Todos os *primers* utilizados estão descritos abaixo (Tabela 1).

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata conforme descrito anteriormente. Os dados foram avaliados usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , usando o gene 18S como controle endógeno.

**TABELA 1. Primers utilizados no PCR em tempo real**

<b>Primer</b>	<b>Sequencia 5'→3'</b>
<i>Fabp4</i> Fw	ATGAAATCACCGCAGACGAC
<i>Fabp4</i> Rv	TCGACTTTCCATCCCCTTC
<i>Gsk3b</i> Fw	CTCCTCATGCTCGGATTCA
<i>Gsk3b</i> Rv	TGCAGAAGCAGCATTATTGG
<i>Sfrp1</i> Fw	GCACTAGTATGGCATGTTGGCTGCTCTG
<i>Sfrp1</i> Rv	ATACGCGTACCTGGGAATCACTATTAAC
<i>Tcf7l2</i> Fw	CCCCTGCTTGATTGAAGTG
<i>Tcf7l2</i> Rv	GGCGGCACAAAATTAAGAG
<i>Wnt1</i> Fw	GCACTAGTAGGGTTCATAGCGATCCATC
<i>Wnt1</i> Rv	ATACGCGTCAAGGAAAGGTGATAATACC
<i>Wnt3a</i> Fw	GCACTAGTGTTGAGGCAATGGTCACCAG
<i>Wnt3a</i> Rv	ATACGCGTGAACGCAAAGTTCCAGGCAG
<i>Wnt10b</i> Fw	TTCTCTCGGGATTTCTTGA
<i>Wnt10b</i> Rv	CACTCCGCTTCAGGTTTTC

### **- Expressão de miRNAs**

Para analisar a expressão de miRNAs associados à adipogênese o material oriundo da cultura (4 dias) foi destinado a extração de miRNA usando o kit *miRNeasy® mini kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA). A transcrição reversa foi realizada com o *miScript II RT* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Subsequentemente, a expressão dos miRNAs foram avaliadas usando o *TaqMan Micro RNA Assays* (Life Technologies). Como controle endógeno foi usado o mmu-mir-U6.

A Tabela 2 mostra miRNAs com seus respectivos genes alvos escolhidos para este trabalho:

**TABELA 2. miRNAs estudados com seus respectivos genes alvos**

miRNAs	Genes Alvos
mmu-miR-124-3p	<i>Tcf7l2, Gsk3B</i>
mmu-miR-294-5p	<i>Wnt5a</i>
mmu-miR-1192	<i>Wnt3a, Tcf7l2, Gsk3b</i>
mmu-miR-760-5p	<i>Wnt1</i>
mmu-miR-27b-3	<i>Sfrp1, Wnt3a, Tcf7l2</i>
mmu-miR-452-5p	<i>Gsk3b</i>
mmu-miR-1224-5p	<i>Wnt4</i>
mmu-miR-874-3p	<i>Gsk3b</i>
mmu-miR-32-5p	<i>Tcf7l2</i>
mmu-miR-3094-3p	<i>Fabp4, Gsk3b</i>
mmu-miR-204-5p	<i>Tcf7l2, Wnt4</i>
mmu-miR-34b -5p	<i>Wnt1, Wnt10b</i>

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata no equipamento 7500-FAST-Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o  $C_t$  (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Os dados foram avaliados utilizando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### 3.1.6 Análise de translocação nuclear de $\beta$ -catenina

Para a análise de translocação nuclear de  $\beta$ -catenina foi usado o método da imunofluorescência. Aproximadamente 15.000 células 3T3-L1 foram semeadas em lâmina para cultura celular com oito poços (LabTek Nunc, Naperville, USA). As células foram incubadas com meio de diferenciação puro (controle), e meio de diferenciação contendo duas diferentes concentrações de erva-mate (50ug/mL e 150 ug/mL) durante 4 dias.

No quarto dia, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído durante 15 minutos e lavadas com PBS suplementado com 0.2% Triton X-100 e 1% soro fetal bovino, durante 5 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram bloqueadas por 1 hora com PBS e 1% de soro fetal bovino, e posteriormente incubadas com o anticorpo específico ( $\beta$ -catenina) por 2 horas.

Após a incubação com o anticorpo primário, as células foram incubadas com anticorpo secundário específico e o DNA nuclear foi corado com uma solução de PBS contendo 10  $\mu$ g/mL 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma). As imagens foram obtidas em microscópio invertido de fluorescência (AXIO ZEISS) acoplado a câmera (AXIO CAM MRc).

## **3.2 Análises *in vivo***

### **3.2.1 Preparo do extrato aquoso de erva-mate**

Para este trabalho, utilizamos o extrato aquoso de erva-mate liofilizado (*Ilex paraguariensis*) (Leão Jr. Curitiba, Paraná). A erva-mate administrada aos animais foi na concentração de 1 g de erva-mate por quilo corpóreo, deste modo os experimentos do presente trabalho foram realizados com a dose de 1,0g/Kg. Previamente, a análise de composição foi realizada, onde observamos  $348,80 \pm 16,35$  mg/g de compostos fenólicos totais (ARÇARI et al., 2009).

### **3.2.2 Experimentação - Modelo animal**

Para o protocolo animal utilizamos 18 camundongos *Swiss*, machos, com peso variando entre 20 e 25 g e idade média de três semanas provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP). Todos os animais ficaram alojados no Biotério do Laboratório da Universidade São Francisco (USF) e passaram por um período de adaptação às condições ambientais por uma semana. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura  $22^{\circ}\text{C} \pm 3$  e de umidade  $55\% \pm 3\%$ , com livre acesso a água e ração padrão. Antes do início dos experimentos, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco, cuja aprovação está em anexo.

O modelo experimental que mais se assemelha a grande parte da obesidade humana é o modelo de obesidade exógena, onde é oferecido ao animal um maior aporte calórico através de uma sobrecarga de carboidratos ou gordura, isoladamente ou em associações. A Tabela 3 mostra a composição das dietas utilizadas por nosso grupo de pesquisa (KUHN et al., 2008; ARÇARI et al., 2013), também utilizada no presente trabalho.

**TABELA 3. Composição das dietas utilizadas.**

	Dieta Padrão		Dieta Hiperlipídica	
	g.kg <sup>-1</sup>	kcal.kg <sup>-1</sup>	g.kg <sup>-1</sup>	kcal.kg <sup>-1</sup>
Amido de milho	397.5	1590	115.5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amidodextrinado	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Minerais	35	-	35	-
Vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2.5	-	2.5	-
Total	1000	3948	1000	5358

### 3.2.3 Modelo de obesidade induzido por dieta

#### 3.2.3.1 Desenho experimental

Inicialmente os animais foram divididos em dois grupos: um deles alimentado com dieta padrão (DP), e o outro com dieta hiperlipídica (DH) por oito semanas. Depois de oito semanas os animais do grupo dieta hiperlipídica (DH) foram subdivididos aleatoriamente em outros dois grupos: DH e DH-mate. A intervenção consistiu na administração de uma dose diária de extrato aquoso de erva-mate tostada (1,0 g.kg<sup>-1</sup>) (Leão Jr. Curitiba, Paraná) por 60 dias (Tabela 4), dose previamente avaliada em trabalhos anteriores (ARÇARI et al., 2011, 2013). A erva-mate foi dissolvida diariamente em água filtrada na temperatura ambiente. Nos animais sem tratamento com erva-mate, foi administrado água filtrada. A administração do extrato aquoso de erva-mate e da água foi realizada com auxílio de uma cânula orogástrica para garantir total ingestão.

Para avaliar o ganho de peso e crescimento, os animais foram pesados, semanalmente, com auxílio de uma balança digital. O consumo alimentar foi avaliado a cada dois dias durante

toda a etapa de intervenção com a erva-mate, por meio da subtração do peso de ração colocado (ração inicial) pelo peso da ração restante na gaiola (ração final). Para se obter a quantidade ingerida por animal era ofertado ao mesmo 50g de dieta (padrão ou hiperlipídica) e após dois dias pesava-se novamente a quantidade de ração existente no comedouro. Para o cálculo de quantidade diária ingerida utilizava-se da seguinte fórmula:

$$50 \text{ g} - \text{Quant. de dieta existente no comedouro (g)} = \text{Quant. ingerida (g)/número de dias}$$

Ao final do experimento os animais foram anestesiados com uma solução 1:1 de Cetamina 100 mg/mL e Xilazina a 2% no volume de 0,1 mL para cada 100 g de peso corpóreo e sacrificados para a coleta do tecido adiposo (epididimal), que foram pesados e armazenados adequadamente em freezer -80°C para posteriores análises.

