

Gabriela Cavazza Cerri

**Avaliação do perfil metabólico de
camundongos obesos tratados com uma
nanoformulação lipídica de Esclareol**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

**Avaliação do perfil metabólico de
camundongos obesos tratados com uma
nanoformulação lipídica de Esclareol**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da
Universidade Federal de Minas Gerais.

Discente: Gabriela Cavazza Cerri

*Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique
Sousa Santos*

Belo Horizonte
2017

**"AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DE CAMUNDONGOS
OBESOS TRATADOS COM UMA NANOFORMULAÇÃO LIPÍDICA
DE ESCLAREOL"**

GABRIELA CAVAZZA CERRI

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **16 de março de 2017**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DR^a. ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA
ESCOLA DE ENFERMAGEM/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. STÉFANY BRUNO DE ASSIS CAU
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. SÉRGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 16 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha **mãe** que desde que existo é a melhor e mais amada pessoa na minha vida, sempre me apoiando, me ensinando e me incentivando a cada passo que dou. É muito amor. Sem ela nada disso seria possível. Agradeço ao meu **pai** por ser tão importante para mim, por todo o amor, apoio e incentivo. Agradeço aos meus **irmãos** por serem eles e por todo carinho.

Agradeço aos meus **avós** e ao meu padrinho **Robson** por todo o amor, dedicação, carinho, por serem pessoas maravilhosas e essenciais na minha vida, sempre compreensíveis e por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço ao **Guilherme** por ser tudo de bom, por todo o amor, por contribuir de forma significativa com a minha felicidade, por sempre me ajudar e me apoiar em tudo, inclusive em questões acadêmicas e por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradeço às minhas **amigas** por sempre me fazerem feliz e por serem pessoas com quem sempre pude e posso contar.

Agradeço ao meu orientador **Sérgio** por ser um profissional acadêmico exemplar, por toda a orientação e todos os ensinamentos tão certos.

Agradeço a todos os colegas de laboratório e a todos da **UFMG** que contribuíram de forma positiva para esta conquista.

“We are the living planet, Sophie! We are the great vessel sailing around a burning sun in the universe. But each and every of us is also a ship sailing through life with a cargo of genes.”

“How terribly sad it was that people are made in such a way that they get used to something as extraordinary as living?!”

Jostein Gaarder

RESUMO

O esclareol é um diterpeno isolado a partir das folhas e flores de *Salvia sclarea* e possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Entretanto, o esclareol possui lipofilicidade elevada. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos metabólicos de esclareol em sua forma livre e em nanoformulação lipossomal em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. *Métodos:* Camundongos machos *swiss*, foram divididos em dois grupos: dieta padrão (ST) e dieta hiperlipídica 60% (HF) por 4 semanas. Em seguida, cada grupo foi dividido em 3 subgrupos de tratamentos: esclareol livre (Sc), nanoformulação de esclareol (L-Sc) e apenas a nanoformulação vazia (L). O esclareol (livre e em nanoformulação lipossomal) foi administrado, via intraperitoneal, com volume final de 300 μ L e concentração de 1mg/kg. O tratamento foi realizado por 30 dias. Ao final do tratamento, foram realizados os testes de tolerância à glicose e de sensibilidade à insulina. Os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta do sangue e dos tecidos adiposos. *Resultados:* Durante o tratamento, observou-se redução do peso corporal e melhora significativa do perfil glicêmico dos animais obesos submetidos à administração da nanoformulação de esclareol. Observou-se também, redução da adiposidade e aumento dos níveis de HDL nos animais tratados com a nanoformulação de esclareol comparados com os animais HF L. Além disso, a expressão de MCP-1, NF- κ B e SREBP-1c foi significativamente reduzida nos animais HF L-Sc. *Conclusão:* A nanoformulação lipídica de esclareol melhorou parâmetros metabólicos de camundongos obesos. Esclareol, quando associado à nanoformulações pode ser uma nova estratégia terapêutica para auxiliar no tratamento de doenças associadas a distúrbios metabólicos.

ABSTRACT

Sclareol is a diterpene isolated from *Salvia sclarea*. Sclareol has been used as ingredient in cosmetics. Furthermore, this diterpene has been shown (i) to activate cytotoxic and cytostatic pathways against leukemia cell lines, (ii) anti-inflammatory and (iii) antioxidant properties. However, Sclareol has low bioavailability due to its high lipophilicity, therefore the use of Sclareol *in vivo* is hampered. This study aim was to evaluate the metabolic effects of Sclareol in different formulations (lipid nanoparticle and free) of mice with high fat diet induced metabolic syndrome. *Methods:* Swiss male mice were initially divided into two groups throughout 4 weeks: standard diet (ST) and high fat diet (HF). Subsequently, insulin sensitivity test and glucose tolerance test were performed. Each group was divided into 3 treatments subgroups: free sclareol (Sc), lipid nanoparticle of sclareol (L-Sc) and empty lipid nanoparticle (L). The sclareol (free and lipid nanoparticle) were administered intraperitoneally in 300 μ l and 1mg/kg dose. Treatments were performed for 30 days. Afterward, the glucose tolerance test and insulin sensitivity test were performed. The animals were euthanized by decapitation, blood and target organs were collected and stored. *Results:* During treatment body weight reduced. Significant improvement of glycemic profile and HDL levels increased in HF L-Sc mice was shown. It was also observed adiposity reduction and decreased expression of NF-KB, MCP-1 and SREBP-1 in HF L-Sc mice compared with HF L mice. *Conclusion:* The lipid nanoparticle of sclareol improved metabolic parameters in obese mice. Sclareol when associated with lipid nanoparticle may be a new therapeutic strategy to assist in the treatment of diseases associated with metabolic disorders.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Obesidade - Breve histórico.....	12
1.2 Obesidade e prevalência	14
1.3 Obesidade e resistência à insulina.....	15
1.4 NF- κ B.....	19
1.5 MCP-1.....	20
1.6 SREBP-1.....	21
1.7 Produtos naturais para o tratamento da obesidade	22
1.8 Esclareol	23
1.9 Nanoformulações lipídicas	26
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Animais e desenho experimental	29
4.2 Indução da obesidade.....	30
4.3 Peso corporal, adiposidade, consumos alimentar e energético	30
4.4 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de esclareol	31
4.5 Tratamento.....	32
4.6 Testes de Sensibilidade à Insulina e da Tolerância à Glicose	33
4.7 Determinação de colesterol total, triglicérides e HDL.....	33
4.8 Eutanásia dos animais.....	34
4.9 Histologia	34
4.10 RT-PCR	35
4.11 Análise Estatística.....	36