**TABELA 4. Grupos experimentais.**

Grupos	Dieta		Intervenção	Nº. animais
	8 Sem	8 Sem		
<b>Grupo I</b>	DP	DP	Água	6
<b>Grupo II</b>	DH	DH	Água	6
<b>Grupo III</b>	DH	DH	Erva-mate (1g/kg)	6

### 3.2.3.2 Avaliação da expressão dos miRNAs e genes *in vivo*

Para analisar a expressão de miRNAs selecionados, amostras de tecido adiposo epididimal foram destinadas a extração de miRNAs utilizando o kit *miRNeasy® mini kit* (QIAGEN). Posteriormente, a transcrição reversa foi realizada com o *miScript II RT* (QIAGEN). A validação destes resultados foi feita por meio de PCR em tempo real usando o *TaqMan® Micro RNA Assay* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. A avaliação da expressão dos genes e miRNAs, associados à via Wnt, foi realizada por PCR em tempo real conforme descrito anteriormente.

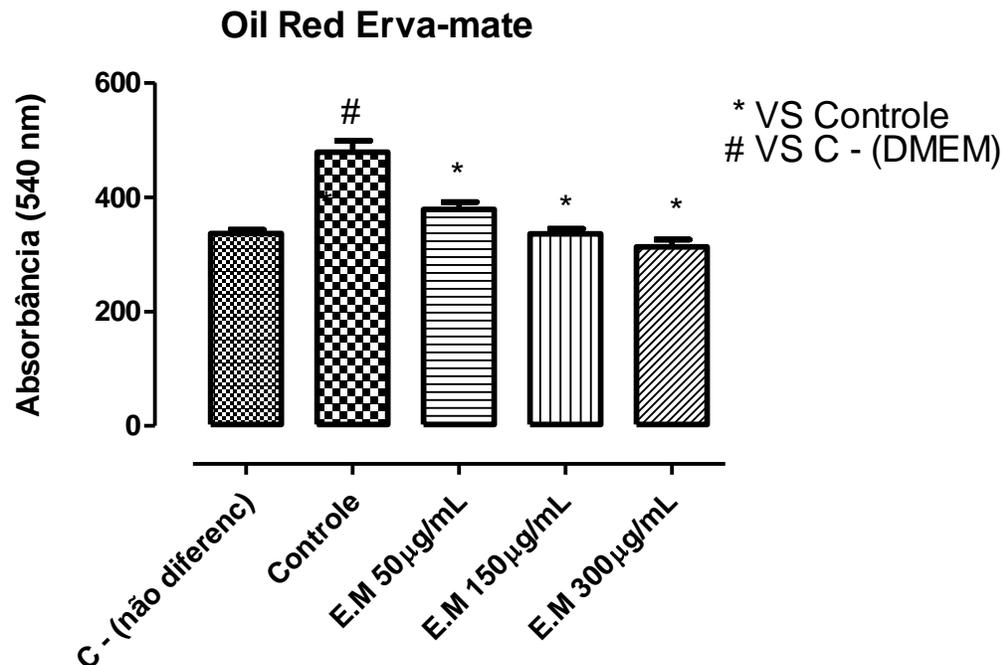
### 3.3 Análise dos Dados

Para análise dos dados foi utilizado o teste de variância (ANOVA) seguido de um teste *Post hoc* que melhor avalie cada dado coletado. Todos os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico *SPSS 12.0* (SPSS Inc., USA). A análise do *Oil Red O* foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism 5* e os valores apresentados como média  $\pm$  EPM. As análises foram realizadas através de one-way ANOVA, com pós-teste Newman Keuls (Comparação Múltipla). Os dados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Acúmulo de triacilgliceróis – *Oil Red O*

O extrato de erva-mate no presente trabalho foi utilizado nas concentrações de 50 µg/mL, 150µmg/mL e 300 µg/mL a fim de investigar a possibilidade de modulação no processo de adipogênese em cultura de pré-adipócitos 3T3-L1. As células (dia 0 ao dia 4) foram induzidas à diferenciação por meios de cultura adequados, e expostas a diferentes concentrações de erva-mate a partir do dia zero, como descrito anteriormente. Para determinar a influência deste composto no acúmulo de triacilgliceróis (TG) durante o processo de adipogênese, utilizamos o ensaio de *Oil Red O*. Como demonstrado na Figura 7, os resultados indicam que o extrato de erva-mate na concentração de 50µg/mL apresenta uma redução significativa da adipogênese (-20%,  $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle positivo (sem nenhum tratamento). Sendo assim, os resultados obtidos indicam uma redução do processo de adipogênese na etapa de diferenciação do adipócito. De uma forma geral os resultados encontrados nos ensaios com cultura de 3T3-L1, indicam que a erva-mate é capaz de reduzir do processo de adipogênese na etapa de diferenciação do adipócito (Figura 7).



**FIGURA 7. Gráfico comparativo das diferentes concentrações utilizadas na cultura celular de 3T3-L1, etapa de diferenciação.** C – (não diferenciado): células cultivadas apenas com meio DMEM. Controle: células cultivadas apenas com meio de diferenciação. EM 50µg/mL, 150µg/mL e 150µg/mL: células cultivadas com meio de diferenciação + erva-mate em diferentes concentrações. Os valores estão expressos em absorbância (540 nm) sendo apresentados em média e erro padrão da média (EPM) das triplicatas. \*p <0,05 em relação grupo Controle; # p <0,05 em relação ao controle negativo (C -DMEM).

De acordo com os dados obtidos pelo teste *Oil Red O* através da cultura de células 3T3-L1, a erva-mate parece reduzir o processo de adipogênese na etapa de diferenciação em todas as concentrações testadas (50ug/mL, 150ug/mL e 300ug/mL). Previamente, Santos et al. (2014) já demonstraram que a erva mate, associada ou não ao guaraná e a damiana (YGD – preparação contendo erva-mate, guaraná e damiana), apresenta ação na prevenção do acúmulo lipídico e nossos dados corroboram com este trabalho. Sendo assim, podemos sugerir que a erva-mate exerce função no controle do processo de adipogênese.

Além disso, estudos conduzidos por Gosmann et al. (2012) e Arçari et al. (2013) demonstraram a ação da erva-mate e de alguns de seus constituintes bioativos (ácido clorogênico, quercetina, rutina e saponinas) avaliados isoladamente, na diferenciação e maturação dos adipócitos. Gosmann e colaboradores (2012) mostraram que os compostos fenólicos (50µg/mL) e a rutina (100µg/mL) foram capazes de inibir o acúmulo de triglicerídeos em cultura de células 3T3-L1. Adicionalmente, Arçari e colaboradores (2013) mostraram que o

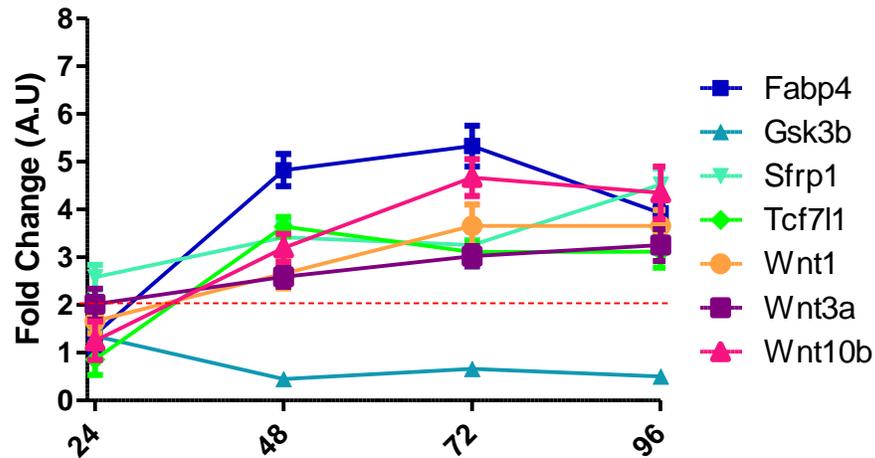
ácido clorogênico (50µg/mL, 250µg/mL e 500µg/mL) e a quercitina (250µg/mL e 500µg/mL) também foram capazes de reduzir o acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos. Apesar disto, a rutina apresentou um efeito apenas na maior concentração testada (500µg/mL). Comparado aos compostos isolados, a erva-mate foi capaz de reduzir o acúmulo de triglicerídeos em todas as concentrações avaliadas (50µg/mL, 250µg/mL e 500µg/mL), mostrando que sinergismo entre os compostos bioativos da erva-mate é responsável pela sua atuação e a uma maior redução no processo de diferenciação. Desta forma, nosso resultado do teste de *Oil Red O*, corroborou com os descritos na literatura, confirmando que a erva-mate exerce função no controle do processo de adipogênese.

#### 4.2 Expressão de genes relacionados à adipogênese

Para avaliar a influência da erva-mate nos genes associados à via Wnt que atuam na adipogênese, células provenientes da etapa de diferenciação (Dia 0 ao dia 4) foram submetidas à análise de expressão gênica conforme anteriormente descrito.

A Figura 8 mostra a influência da erva-mate (150µg/mL) na cinética de expressão de genes da via Wnt. Verifica-se que o efeito anti-adipogênico da erva-mate deve-se a um aumento na expressão de genes da via Wnt a partir de (2 dias) após a indução da adipogênese e se mantêm elevados até o final do processo. Estes resultados nos permitem concluir que, aparentemente a modulação da via Wnt ocorre desde o início da adipogênese. Esses dados também corroboram com os resultados obtidos pelo *Oil Red O*, que confirmam a supressão da adipogênese e conseqüentemente um menor acúmulo de triglicerídeos.

Para avaliar a influência da erva-mate nos genes associados à via Wnt, foi realizada uma análise de expressão gênica. Em nosso trabalho, observamos que a erva-mate é capaz de estimular a expressão de *Fabp4*, *Gsk3b*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b* e inibir a expressão de *Gsk3b* (Figura 9). Os genes da via Wnt apresentam aumento da expressão a partir de 2 dias e esta expressão é mantida elevada até o final do processo de diferenciação. Estes resultados nos permitem deduzir que, aparentemente a modulação da via Wnt ocorre desde o início da adipogênese. Além disso, estes dados podem explicar o efeito anti-adipogênico observado.



**FIGURA 8. .** Efeito da erva-mate (150 µg/mL) após dia 0, 1, 2, 3 e 4 de indução da adipogênese em células 3T3L1. As curvas acima da linha tracejada em vermelho (acima de 2 FOLD) são consideradas significativamente induzidas.

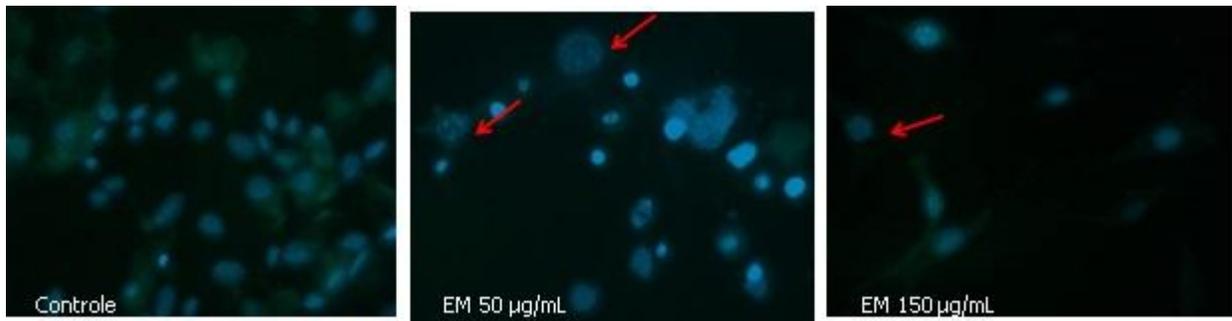
Muitos estudos demonstram que PPAR $\gamma$  é o principal regulador do processo de adipogênese e que sua manutenção é fundamental para a progressão dos estágios finais de diferenciação (TAMORI et al., 2002). A expressão dos principais reguladores da diferenciação dos adipócitos (C/EBPs e PPAR $\gamma$ ) depende fundamentalmente da ação de outras vias, genes e proteínas indispensáveis para o processo (WU et al., 1999; KOPAN; ILAGAN, 2009). Além disso, várias moléculas de sinalização, incluindo via Wnt parecem modular a adipogênese.

A sinalização da via Wnt é dependente de  $\beta$ -catenina. Sua ativação é iniciada pela ligação da W (especificamente as proteínas WNT1, WNT3a e WNT10b) a moléculas receptoras SFRP (especificamente SFRP1 e SFRP5) e aos LRP, (especificamente LRP5 e LRP6). Além disso, estudos mostram que a expressão de WNT10b estabiliza a  $\beta$ -catenina no citoplasma inibindo assim a adipogênese. Estes dados sugerem que WNT10b é a principal proteína reguladora da adipogênese, e que as proteínas WNT1 e WNT3a atuam de maneira sinérgica neste processo (Tseng et al., 2005). A ligação Wnt nas moléculas receptoras (SFRP e LRP) inibe GSK-3, resultando na hipofosforilação de  $\beta$ -catenina, que por sua vez, se transloca do citoplasma em direção ao núcleo e se liga ao fator de transcrição TCF/LEF. A ligação da  $\beta$ -catenina no receptor TCF/LEF reprime a expressão de C/EBP $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , inibindo consequentemente o processo da adipogênese (Rosen et al., 2000; Harrison & Macdougald, 2002). Dentre os fatores de transcrição da família TCF/LEF destaca-se o fator TCF7L2 conhecido também como TCF4. Alguns estudos procuram relacionar modificações em TCF7L2

e o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Kanazawa et al., 2004; Grant et al., 2006). Adipogênese é o processo de desenvolvimento pelo qual pré-adipócitos diferencia-se em um dos adipócitos maduros. Este processo envolve uma cascata altamente regulada e coordenada de fatores de transcrição, incluindo membros da PPAR, C/EBP e famílias de regulação de (SREBP), que em conjunto levam à criação do estado diferenciado (BROWN; GOLDSTEIN, 1997). Neste contexto, tem-se observado que a erva-mate modula a adipogênese por regulação dos níveis de fatores de transcrição pró-adipogênicas, tais como PPAR- $\gamma$ 2 e C/EBP- $\alpha$ , in vivo de expressão do gene e in vitro (GOSMANN et al., 2012; ARÇARI et al., 2013). C/EBP e expressão PPAR- $\gamma$ 2 depende de outros genes que são também essenciais para a adipogênese, tais como a proteína de ligação cAMP (CREB1) e (Dlk1). Estudos mostraram que a erva-mate modula a in vivo e in vitro de expressão destes genes, contribuindo assim diretamente para regulação adipogênese (ARÇARI et al., 2013).

### **4.3 Avaliação da translocação nuclear de $\beta$ -catenina**

Para testar a avaliação da translocação nuclear de  $\beta$ -catenina realizamos a imunofluorescência. A Figura 9 mostra que a erva-mate induz a translocação nuclear de  $\beta$ -catenina nas duas concentrações testadas (50 e 150  $\mu$ g/mL). Podemos observar que, nas células incubadas apenas com meio de diferenciação, isto é, sem uso de erva - mate, a  $\beta$ -catenina está evidente no citosol. No entanto, em ambas as concentrações de erva-mate testadas (50 e 150  $\mu$ g/mL), as células apresentam menor quantidade de  $\beta$ -catenina no citosol. Estes resultados sugerem que é possível que a erva-mate esteja associada ao aumento da translocação nuclear de  $\beta$ -catenina.



**FIGURA 9. Efeito da erva-mate (50 e 150 µg/mL) (após dia 0, 1, 2,3 e 4) na translocação nuclear de β-catenina em células 3T3-L1.** A imunocoloração de β-catenina foi realizada usando biotina acoplada com anticorpo secundário (verde) e DAPI para coloração de núcleo (azul); a translocação nuclear do citosol para o núcleo é apontado pelas setas vermelhas (200 X).

A demonstração de que falhas na sinalização da via Wnt/β-catenina poderia induzir a adipogênese espontaneamente indica que, por outro lado, a expressão endógena de Wnt poderia restringir este processo (ROSS et al., 2000). Um provável candidato para este efeito anti-adipogênico é *Wnt10b*, cuja expressão é alta em pré-adipócitos, e diminui rapidamente após a indução da diferenciação. Tem sido reportado que a indução de *Wnt10b* em pré-adipócitos estabiliza β-catenina, e bloqueia a adipogênese (MANDRUP; LANE, 1997; BENNETT et al., 2002).

É sabido que a β-catenina é um importante regulador do processo de adipogênese. Macdougald & Mandrup (2002) demonstraram que WNT10b é capaz de reprimir este processo em células 3T3-L1 via Wnt por mecanismos dependentes de β-catenina. As proteínas WNTs também parecem inibir a diferenciação do pré-adipócito por meio de mecanismos semelhantes. No presente trabalho, é possível observar que a erva-mate induz a translocação nuclear de β-catenina e atua nos mecanismos dependentes da ativação desta via (Figura 8).

Sabe-se que quando a via de sinalização de Wnt está ativa, Gsk3b é inibido, o que permite o acúmulo de β-catenina no citosol favorecendo sua translocação para o núcleo, e sua ligação a fatores de transcrição da família TCF (como Tcf7l2, por exemplo) ativando a expressão diversos genes.

#### 4.4 Expressão de miRNAs relacionados à adipogênese

Foram escolhidos doze miRNAs para o desenvolvimento deste trabalho. Tendo em vista os resultados encontrados em relação à regulação da via Wnt pela erva-mate, selecionou-se miRNAs que regulassem genes desta via. A Tabela 5 mostra a expressão dos miRNAs e de seus alvos moleculares.

Levando em consideração a concordância de associação entre o miRNA e seu gene alvo, somente os miR-760-5p e miR-27b-3p parecem regular genes da via Wnt (Tabela 5).