5. RESULTADOS	36
5.1 Indução da obesidade	36
5.2 Peso corporal, adiposidade, consumos alimentar e energético	37
5.3 Teste de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina	42
5.4 Dosagens plasmáticas	44
5.5 Histologia	45
5.6 RT-PCR	46
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERENCIAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens pré-históricas que retratam a obesidade.....	14
Figura 2 - Mecanismo bifásico da secreção de insulina.....	18
Figura 3 - Via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco.....	19
Figura 4 – Estrutura do esclareol.....	25
Figura 5 - Peso corporal relativo antes do tratamento.....	37
Figura 6 - Peso corporal durante o tratamento.....	38
Figura 7 - Ingestão de dieta.....	39
Figura 8 - Peso dos tecidos adiposos.....	40
Figura 9 - Teste de tolerância à glicose.....	42
Figura 10 - Teste de sensibilidade à insulina.....	43
Figura 11 - Dosagens plasmáticas.....	44
Figura 12 - Histologia.....	46
Figura 13 - RT- PCR.....	47
Figura 14 - Esclareol em nanopartículas lipídicas melhora o metabolismo de camundongos obesos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP = Difosfato de adenosina.

AMPC = Monofosfato cíclico de adenosina.

AMPK = Proteína quinase ativada por AMP.

ATP = Trifosfato de adenosina.

COX-2 = Ciclo-oxigenase-2.

FA = Fase aquosa.

FO = Fase oleosa.

GLUT2 = Transportador de glicose 2.

HDL = Lipoproteína de alta densidade.

HF = *High fat diet* – dieta hiperlipídica.

HF L = Animais HF tratados apenas com o veículo nanolipídico.

HF L-Sc = Animais HF tratados com esclareol em formulação livre.

HF Sc = Animais HF esclareol em nanoformulação lipídica.

IKK = IκB quinase .

IL-6 = Interleucina 6.

IL-8 = Interleucina 8.

IMC = Índice de massa corporal.

IP = Intraperitoneal.

IRS = Substrato de receptor de insulina.

JNK = Quisases c-Jun N-terminal.

KO = *knockout*.

LTF = Laboratório de tecnologia farmacêutica.

LXRα = Receptor X alfa do fígado.

MAPK = Proteína-quinase ativada por mitógeno.

MCP-1 = Proteína quimiotática de monócitos 1.

MDA = Malondialdeído.

MMP-1 = Matriz metaloproteinase-1.

MMP13 = Matriz metaloproteinase-13.

NF-κB = Fator nuclear Kappa B.

NLC = Veículos lipídicos nanoestruturados.

NO = Óxido nítrico.

NOS = Óxido nítrico sintase.

PCR = Reação em cadeia da polimerase.

PGE2 = Prostaglandina E2.

PI(3)K = Fosfoinositol 3-quinase.

PKC = Proteína quinase C.

PPARγ = Receptor ativado por proliferador de peroxissoma.

SIRT1 = Sirtuina 1.

SLN = *Solid lipid nanoparticle* - Nanopartículas de lipídios sólidas.

SREBP-1 = Proteínas de ligação ao elemento regulador do esterol.

ST = Animais *standard*, controle.

ST L = Animais controle tratados apenas com o veículo nanolipídico.

ST L-Sc = Animais controle tratados com esclareol em nanoformulação lipídica.

ST Sc = Animais controle tratados com esclareol em formulação livre.

TAE = Tecido adiposo epididimal.

TAM = Tecido adiposo mesentérico.

TAMR = Tecido adiposo marrom.

TAR = Tecido adiposo retroperitoneal.

TNF- α = Fator de necrose tumoral.

TSI = Teste de sensibilidade à insulina.

TTG = Teste de tolerância à glicose.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Obesidade - Breve histórico

De acordo com a organização mundial da saúde a obesidade é uma doença crônica de causa multifatorial. Esta é definida como uma condição de acúmulo excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde (WHO, 2016).