Nos resultados obtidos *in vitro*, observamos que o tratamento com erva-mate foi capaz de modificar a expressão dos genes da via Wnt associados à obesidade como: *Fabp4*, *Gsk3b*, *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*. O tratamento com extrato aquoso de erva-mate foi capaz de aumentar significativamente a expressão dos genes *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1* e *Wnt3a*. Acredita-se que o composto poderia atuar nos fatores de transcrição, modulando a via Wnt e alterando a expressão de genes e proteínas envolvidos na obesidade.

Muito embora a obesidade module a expressão dos miRNAs selecionados, verificamos que somente alguns miRNAs foram modulados pela erva-mate, a saber: miR-3094-3p, miR-1192, miR-760-5p e miR-27b-3p. Levando em consideração a concordância de associação entre o miRNA e seu gene alvo, somente os miR-760-5p e miR-27b-3p parecem regular genes da via WNT (Tabela 5). Porém, por se tratar de um estudo inédito, outras pesquisas necessitam ser realizadas, visto que na literatura não existe trabalhos que investiguem a interação da erva-mate com os genes envolvidos com o processo de adipogênese.

TABELA 5. miRNAs e seus genes WNT alvo in vitro

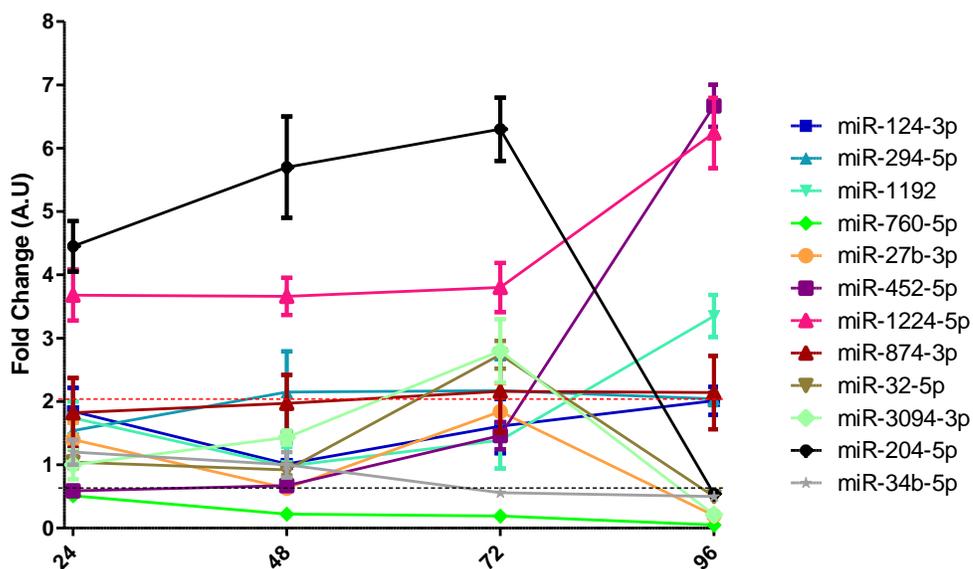
Genes	<i>Fold</i> *	miRNAs											
		124-3p	294-5p	1192	1224-5p	760-5p	27b-3p	452-5p	874-3p	32-5p	3094-3p	204-5p	34b-5p
<i>Fabp4</i>	3,92												-3,52
<i>Gsk3<math>\beta</math></i>	-1,98	2,01		3,35				6,67	2,14				-3,52
<i>Srfp1</i>	4,52						<u>-2,06</u>						
<i>Tcf7l2</i>	3,11	2,01		3,35			<u>-2,06</u>			-2,52		-2,01	
<i>Wnt1</i>	3,65					<u>-5,55</u>							
<i>Wnt3a</i>	3,25			3,35			<u>-2,06</u>						
<i>Wnt10b</i>	4,35												-2,03
*			2,04		-2,01								

Valores de *Fold* acima de 2 e abaixo de 0,5 foram considerados significativos. \* gene alvo não avaliado. Os dados sublinhados indicam concordância de expressão entre o miRNA e seu gene alvo.

Os dados apresentados na Figura 10 ilustram a influência da erva-mate na cinética de expressão dos miRNAs selecionados. Verifica-se que o efeito da erva-mate na expressão destes miRNAs é muito variável. Há uma resposta constante somente nos miR-294-5p, miR-874 (alvo *Gsk3b*), e miR-760-5p (alvo *Wnt1*). Deste modo, exceção feita a estes miRNAs, não podemos inferir que a regulação da expressão gênica foi modulada por miRNAs (induzidos por erva-mate) durante a adipogênese.

É sabido que os miRNAs são capazes de promover diferenciação de adipócitos (HUANG et al., 2011), a sinalização de alguns genes e a estimulação da diferenciação de adipócitos por meio da inibição da ligação 3'-UTR do miRNA (SON et al., 2014). Neste trabalho, além da avaliação da expressão dos genes *Fabp4*, *Sfrp1*, *Gsk3b*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*, determinamos também a expressão de seus respectivos miRNAs (Tabela 5). Como mostrado na Figura 10, a erva-mate parece reprimir os mmu-miR 452, mmu-miR 760-5p, mmu-miR34b-5p, mmu-miR 124-3 e mmu-miR27b-3p, apesar do efeito deste composto apresentar-se bastante variável. Há uma resposta constante somente nos miR-294-5p, miR-874 (alvo *Gsk3b*), e miR-760-5p (alvo *Wnt1*). Desse modo, exceção feita aos miRNAs que apresentam expressão mais constante, não podemos inferir que a regulação da expressão gênica foi modulada por miRNAs durante a adipogênese. Por se tratar de um estudo inédito, não há nenhum trabalho na literatura científica que corrobore com este achado. Por este motivo, torna-se necessário a realização de mais pesquisas que visem delinear o papel dos miR-294-5p, miR-874 (alvo *Gsk3b*), miR-760-5p (alvo *Wnt1*) na diferenciação de adipócitos.

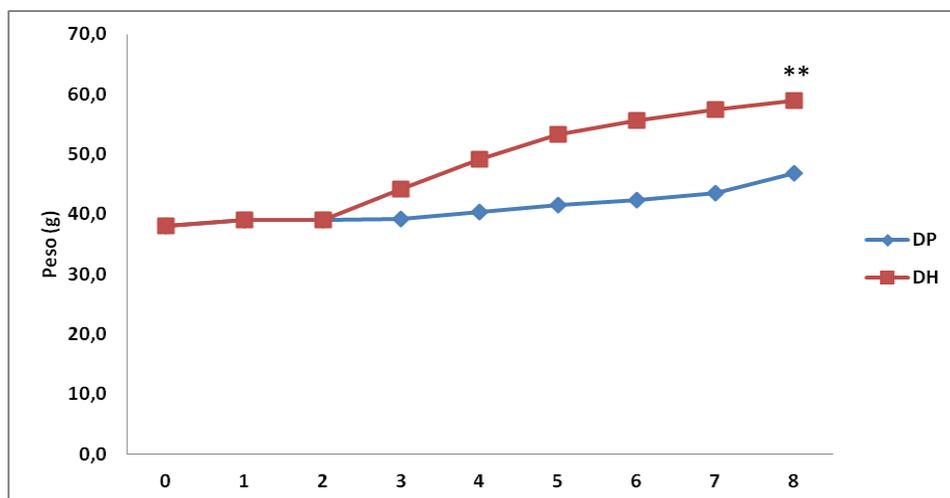
Por outro lado, dados da literatura mostram miRNAs são capazes de modular diferentes genes que controlam o processo de diferenciação dos adipócitos. Muitos deles parecem modular especificamente a expressão de  $PPAR\gamma$  (KIM et al., 2010). Análises de bioinformática sugerem que os miR-27 e miR130a podem ter com alvo  $PPAR\gamma$  região 3' não traduzida (UTR). Em células 3T3-L1, os níveis de miR-27a e miR-130a são gradualmente diminuídos durante a adipogênese, a qual inversamente correlacionada com a expressão de  $PPAR\gamma$ . Estes resultados sugerem que tanto miR-27a quanto miR-130a, regulam negativamente a expressão de  $PPAR\gamma$  (LEE et al., 2003; LUND et al., 2004). Por se tratar de miRNAs que não entraram no objetivo deste trabalho, sugerimos que estes possam ser novos alvos em pesquisas futuras realizadas por nosso grupo de pesquisa.



**FIGURA 10. Efeito da erva-mate (100 µg/mL) após dia 0, 1,2,3 e 4 de indução da adipogênese em células 3T3L1.** As amostras acima da linha tracejada em vermelho (acima de 2 FOLD) foram consideradas significativamente induzidas e as amostras abaixo da linha tracejada de preto (abaixo de 0,5 FOLD) foram consideradas significativamente reprimidas.