Na história da humanidade o ganho de peso e o estoque de gordura corporal já foram sinais de saúde e prosperidade (Seshadri, 2012). Na Áustria em 23.000 anos a.C. a estatueta de vênus, de Willendorf, representava uma mulher que, provavelmente, era o corpo desejado pelas mulheres e homens da época (Seshadri, 2012) (Figura 1A). Entretanto, tal estatueta apresenta características físicas marcantes da obesidade e da síndrome metabólica (Dole, 1959, Markus, 2005 e Seshadri, 2012). A hipótese é de que naquela região e época as mulheres apresentavam o índice de massa corporal (IMC) abaixo do normal e por isso tinham problemas de fertilidade. Dessa forma, o ganho e estoque de gordura corporal eram desejados (Józsa, 2011 e Seshadri, 2012). Há diversas artes do antigo Egito, datadas entre 2340 e 2180 anos a.C., que demonstram a existência de homens e mulheres obesos, sendo a maioria de família real. Como, por exemplo, a escultura em pedra na tumba do egípcio Mereruka que representa um homem obeso sendo presenteado com comida pelos seus servos magros (Bray, 2009) (Figura 1B). Porém, é provável que apenas na Grécia antiga a obesidade foi reconhecida como prejudicial à saúde.

Hipócrates 460-370 anos a.C. chamou o excesso de gordura corporal de “corpulência” termo derivado da palavra “*corpus*” (corpo em latim) e escreveu: “A corpulência não é apenas uma doença em si, mas o prenúncio de outras” (Haslam e James, 2005). Hipócrates reconheceu que pessoas com excesso de

gordura apresentavam outros problemas causados por ela e até mesmo apresentavam mortes súbitas de forma mais comum do que pessoas magras (Allison et al., 2008 e Haslam e James, 2005).

Avançando para 1660 d.C. o termo obesidade foi utilizado pela primeira vez na Inglaterra por Tobias Venner para descrever homens e mulheres que tinham problemas de saúde por apresentarem excesso de peso (Haslam, 2007). Este termo foi derivado da palavra latina “*obesus*”, que significa forte, gordo e vulgar (Haslam, 2007). Após a consolidação da revolução industrial, a melhoria das condições de vida, outras possibilidades de comidas e o aumento do estilo de vida sedentário levou muitas pessoas a adquirirem o sobrepeso.

Os hábitos alimentares da sociedade ocidental moderna são características essenciais para o aumento dramático da taxa de obesidade. O genoma humano foi selecionado ao longo de milhares de anos a uma alimentação praticamente restrita a animais selvagens e plantas (Cordain et al., 2005). O início da agricultura e da agropecuária, seguidos pela revolução industrial trouxeram variedades e quantidades enormes de novos alimentos (Cordain et al., 2005). Tais alterações alimentares drásticas (ex. açúcares refinados, laticínios, óleos, álcool e sal) ocorrem em um curto período para que a seleção natural atue de forma estabilizadora. A divergência entre as características do genoma ancestral e os novos alimentos introduzidos pode ser um fator importante para favorecer o aumento de doenças crônicas como a obesidade (Cordain et al., 2005).



Figura 1. A) Vênus de Willendorf, Áustria, (23000 a.c.) – Fonte: Dole, 1959. **B)** Túmulo do nobre Mereruka, Egito (2350 a.c.) – Fonte: Bray, 2009.

1.2 Obesidade e prevalência

Atualmente a obesidade é um problema de saúde pública que afeta diversos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Em escala mundial a prevalência da obesidade tem aumentado ano após ano (WHO, 2016).

Os índices de obesidade mais que triplicaram de 1975 até 2014. Em 1975, 34 milhões de homens e 71 milhões de mulheres eram obesos, totalizando 105 milhões de adultos obesos (NCD, 2016). Em 2005 312 milhões de adultos no mundo eram obesos (Haslam e James, 2005) e em 2014 os números aumentaram para 266 milhões de homens e 375 milhões de mulheres, totalizando 641 milhões de adultos obesos (NCD, 2016). Um estudo revelou que, se o mesmo padrão continuar em 2030 58% da população adulta de todo o mundo estará com sobrepeso (Kelly et al., 2008). No Brasil em 2006 42,7% dos adultos apresentavam sobrepeso, em 2011 esse número subiu para aproximadamente 50% e em 2014 cerca de 60% da população apresentava sobrepeso (Vigitel, 2011 e PNS-IBGE, 2014).

Outro fato preocupante é o número de crianças com índice de massa corporal acima de 25, que também tem aumentado a cada ano. Dez por cento das crianças do mundo apresentam sobrepeso e entre essas crianças um quarto

apresenta obesidade (Lobstein et al., 2016). Considerando todas as crianças do Brasil e dos Estados Unidos 0,5% se torna acima do peso a cada ano (Lobstein et al., 2016).

As consequências da obesidade levam ao desenvolvimento da síndrome metabólica. Esta síndrome é caracterizada por: (i) obesidade abdominal, (ii) dislipidemia aterogênica, (iii) aumento da pressão sanguínea, (iv) resistência à insulina, (v) intolerância à glicose, (vi) estado pró-inflamatório e (vii) estado pró-trombótico. A síndrome metabólica representa o aumento de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de diabetes melito tipo 2 (Grundy et al, 2004 e Santos et al., 2008).

1.3 Obesidade e resistência à insulina

A insulina é um hormônio responsável pela modulação de diversas vias metabólicas. A insulina estimula, por exemplo: (i) o transporte de glicose no tecido adiposo e no músculo; (ii) a síntese de glicogênio no fígado e no músculo; (iii) a síntese de ácidos graxos e de triglicerol e (iv) o transporte de aminoácidos (Barrett et al, 2014). A secreção de insulina é estimulada, principalmente, pela entrada de glicose nas células β pancreáticas.