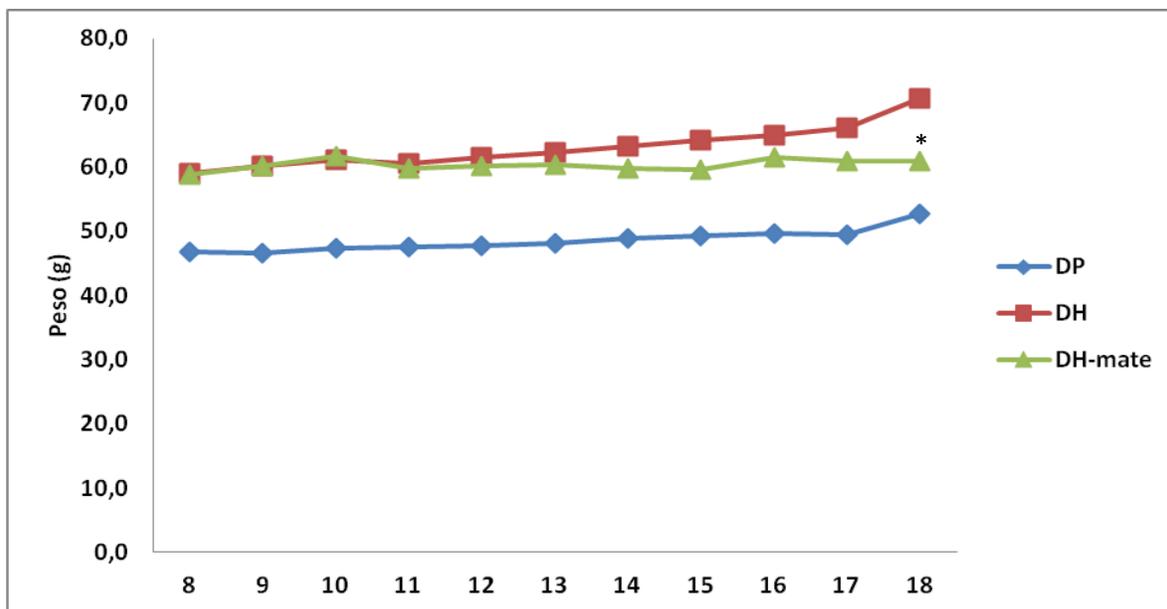
#### 4.5 Efeitos da erva-mate na adipogênese in vivo

Após 8 semanas de dieta, os animais do grupo que receberam dieta hiperlipídica (DH) já apresentavam significativamente maior peso corporal quando comparados com os animais do grupo controle (Dieta Padrão - DP) (Figura 11).



**FIGURA 11. Evolução de peso dos animais nas primeiras 8 semanas.** DP – dieta padrão (n=6) e DH – dieta hiperlipídica (n=12). \*\*p<0,01, quando comparado ao grupo DP.

Após os 60 dias de intervenção com erva-mate na concentração de  $1,0 \text{ g.Kg}^{-1}$ , observamos uma modificação significativa no peso corporal dos animais do grupo DH + Mate.



**FIGURA 12. Evolução de peso dos animais durante as 8 semanas de intervenção.** DP – dieta padrão (n=6); DH – dieta hiperlipídica (n=6) e DH-Mate – dieta hiperlipídica com intervenção com erva-mate (n=6). \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo DH.

Os dados mostram que o tratamento com erva-mate, mesmo quando associado ao consumo de uma dieta hiperlipídica, levou a uma redução significativa no peso corporal total dos camundongos (Grupo DH-mate) quando comparados com animais que receberam a mesma dieta, mas que receberam apenas água (Grupo DH).

**TABELA 6. Dados composição corporal, consumo alimentar e adiposidade dos animais.**

Group	DP (n=6)	DH (n=6)	DH-Mate (n=6)
Peso (g)	$52.80 \pm 3.44$	$70.72 \pm 6.73^*$	$60.12 \pm 5.70^\#$
Ganho de peso (%)	$39.95 \pm 2.18$	$90.99 \pm 3.58^*$	$56.41 \pm 5.47^\#$
Ingestão (g/dia)	$3.22 \pm 0.65$	$2.78 \pm 0,45$	$2.75 \pm 0.38$
Ingestão ( $\text{Kcal.g}^{-1}/\text{dia}$ )	12.71	14.89	14.73
Gordura epididimal (g)	$0.96 \pm 0.32$	$2.37 \pm 0.39^*$	$1.40 \pm 0.44^\#$

\*  $p < 0.05$  comparado com o grupo DP.  $^\# p < 0.05$  comparado com o grupo DH

No modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos, observamos que a erva-mate foi capaz de melhorar o ganho de peso e a quantidade de gordura epididimal. Estes dados corroboram com diversos outros trabalhos da literatura, que utilizaram diversos modelos experimentais de obesidade (PANG; CHOI; PARK, 2008; ARÇARI et al., 2011, 2013; LIMA et al., 2014).

No presente estudo sugerimos que a perda de peso e a diminuição dos depósitos de gordura epididimal, nos animais submetidos à dieta hiperlipídica tratados com o extrato aquoso de erva-mate, pode ser atribuído a função da ação da erva-mate na modulação de diferentes genes que controlam o processo de diferenciação dos adipócitos (Pang et al., 2008; Arçari et al., 2009)

Além dos dados da composição corporal, avaliamos também a expressão gênica e de miRNAs nas amostras do tecido adiposo (epididimal) dos animais do modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e dieta com tratamento de erva-mate. Observamos que a obesidade apresentada por estes camundongos reprime significativamente a expressão de diversos genes que regulam a via Wnt, a saber: *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*. A intervenção com erva-mate, por sua vez, é capaz de aumentar significativamente a expressão de todos esses genes, exceção feita ao *Fabp4*. A Tabela 7 ilustra estes dados.

Em relação aos miRNAs, muito embora a obesidade module a expressão dos miRNAs selecionados, verificamos que somente alguns miRNAs foram modulados pela erva-mate, a saber: miR-3094-3p, miR-1192, miR-760-5p e miR-27b-3p.

Levando em consideração a concordância de associação entre o miRNA e seu gene alvo, somente os miR-760-5p e miR-27b-3p parecem regular genes da via Wnt (Tabela 7).

TABELA 7. Genes WNT e miRNAs avaliados.

Genes	miR Fold* induction												
	Fold*	124-3p	294-5p	1192	1224-5p	760-5p	27b-3p	452-5p	874-3p	32-5p	3094-3p	204-5p	34b-5p
<i>Fabp4</i>	1,86 ± 0,72										0,38±0,10		
<i>Gsk3β</i>	0,94 ± 0,15	0,73±0,37		2,02±0,81				1,76±0,64	1,02±0,13		0,38±0,10		
<i>Srfp1</i>	4,74 ± 0,91						<u>0,42±0,08</u>						
<i>Tcf7l2</i>	0,89 ± 0,06	0,73±0,37		2,02±0,81			0,42±0,08			1,03±0,66		0,83±0,73	
<i>Wnt1</i>	5,44 ± 0,85					<u>0,35±0,09</u>							
<i>Wnt3a</i>	3,77 ± 0,59			2,02±0,81			<u>0,42±0,08</u>						
<i>Wnt10b</i>	6,96 ± 0,55												0,90±0,7
**			1,64±0,61		1,50±0,37								

\* O Fold foi calculado seguindo a seguinte fórmula  $2^{-\Delta Ct (DH-Mate) / 2^{-\Delta Ct (DH)}}$ . Valores de *Fold* acima de 2 e abaixo de 0,5 foram considerados significativos. \*\* Gene alvo não avaliado. Os dados sublinhados indicam concordância de expressão entre o miR e seu gene alvo.

A fim de investigar se os resultados obtidos *in vitro* se reproduziriam *in vivo*, determinamos a expressão dos mesmos genes e miRNAs que foram avaliados em cultura celular. Com isso, observamos que o tratamento com erva-mate foi capaz de modificar a expressão dos genes da via Wnt associados à obesidade como: *Fabp4*, *Gsk3b*, *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*. O tratamento com extrato aquoso de erva-mate foi capaz de aumentar significativamente a expressão de todos esses genes estudados, com exceção do *Fabp4* (Tabela 8). Acredita-se que a ingestão deste composto poderia atuar nos fatores de transcrição, modulando a via Wnt e alterando a expressão de genes e proteínas envolvidos na obesidade.