A glicose entra nas células β pancreáticas através do receptor de glicose 2 (GLUT2), e é metabolizada, gerando aumento de ATP. O aumento da razão ATP/ADP reduz o efluxo de potássio, despolariza a célula e aumenta o influxo de cálcio. Tal influxo de cálcio é responsável pela exocitose de grânulos de insulina e pelo pico inicial de secreção de insulina (Barrett et al., 2014). Após o pico de secreção, ocorre a fase prolongada da secreção de insulina. Níveis elevados de glutamato intracelular (como resultado do metabolismo de piruato

no ciclo do ácido cítrico) podem diminuir o pH de grânulos imaturos e dessa forma matura-los e favorecer a secreção de insulina (Barrett et al., 2014) (Figura 2).

Uma vez na corrente sanguínea a insulina se liga a seu receptor de membrana e estimula sua autofosforilação e inicia a atividade de tirosina quinase das subunidades β . Uma vez ativado o receptor de insulina fosforila substratos do receptor de insulina (IRSs). Em seguida, ocorre a ativação da fosfoinositol 3-quinase (PI(3)K) da qual é essencial para a ação da insulina em diversos mecanismos: (i) transporte de glicose, (ii) síntese de glicogênio, (iii) síntese de proteínas, (iv) ação antilipólise e (v) supressão da gliconeogênese hepática (Kahn, 1998) (Figura 3).

A resistência à insulina é uma patologia da qual os tecidos não respondem às concentrações normais de insulina. A resistência à insulina predispõe o indivíduo a maior risco de desenvolver diabetes melito tipo 2 (Zick, 2001). Existe uma forte relação entre resistência à insulina e obesidade (Pinho et al., 2013). O acúmulo exagerado de gordura gera um ciclo de complicações metabólicas do qual não se sabe exatamente onde se inicia. No caso da resistência à insulina os fatores mais estudados são: adipocinas, marcadores inflamatórios e ácidos graxos.

O excesso de gordura causa alterações no perfil secretor do tecido adiposo, levando ao aumento da síntese e da secreção de ácidos graxos livres, glicerol, hormônios e citocinas pró-inflamatórias (Santos e Andrade, 2014 a). A obesidade leva à diminuição da secreção de adiponectina e ao aumento da secreção de resistina pelos adipócitos, fatores estes relacionados ao aumento da resistência à insulina (Santos et al., 2013 b). A adiponectina no fígado favorece a oxidação

de ácidos graxos e reduz a produção de glicose. No músculo, a adiponectina estimula o uso de glicose e a oxidação de ácido graxo, provavelmente, por ativação de proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Qatanani e Lazar, 2007). Já a resistina favorece a resistência à insulina (Qatanani e Lazar, 2007 e Santos et al., 2013). A inflamação é uma forma de sinalização potente para a resistência à insulina em animais obesos.

O aumento da secreção do fator de necrose tumoral (TNF) pode estimular as vias de sinalização de jun quinases (JNK) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que recrutam maior número de mediadores inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina (Kahn et al., 2006 e Solinas e Karin, 2010). Ademais, a secreção aumentada da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) por adipócitos também aumenta o recrutamento de células do sistema imune e contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina (Hajer et al., 2008). A utilização de energia do tecido adiposo hipertrófico também é um fator associado à resistência à insulina.

Um estudo mostrou que a infusão de ácidos graxos em pacientes saudáveis provoca resistência à insulina. Isso ocorre por meio da inibição ou fosforilação do transportador de glicose (Roden et al., 1996). Níveis elevados de ácidos graxos aumentam os níveis de seus metabólitos. Estas proteínas prejudicam a sinalização da insulina por meio da fosforilação dos IRS. Dessa forma, o aumento de ácidos graxos e de seus metabólitos reduzem a habilidade dos IRS de ativar PI(3)K. Como consequência, os eventos a jusante da sinalização do receptor de insulina são diminuídos (Kahn et al., 2006). Além de ácidos graxos, como referido anteriormente, a secreção aumentada de marcadores pró-

inflamatórios também são importantes fatores para o desenvolvimento da resistência à insulina.

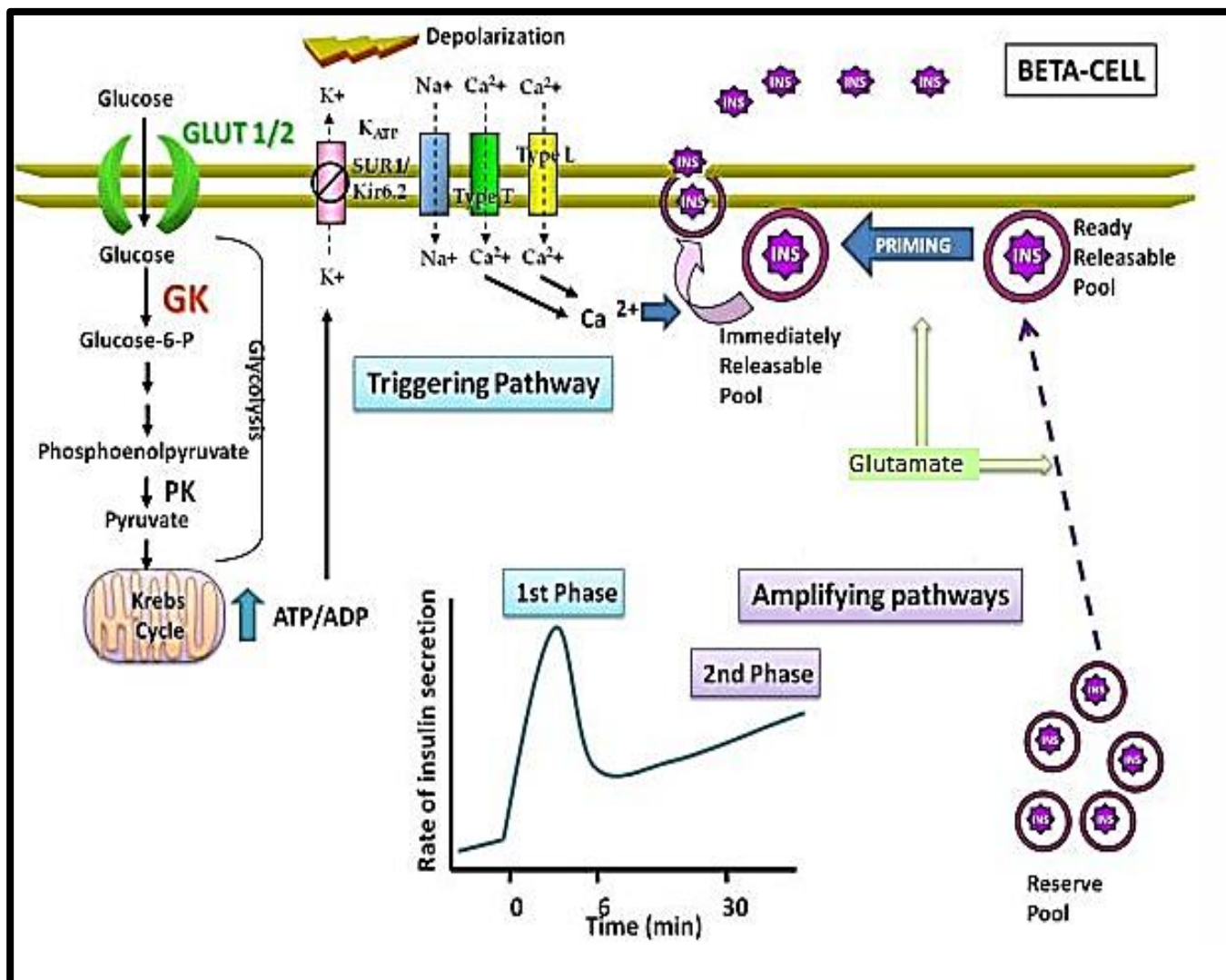


Figura 2. Mecanismo bifásico da secreção de insulina. – Fonte: modificado de Vega-Monroy e Fernandez-Mejia, 2011.