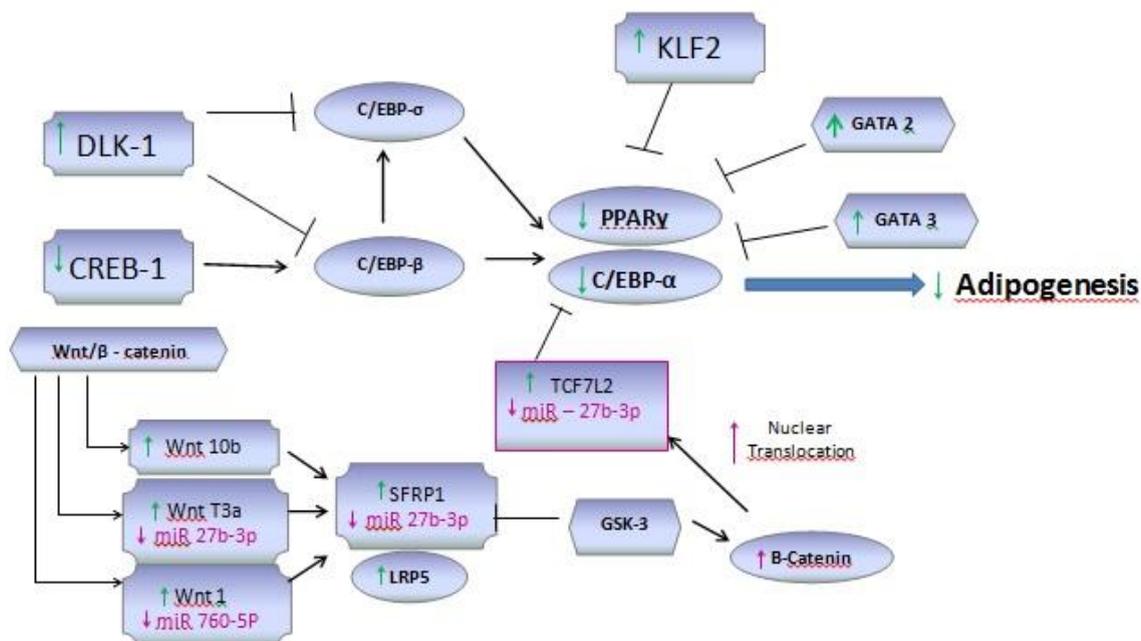
Muito embora a obesidade module a expressão dos miRNAs selecionados, verificamos que somente alguns miRNAs foram modulados pela erva-mate, a saber: miR-3094-3p, miR-1192, miR-760-5p e miR-27b-3p. Levando em consideração a concordância de associação entre o miRNA e seu gene alvo, somente os miR-760-5p e miR-27b-3p parecem regular genes da via Wnt (Tabela 8). Porém, por se tratar de um estudo inédito, outras pesquisas necessitam ser realizadas, visto que na literatura não existe trabalhos que investiguem a interação da erva-mate com os genes envolvidos com o processo de adipogênese.

Em síntese, observamos que a erva-mate foi capaz de modular diversos genes associados à adipogênese bem alguns miRNAs envolvidos neste processo, que contribuíram significativamente para a redução do acúmulo lipídico observado no teste *Oil Red O*. *In vivo*, o tratamento com extrato aquoso de erva-mate, foi capaz de melhorar o ganho de peso corporal, o acúmulo de gordura epididimal e também a expressão de diversos genes e miRNAs envolvidos com a adipogênese.

Por fim, os resultados encontrados neste trabalho são importantes para caracterizar o mecanismo de ação da erva-mate *in vitro* e *in vivo*, bem como o seu papel na regulação de diversos genes e miRNAs envolvidos com o processo de adipogênese *in vitro* e *in vivo*.

Estudos recentes comprovam que a erva-mate pode modular diversos genes envolvidos com o processo de adipogênese. Como mostra a figura abaixo, PPAR $\gamma$  e C/EBP's que são os precursores da adipogênese são inibidos após a intervenção com erva-mate. Pode-se observar também que houve modulação da via Wnt/ $\beta$ -catenina nos genes *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b* e seus receptores SFRP1 e LRP5 (GAMBERO; RIBEIRO, 2015). Dados do presente trabalho mostram que o miRNA 27b-3p é capaz

de regular genes como *Wnt3a*, *SFRP1* e *TCFL2* e o miRNA 760-5p parece regular o gene *Wnt1*. A figura 13 mostra estas possíveis interações.



**FIGURA 13.** Efeito *in vitro* e *in vivo* da erva-mate na adipogênese e interações com miRNAs. Fonte: Adaptado de (GAMBERO; RIBEIRO, 2015)

## 5. CONCLUSÃO

A erva-mate apresenta diversos efeitos benéficos como já demonstrado na literatura e descrito neste trabalho.

Observamos que o tratamento com extrato aquoso de erva-mate em células 3T3-L1 foi capaz de reverter o acúmulo de triglicérides e a expressão de diversos genes envolvidos com as etapas da adipogênese, bem como a expressão de miRNAs que possuem como alvo a via Wnt.

A expressão dos genes: *Fabp4*, *Gsk3b*, *Sfrp1*, *Tcf7l2*, *Wnt1*, *Wnt3a* e *Wnt10b*; em 0, 1, 2, 3 e 4 dias em células 3T3L1 tratadas com extrato aquoso de erva-mate foi capaz de modular diversos genes associados a adipogênese após 4 dias de intervenção com o composto.

A expressão dos miRNAs: mmu-miR-27b-3, mmmu-miR-760-5p, em 0, 1, 2, 3 e 4 dias em células 3T3L1 tratadas com extrato aquoso de erva-mate foi capaz de modular alguns miRNAs envolvidos neste processo de adipogênese após 4 dias de intervenção com o composto.

Os efeitos anti-adipogênicos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na expressão de genes e miRNAs associados à adipogênese na via Wnt no modelo animal corroboraram com os dados encontrados no experimento *in vitro*.

Além dos efeitos benéficos no controle do peso e nos depósitos de gordura epididimal, a erva-mate foi capaz de reprimir diversos genes envolvidos da via Wnt, bem como alguns miRNAs que possuem como alvo genes envolvidos com esta via.

Sendo assim, este trabalho demonstrou um papel da erva-mate na modulação de miRNAs ainda pouco estudado na literatura, mostrando que ela pode exercer um importante controle metabólico e da obesidade, principalmente quando relacionada à adipogênese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELSON, P.; KENNEDY, D. The obesity epidemic. **Science (New York, N.Y.)**, v. 304, n. 5676, p. 1413, 4 jun. 2004.

ALMIND, K.; MANIERI, M.; SIVITZ, W. I.; CINTI, S.; KAHN, C. R. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2366–71, 13 fev. 2007.

ANDERSEN, T.; FOGH, J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association**, v. 14, n. 3, p. 243–50, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11424516>>. Acesso em: 27 out. 2015.

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; DEOLIVEIRA, C. C.; GOTARDO, É. M.; PEDRAZZOLI, J.; GAMBERO, A.; FERRAZ, L. F. C.; CARVALHO, P. de O.; RIBEIRO, M. L. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110–115, 2011a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720711000244>>.

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; DEOLIVEIRA, C. C.; GOTARDO, É. M.; PEDRAZZOLI, J.; GAMBERO, A.; FERRAZ, L. F. C.; CARVALHO, P. de O.; RIBEIRO, M. L. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110–5, 30 mar. 2011b.

ARÇARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; FUNCK, A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M. F. F.; SAAD, M. J.; BASTOS, D. H. M.; GAMBERO, A.; CARVALHO, P. de O.; RIBEIRO, M. L. Antiobesity Effects of yerba maté Extract (*Ilex paraguariensis*) in High-fat Diet-induced Obese Mice. **Obesity**, v. 17, n. 12, p. 2127–2133, 14 maio 2009.

ARÇARI, D. P.; SANTOS, J. C.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809–15, 15 nov. 2013.

AVRAM, M. M.; AVRAM, A. S.; JAMES, W. D. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 472–92, mar. 2007.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*)

extracts. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 423–32, jan. 2007.

BENNETT, C. N.; ROSS, S. E.; LONGO, K. A.; BAJNOK, L.; HEMATI, N.; JOHNSON, K. W.; HARRISON, S. D.; MACDOUGALD, O. A. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30998–1004, 23 ago. 2002.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363–6, 18 jan. 2001.

BORUGIAN, M. J.; SHEPS, S. B.; KIM-SING, C.; OLIVOTTO, I. A.; VAN PATTEN, C.; DUNN, B. P.; COLDMAN, A. J.; POTTER, J. D.; GALLAGHER, R. P.; HISLOP, T. G. Waist-to-hip ratio and breast cancer mortality. **American journal of epidemiology**, v. 158, n. 10, p. 963–8, 15 nov. 2003.

BRACESCO, N.; DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.; NUNES, E. Antioxidant Activity of a Botanical Extract Preparation of Ilex Paraguariensis: Prevention of DNA Double-Strand Breaks in Saccharomyces Cerevisiae and Human Low-Density Lipoprotein Oxidation. **Journal of alternative and complementary medicine (New York, N.Y.)**, v. 9, n. 3, p. 379–87, 5 jun. 2003.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on Ilex paraguariensis research: minireview. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–84, 14 jul. 2011.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 331–40, 2 maio 1997.

BULLÓ, M.; GARCÍA-LORDA, P.; MEGIAS, I.; SALAS-SALVADÓ, J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obesity research**, v. 11, n. 4, p. 525–31, abr. 2003.

CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 17, p. 1625–38, 24 abr. 2003.