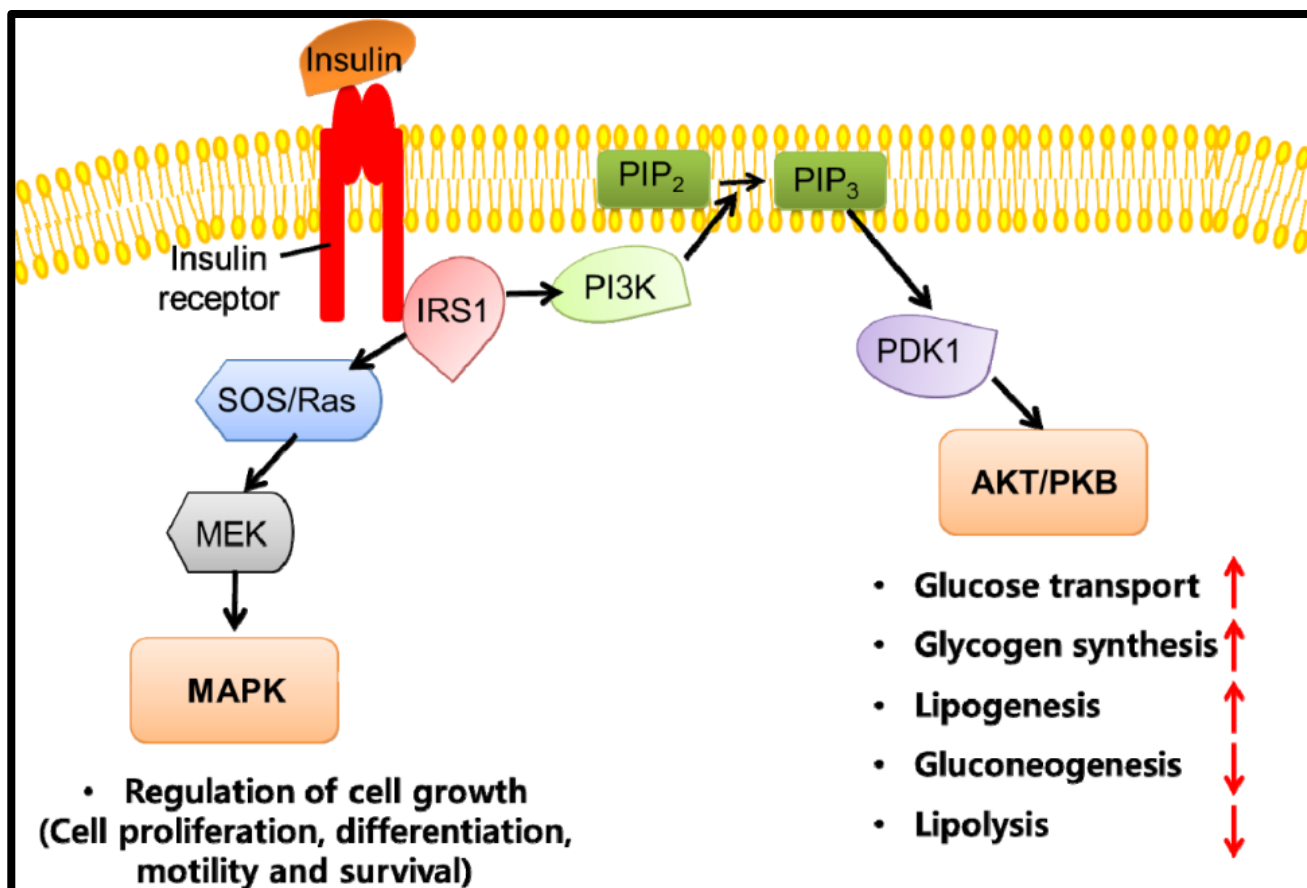


Figura 3. Via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco.- Fonte: Jung e Choi, 2014.

1.4 NF- κ B

Os estresses metabólicos causados pela obesidade (aumento de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo, sinalização de receptores de TNF e outros) ativam as vias de sinalização de JNK/MAPK e IKK/NF- κ B. Quando a quinase I κ B (IKK) se torna ativa, libera os dímeros de NF- κ B por fosforilação. NF- κ B no núcleo regula a transcrição de genes envolvidos com a inflamação (Solinas e Karin, 2010 e Kahn et al., 2006). A ativação de NF- κ B mediada por IKK nos adipócitos desencadeia o recrutamento de macrófagos e o início e a manutenção de uma reação inflamatória, resultando na resistência à insulina (Baker et al., 2011). Ativação de IKK gera a fosforilação da região de serina de substratos de receptores de insulina (IRSs) e assim, também prejudica a

sinalização do receptor de insulina (Baker et al., 2011 e Solinas e Karin, 2010). Além de estar envolvido na resposta inflamatória a sinalização de IKK/NF- κ B também afeta o metabolismo da glicose, uma vez que, em resposta ao estresse metabólico e a sinais pró-inflamatórios a cascata IKK/NF- κ B pode promover a falência de células β pancreáticas em indivíduos resistentes à insulina, levando à intolerância à glicose e ao aumento do risco de diabetes tipo 2 (Solinas e Karin, 2010). Ademais, estudos mostram que a cascata de sinalização IKK/NF- κ B é essencial na supernutrição e obesidade. A dieta hiperlipídica causa inflamação e ativação da cascata IKK/NF- κ B no hipotálamo médio-basal. Tal atividade pode prejudicar a sinalização central da leptina e por este motivo aumenta a ingestão calórica e o ganho de peso (Baker et al., 2011 e Solinas e Karin, 2010).

1.5 MCP-1

MCP-1 é um potente fator quimiotático para monócitos secretado por adipócitos e outras diversas células em resposta a estímulos, como TNF- α e NF- κ B. MCP-1 é associado a obesidade e a resistência à insulina (Deshmane et al., 2009). MCP-1 é superexpresso no tecido adiposo de animais obesos. Sartipy e Loskutoff, 2003, mostraram que, possivelmente, o tecido adiposo branco pode ser a maior fonte de secreção de MCP-1 para a corrente sanguínea de animais obesos. Pois, MCP-1 é expresso de 10 a 100 vezes mais no tecido adiposo branco e no plasma do que no fígado, rins e pulmão de animais obesos. A insulina estimula a expressão de MCP-1 tanto em adipócitos normais quanto em adipócitos resistentes à insulina (Sartipy e Loskutoff, 2003). MCP-1 também contribui para a expansão e remodelamento do tecido adiposo branco, uma vez que, exerce efeito angiogênico em células endoteliais. Além disso, MCP-1

favorece a adipogênese em células 3T3-L1 de forma independente do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) (Panee, 2012).

1.6 SREBP-1

As proteínas de ligação ao elemento regulador do esterol (SREBP) são fatores de transcrição essenciais para o controle da síntese de colesterol e de ácido graxo (Feltenberger et al., 2013). Os primeiros estudos importantes sobre o SREBP-1 identificaram que o estado nutricional pode alterar a sua expressão no tecido adiposo branco, no fígado e no músculo. Sendo a maior expressão em situações de animais alimentados por dieta rica em carboidratos e a menor expressão durante o jejum (Eberlé et al., 2004). Outro importante fator é o receptor X alfa do fígado (LXR α) que, por meio de SREBP-1 promove a formação de ácidos graxos para a síntese de ésteres de colesterol que atuam como tampões para a concentração livre de colesterol (Liang et al., 2002). Animais *knockout* (KO) para SREBP-1 tratados com agonista de LXR α apresentam atividade lipogênica reduzida (Liang et al., 2002). Ou seja, o fator de transcrição SREBP-1 é de extrema importância para a síntese de lipídeos por meio de LXR α (Liang et al., 2002). Além do estado nutricional, a insulina contribui para induzir a transcrição de SREBP-1 nos adipócitos. A insulina participa do aumento da transcrição de SREBP-1 por uma via dependente de PI(3)K. Além disso, possivelmente, a insulina produz ligantes de LXR α , aumenta a atividade de LXR α e por este motivo favorece a atividade de SREBP-1. Logo, as respostas geradas pela sinalização de LXR α também são importantes para que a insulina ative SREBP-1. Uma vez ativado, SREBP-1 aumenta a atividade de fatores necessários para lipogênese e adipogênese, produzindo ligantes de PPAR,

fatores que aumentam a síntese de ácidos graxos e fatores de diferenciação (Eberlé et al., 2004 e Hajer et al., 2008).