CANOY, D.; BOEKHOLDT, S. M.; WAREHAM, N.; LUBEN, R.; WELCH, A.; BINGHAM, S.; BUCHAN, I.; DAY, N.; KHAW, K.-T. Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk cohort: a population-based prospective study. **Circulation**, v. 116, n. 25, p. 2933–43, 18 dez. 2007.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642–55, 20 fev. 2009.

CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **TheScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2391–402, jan. 2011.

CHANDRA, S.; DE MEJIA GONZALEZ, E. Polyphenolic compounds, antioxidant

capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583–9, 2 jun. 2004.

DAY, F. R.; LOOS, R. J. F. Developments in obesity genetics in the era of genome-wide association studies. **Journal of nutrigenetics and nutrigenomics**, v. 4, n. 4, p. 222–38, jan. 2011.

DEFRONZO, R. A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. **International journal of clinical practice. Supplement**, n. 143, p. 9–21, out. 2004.

FAJAS, L. Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. **Annals of medicine**, v. 35, n. 2, p. 79–85, jan. 2003.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774–8, nov. 2001.

FILIP, R.; LOTITO, S. B.; FERRARO, G.; FRAGA, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437–1446, out. 2000.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216–229, 2006.

FOX, K. E.; FANKELL, D. M.; ERICKSON, P. F.; MAJKA, S. M.; CROSSNO, J. T.; KLEMM, D. J. Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40341–53, 29 dez. 2006.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–61, dez. 2004.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–50, jan. 2015a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4344557&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 dez. 2015.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The Positive Effects of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) in Obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–50, 22 jan. 2015b. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/7/2/730/html>>. Acesso em: 7 dez. 2015.

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., aquifoliaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 304–307, abr. 2007.

GOSMANN, G.; BARLETTE, A. G.; DHAMER, T.; ARÇARI, D. P.; SANTOS, J. C.; DE CAMARGO, E. R.; ACEDO, S.; GAMBERO, A.; GNOATTO, S. C. B.; RIBEIRO, M. L.

Phenolic compounds from maté (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 67, n. 2, p. 156–61, 28 jun. 2012.

GRANT, S. F. A.; THORLEIFSSON, G.; REYNISDOTTIR, I.; BENEDIKTSSON, R.; MANOLESCU, A.; SAINZ, J.; HELGASON, A.; STEFANSSON, H.; EMILSSON, V.; HELGADOTTIR, A.; STYRKARSDOTTIR, U.; MAGNUSSON, K. P.; WALTERS, G. B.; PALSDOTTIR, E.; JONSDOTTIR, T.; GUDMUNDSDOTTIR, T.; GYLFASON, A.; SAEMUNDSDOTTIR, J.; WILENSKY, R. L.; REILLY, M. P.; RADER, D. J.; BAGGER, Y.; CHRISTIANSEN, C.; GUDNASON, V.; SIGURDSSON, G.; THORSTEINSDOTTIR, U.; GULCHER, J. R.; KONG, A.; STEFANSSON, K. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. **Nature genetics**, v. 38, n. 3, p. 320–3, mar. 2006.

GREGOIRE, F. M.; SMAS, C. M.; SUL, H. S. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological reviews**, v. 78, n. 3, p. 783–809, jul. 1998.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 224, n. 2, p. 338–44, 16 jul. 1996.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, v. 72, n. 3, p. 279–292, dez. 2002.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 35, n. 1, p. 47–56, jan. 1995.

GUO, H.; INGOLIA, N. T.; WEISSMAN, J. S.; BARTEL, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835–40, 12 ago. 2010.

GUZIK, T. J.; MANGALAT, D.; KORBUT, R. Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function? **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 57, n. 4, p. 505–28, dez. 2006.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de fisiología médica**. [s.l.: s.n.]

HAUSMAN, D. B.; DIGIROLAMO, M.; BARTNESS, T. J.; HAUSMAN, G. J.; MARTIN, R. J. The biology of white adipocyte proliferation. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 2, n. 4, p. 239–54, nov. 2001.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of food science**, v. 72, n. 9, p. R138–51, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034743>>.

HUANG, H.-Y.; HU, L.-L.; SONG, T.-J.; LI, X.; HE, Q.; SUN, X.; LI, Y.-M.; LU, H.-J.;

- YANG, P.-Y.; TANG, Q.-Q. Involvement of cytoskeleton-associated proteins in the commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to adipocyte lineage induced by BMP2/4. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 10, n. 1, p. M110.002691, jan. 2011.
- HULSMANS, M.; DE KEYZER, D.; HOLVOET, P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 8, p. 2515–2527, 20 abr. 2011.
- HUSSEIN, G. M. E.; MATSUDA, H.; NAKAMURA, S.; AKIYAMA, T.; TAMURA, K.; YOSHIKAWA, M. Protective and ameliorative effects of maté (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 88–97, 15 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018902>>. Acesso em: 9 jan. 2016.
- JOHNSON, W.; CHOH, A. C.; LEE, M.; TOWNE, B.; CZERWINSKI, S. A.; DEMERATH, E. W. Is infant body mass index associated with adulthood body composition trajectories? An exploratory analysis. **Pediatric obesity**, 12 jan. 2016.
- KANAZAWA, A.; TSUKADA, S.; SEKINE, A.; TSUNODA, T.; TAKAHASHI, A.; KASHIWAGI, A.; TANAKA, Y.; BABAZONO, T.; MATSUDA, M.; KAKU, K.; IWAMOTO, Y.; KAWAMORI, R.; KIKKAWA, R.; NAKAMURA, Y.; MAEDA, S. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. **American journal of human genetics**, v. 75, n. 5, p. 832–43, nov. 2004.
- KANG, Y.-R.; LEE, H.-Y.; KIM, J.-H.; MOON, D.-I.; SEO, M.-Y.; PARK, S.-H.; CHOI, K.-H.; KIM, C.-R.; KIM, S.-H.; OH, J.-H.; CHO, S.-W.; KIM, S.-Y.; KIM, M.-G.; CHAE, S.-W.; KIM, O.; OH, H.-G. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory animal research**, v. 28, n. 1, p. 23–9, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3315195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 nov. 2015.
- KELLER, P.; GBURCIK, V.; PETROVIC, N.; GALLAGHER, I. J.; NEDERGAARD, J.; CANNON, B.; TIMMONS, J. A. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. **BMC endocrine disorders**, v. 11, p. 7, jan. 2011.
- KIM, S. Y.; KIM, A. Y.; LEE, H. W.; SON, Y. H.; LEE, G. Y.; LEE, J.-W.; LEE, Y. S.; KIM, J. B. miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPARgamma expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 392, n. 3, p. 323–8, 12 mar. 2010.
- KIMELMAN, D.; XU, W. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. **Oncogene**, v. 25, n. 57, p. 7482–91, 4 dez. 2006.
- KOPAN, R.; ILAGAN, M. X. G. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. **Cell**, v. 137, n. 2, p. 216–33, 17 abr. 2009.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635–43, 6 abr. 2000.

KRISHNAN, V. Regulation of bone mass by Wnt signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1202–1209, 1 maio 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1451219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

KUHN, D. E.; MARTIN, M. M.; FELDMAN, D. S.; TERRY, A. V.; NUOVO, G. J.; ELTON, T. S. Experimental validation of miRNA targets. **Methods**, v. 44, n. 1, p. 47–54, jan. 2008.

KUMANYIKA, S. K. Minisymposium on Obesity: Overview and Some Strategic Considerations. **Annual Review of Public Health**, v. 22, n. 1, p. 293–308, maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274523>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

KUNEJ, T.; GODNIC, I.; FERDIN, J.; HORVAT, S.; DOVC, P.; CALIN, G. A. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: An integrated review of literature. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, n. 1-2, p. 77–84, 1 dez. 2011.

LARGE, V.; PERONI, O.; LETEXIER, D.; RAY, H.; BEYLOT, M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. **Diabetes & metabolism**, v. 30, n. 4, p. 294–309, set. 2004.

LEE, B. C.; LEE, J. **Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2014. .

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RÅDMARK, O.; KIM, S.; KIM, V. N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415–9, 25 set. 2003.

LIMA, N. D. S.; FRANCO, J. G.; PEIXOTO-SILVA, N.; MAIA, L. a.; KAEZER, A.; FELZENSZWALB, I.; DE OLIVEIRA, E.; DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Ilex paraguariensis (yerba mate) improves endocrine and metabolic disorders in obese rats primed by early weaning. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 73–82, 2014.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419–27, jul. 2005.

LUND, E.; GÜTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J. E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5654, p. 95–8, 2 jan. 2004.

MACDOUGALD, O. A.; MANDRUP, S. Adipogenesis: forces that tip the scales. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 13, n. 1, p. 5–11, jan.

MANDRUP, S.; LANE, M. D. Regulating adipogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 9, p. 5367–70, 28 fev. 1997.