1.7 Produtos naturais para o tratamento da obesidade

O estudo de produtos naturais para o tratamento da obesidade é muito importante, pois tem como objetivo obter resultados satisfatórios, de acordo com a pesquisa, reduzir os efeitos colaterais, visando a melhoria da saúde. Diversos estudos mostram efeitos de fitoquímicos na melhora do metabolismo de animais obesos (Andrade et al., 2014 b; Choi et al., 2014; Kang et al., 2008; Monteros et al., 2011 e Park et al., 2012). Um exemplo é o resveratrol, um polifenólico natural extraído da casca de uva. Este composto apresenta propriedades anti-inflamatória e antioxidante causadas por meio da ativação de SIRT1 (Andrade et al., 2014 b). O mirtilo exerce efeito antiadipogênico (Sánchez-Villavicencio et al., 2017). Outro exemplo é o extrato de chá verde que pode reverter a resistência à insulina por meio da regulação da expressão gênica de fatores da via de sinalização da insulina e da captação de glicose (Cao et al., 2007). Algas marinhas possuem efeito antiadipogênico por meio da inibição da absorção de lipídeos, inibição da diferenciação de adipócitos e aumento do sentimento de saciedade (Wan-Loy et al., 2016). O extrato de erva-mate possui efeito antiobesidade por meio de alterações da expressão de genes relacionados à obesidade (Arçari et al., 2009). Além disso, o chá de salvia é conhecido popularmente por ter propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e por melhorar a digestão e favorecer a diminuição da circunferência da cintura. O extrato de *Salvia plebeia*, por exemplo, diminui a expressão de genes relacionados a adipogênese e a lipogênese no tecido adiposo branco epididimal

(Choi et al., 2016). Sementes de *Salvia hispanica* foram eficientes em promover a perda de peso e a melhora do perfil glicêmico em pacientes adultos obesos (Vuksan et al., 2016).

1.8 Esclareol

O esclareol é um diterpeno que compõe o óleo essencial isolado de plantas como a *Cistus creticus* (cistaceae), *Cleome spinosa* (Brassicaceae), *Nicotiana glutinosa* (Solanaceae) e, principalmente, da superfície das flores de *Salvia sclarea* (Fam. Labiatae) (Kyrikou et al., 2005 e Zerb e Bohlmann, 2015 a). Esclareol é formado a partir de geranilgeranil difosfato por meio das enzimas monofuncionais, difosfato sintase classe II e difosfato sintase classe I (Zerb e Bohlmann, 2015 a e b). A síntese de esclareol na planta é independente da atividade de citocromo P450 (Zerb e Bohlmann, 2015 a). O esclareol é utilizado como matéria prima na fabricação de fragrâncias para perfumes. O óleo essencial que contém esclareol apresenta atividade antimicrobica e pode ser produzido por plantas para protegê-las da predação e da competição (Environment Canada, 2013). Esclareol é altamente insolúvel em água, ou seja, esclareol é um composto lipofílico e por este motivo tende a acumular-se no tecido adiposo branco (Environment Canada, 2013) (Figura 4).

Alguns estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram que esclareol possui efeitos anticancerígeno, antioxidante e anti-inflamatório. Huang et al. 2012, mostrou que macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos e tratados com esclareol diminuíram os níveis de óxido nítrico sintase (NOS), de óxido nítrico (NO) e de ciclooxygenase-2 (COX-2) de forma concentração-dependente. O mesmo autor mostrou que esclareol inibiu o aumento de NO, TNF- α e

malondialdeído (MDA) em camundongos com edema de pata induzido por carragenina, neste estudo o autor utilizou a concentração de 10mg/ml de esclareol por via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina. Esclareol apresenta efeito anticancerígeno em cultura celular de câncer de cólon. Estudos *in vitro* mostram que esclareol limita o crescimento de células tumorais por meio da indução à apoptose e da redução da expressão de proto-oncogênes (Hatziantoniou et al., 2006 e Patel et al., 2010). O diterpeno ativa as caspases 8 e 9, causa degradação de PARP, promove a parada do ciclo celular na fase G1 e, conseqüentemente, inibe a síntese do DNA (Dimas et al., 2007). Dimas et al., 2007, também mostrou que o esclareol pode distinguir as células que estão em estado proliferativo das células em estado não proliferativo. Outro estudo mostrou que esclareol pode ser eficaz em suprimir a expressão de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidantes, uma vez que em condrócitos estimulados por IL-1B o tratamento com esclareol diminuiu a expressão de COX-2, colagenase intersticial (MMP-1), colagenase 3 (MMP13), estromelisina-1 (MMP-3), NOS, NO e prostaglandina E2 (PGE2) (Zerb, 2015 b).