MATSUZAWA, Y.; FUNAHASHI, T.; KIHARA, S.; SHIMOMURA, I. Adiponectin and

metabolic syndrome. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 1, p. 29–33, jan. 2004.

MIRANDA, D. D. C.; ARCARI, D. P.; PEDRAZZOLI, J.; CARVALHO, P. d. O.; CERUTTI, S. M.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 261–265, 27 fev. 2008a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308716>>. Acesso em: 5 out. 2015.

MIRANDA, D. D. C.; ARCARI, D. P.; PEDRAZZOLI, J.; CARVALHO, P. d. O.; CERUTTI, S. M.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 261–265, 27 fev. 2008b.

MOKDAD, A. H.; FORD, E. S.; BOWMAN, B. A.; DIETZ, W. H.; VINICOR, F.; BALES, V. S.; MARKS, J. S. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **JAMA**, v. 289, n. 1, p. 76–9, 1 jan. 2003.

MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L.; POPKIN, B. M. The burden of disease from undernutrition and overnutrition in countries undergoing rapid nutrition transition: a view from Brazil. **American journal of public health**, v. 94, n. 3, p. 433–4, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1448269&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 59–70, jan. 2006.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **The Journal of endocrinology**, n. July, p. 1–35, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006217>>.

MUCCILLO BAISCH, A. .; JOHNSTON, K. .; PAGANINI STEIN, F. . Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 133–139, mar. 1998.

NTAMBI, J. M.; YOUNG-CHEUL, K. Adipocyte Differentiation and Gene Expression. **J. Nutr.**, v. 130, n. 12, p. 3122S–3126, 1 dez. 2000.

OLIVEIRA-CARVALHO, V.; CARVALHO, V. O.; SILVA, M. M.; GUIMARÃES, G. V.; BOCCHI, E. A. MicroRNAs: um novo paradigma no tratamento e diagnóstico da insuficiência cardíaca? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 4, p. 362–370, abr. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2012000400011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2012000400011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 8 jan. 2016.

ORTEGA, F. J.; MORENO-NAVARRETE, J. M.; PARDO, G.; SABATER, M.; HUMMEL, M.; FERRER, A.; RODRIGUEZ-HERMOSA, J. I.; RUIZ, B.; RICART, W.;

PERAL, B.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9022, jan. 2010.

PAGANINI STEIN, F. L.; SCHMIDT, B.; FURLONG, E. B.; SOUZA-SOARES, L. A.; SOARES, M. C. F.; VAZ, M. R. C.; MUCCILLO BAISCH, A. L. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological research for nursing**, v. 7, n. 2, p. 146–56, out. 2005a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267376>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

PAGANINI STEIN, F. L.; SCHMIDT, B.; FURLONG, E. B.; SOUZA-SOARES, L. A.; SOARES, M. C. F.; VAZ, M. R. C.; MUCCILLO BAISCH, A. L. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological research for nursing**, v. 7, n. 2, p. 146–56, 1 out. 2005b.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 476, n. 2, p. 178–85, 15 ago. 2008.

PEREIRA, D. F.; KAPPEL, V. D.; CAZAROLLI, L. H.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; GUESSER, S. M.; DA SILVA, E. L.; SILVA, F. R. M. B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868–877, 15 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22795927>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

PIMENTEL, G. D.; LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; CARIS, A. V.; PINHEIRO, F.; RIBEIRO, E. B.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M.; OYAMA, L. M. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 809–18, maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841395>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

RADULESCU, S.; RIDGWAY, R. A.; CORDERO, J.; ATHINEOS, D.; SALGUEIRO, P.; POULSOM, R.; NEUMANN, J.; JUNG, A.; PATEL, S.; WOODGETT, J.; BARKER, N.; PRITCHARD, D. M.; OIEN, K.; SANSOM, O. J. Acute WNT signalling activation perturbs differentiation within the adult stomach and rapidly leads to tumour formation. **Oncogene**, v. 32, n. 16, p. 2048–57, 18 abr. 2013.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation research**, v. 554, n. 1-2, p. 53–65, 4 out. 2004.

REUSCH, J. E.; COLTON, L. A.; KLEMM, D. J. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 3, p. 1008–20, fev. 2000.

RIBEIRO, M. Q.; CÉSARO, Á. de; ZANCANARO, V.; SANTOS, P. **Efeitos da ingestão crônica de extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*) preparado na forma de “chimarrão” sobre os níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose** *Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde*, 10 maio 2012.

RIL, F. T.; RONSONI LOCH, C.; VALDUGA, A. T.; DIAS MACEDO, S. M.; CICHOSKI, A. J. Nota Científica: Perfil bioquímico de ratos alimentados com iogurte contendo extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 04, p. 332–337, 9 dez. 2011.

ROSEN, E. D.; WALKEY, C. J.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes & development**, v. 14, n. 11, p. 1293–307, 1 jun. 2000.

ROSS, S. E.; HEMATI, N.; LONGO, K. A.; BENNETT, C. N.; LUCAS, P. C.; ERICKSON, R. L.; MACDOUGALD, O. A. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5481, p. 950–3, 11 ago. 2000.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 269, n. 2, p. 357–60, 16 mar. 2000.

SHEN, Y. N.; KIM, Y. M.; YUN, C.-H.; MOON, Y. S.; KIM, S. H. Transcriptional activation of pref-1 by E2F1 in 3T3 L1 cells. **BMB reports**, v. 42, n. 10, p. 691–6, 31 out. 2009.

SILVEIRA, E. A.; KAC, G.; BARBOSA, L. S. Prevalência e fatores associados à obesidade em idosos residentes em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil: classificação da obesidade segundo dois pontos de corte do índice de massa corporal. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 7, p. 1569–1577, jul. 2009.

SIPE, J. C.; WAALLEN, J.; GERBER, A.; BEUTLER, E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). **International Journal of Obesity**, v. 29, n. 7, p. 755–759, 5 abr. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ijo.0802954>>. Acesso em: 8 jan. 2016.

SON, Y. H.; KA, S.; KIM, A. Y.; KIM, J. B. Regulation of Adipocyte Differentiation via MicroRNAs. **Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)**, v. 29, n. 2, p. 122–135, 2014. TAMORI, Y.; MASUGI, J.; NISHINO, N.; KASUGA, M. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2045–55, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086932>>. Acesso em: 12 ago. 2015.

TSENG, Y.-H.; BUTTE, A. J.; KOKKOTOU, E.; YECHOOR, V. K.; TANIGUCHI, C. M.; KRIAUCIUNAS, K. M.; CYPESS, A. M.; NIINOBE, M.; YOSHIKAWA, K.; PATTI, M. E.; KAHN, C. R. Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. **Nature cell biology**, v. 7, n. 6, p. 601–11, jun. 2005.

VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; LIU, J.; HANNON, G. J.; PARKER, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes & development**, v. 20, n. 5, p. 515–24, 1 mar. 2006.

VENUGOPAL, J.; HANASHIRO, K.; NAGAMINE, Y. Regulation of PAI-1 gene expression during adipogenesis. **Journal of cellular biochemistry**, v. 101, n. 2, p.

369–80, 15 maio 2007.

WEBER, B.; STRESEMANN, C.; BRUECKNER, B.; LYKO, F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 6, n. 9, p. 1001–5, 2 maio 2007.

WU, Z.; ROSEN, E. D.; BRUN, R.; HAUSER, S.; ADELMANT, G.; TROY, A. E.; MCKEON, C.; DARLINGTON, G. J.; SPIEGELMAN, B. M. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. **Molecular cell**, v. 3, n. 2, p. 151–8, fev. 1999.

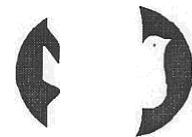
XIE, H.; LIM, B.; LODISH, H. F. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. **Diabetes**, v. 58, n. 5, p. 1050–7, maio 2009.

YUDKIN, J. S.; STEHOUWER, C. D.; EMEIS, J. J.; COPPACK, S. W. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 19, n. 4, p. 972–8, abr. 1999.

ZHANG, J.-W.; KLEMM, D. J.; VINSON, C.; LANE, M. D. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 6, p. 4471–8, 6 fev. 2004.

ZHOU, D.; HUANG, C.; LIN, Z.; ZHAN, S.; KONG, L.; FANG, C.; LI, J. **Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways** *Cellular Signalling*, 2014. .

## 7. ANEXO 01



UNIVERSIDADE

## Comitê de Ética em Pesquisa — CEP

Bragança Paulista, 14 de Abril de 2009

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Avaliação da erva mate (*Ilex paraguariensis*) na adipogênese e sinalização da insulina.

Autor(es): Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro; Demetrius Paiva Arçari

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa — CEP, da Universidade São Francisco, analisou expressamente a pendência no dia 14/04/2009 do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte

resultado.

Parecer: Aprovado

Atenciosamente

**Maria Betânia de Oliveira Garcia**

**Vice - Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - USF**

**Universidade São Francisco**

CAMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825

CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300

CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933

CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO

Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 09084-047 POt9(41)3345 2000