Os trabalhos citados acima mostram promissores efeitos do esclareol como alvo farmacológico para diversas patologias que envolvem o aumento de fatores pró-inflamatórios. Em contrapartida, esclareol apresenta estrutura altamente lipofílica (Paradissis et al., 2007). Além disso, esclareol possui toxicidade significativa (Bhatia et al., 2008 e Georgieva, 1989), tais características dificultam o estudo *in vivo* desse diterpeno.

Em relação à toxicidade do esclareol, estudos feitos em animais experimentais mostraram que: (i) camundongos submetidos à administração intraperitoneal (IP) de esclareol em doses de 1; 5 e 25 mg/kg diminuíram a

atividade agressiva induzida por hidrocloreto de cloridina. Entretanto, as doses de 50 e 100mg/kg se mostraram tóxicas, uma vez que reduziram a atividade espontânea dos animais (Georgieva, 1989). (ii) A administração IP de esclareol em dose de 10mg/kg, de forma aguda, em camundongos, não prejudicou a sobrevivência dos animais (Huang et al., 2012). (iii) Segundo Dimas et al., 2007 a dose máxima tolerada de esclareol livre administrado por via IP, em camundongos, é de 50g/kg. (iv) Administração de esclareol por via gavagem, em ratos, com dose de 5g/kg, em tratamento diário por 14 dias não apresentou toxicidade. Provavelmente, devido à falta de absorção do fármaco, pois devido à sua estrutura química a formulação livre de esclareol dificilmente é absorvida por via oral (Bhatia et al., 2008). (v) Outro estudo mostrou que a administração, por via IP de esclareol, em ratos, na dose de 0,1g/kg não apresentou toxicidade, entretanto a dose de 0,316g/kg se mostrou tóxica, uma vez que causou peritonite e morte (Bhatia et al., 2008). Com todos estes estudos conclui-se que, considerando a administração por via IP, a dose máxima tolerada é de 50mg/kg e a dose mínima efetiva é de 1mg/kg. Além disso, o esclareol livre por via gavagem não apresentou nenhum efeito nos estudos citados.

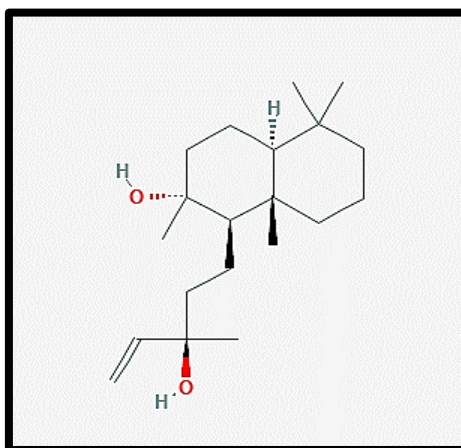


Figura 4. Estrutura do Esclareol. Fonte: PubChem, 2005.

1.9 Nanoformulações lipídicas

Assim como o esclareol, muitos produtos naturais que são potencialmente benéficos para a melhora dos perfis lipídico, insulínico e inflamatório possuem baixa biodisponibilidade. Por este motivo, altas concentrações são necessárias para um tratamento eficaz, aumentando assim a possibilidade de ocorrer efeitos tóxicos. Essas características prejudicam o estudo *in vivo* de vários compostos naturais (Coimbra et al., 2011). Para melhorar a eficácia da droga e reduzir possíveis reações adversas, muitos estudos têm sido feitos sobre o desenvolvimento de novas formulações de carreadores, a fim de prolongar o tempo de permanência no organismo e de melhorar a farmacocinética de compostos naturais.

Para moléculas hidrofóbicas como o esclareol, existem vários tipos de sistemas de entrega à base de lipídios, tais como, as nanopartículas de lipídios sólidas (SLN), veículos lipídicos nanoestruturados (NLC), emulsões e lipossomas (Aditya et al., 2014). Carreadores lipídicos proporcionam diversas vantagens como, por exemplo, não apresentam toxicidade, são estáveis, aumentam a biodisponibilidade do fármaco, reduzem a absorção sistêmica, assim como a frequência de administração do fármaco (Liu et al., 2012). Muitos estudos mostram a melhoria da eficiência de fármacos associados a veículos lipídicos. Como, por exemplo, a doxorubicina e o ácido docosahexaenóico quando são associados a NLC diminuem a citotoxicidade e a resistência (Mussi et al., 2014). Em outro estudo a doxorubicina e o ácido docosahexaenóico em SLN também apresentaram melhoria da atividade antitumoral *in vitro* (Mussi et al., 2013). O resveratrol, como referido antes, é um produto natural conhecido pelo seu efeito metabólico extremamente benéfico (Andrade et al., 2014 b),

porém apresenta baixa biodisponibilidade. O resveratrol associado a uma nanopartícula lipídica aumentou a sua eficácia terapêutica (Pund et al., 2004).

O esclareol livre possui alta lipofilicidade e toxicidade. Grande parte da toxicidade do esclareol em formulação livre se deve a seu rápido acúmulo no citosol. Entretanto, o esclareol encapsulado com lipossoma apresentou lento e progressivo acúmulo em outras regiões da célula além do citosol, como, membrana e núcleo (Paradissis et al., 2007). No entanto, os estudos são escassos em relação a forma de atuação deste diterpeno tanto em formulação livre quanto encapsulado em carreadores lipídicos, bem como sobre a sua possível utilização para o tratamento da obesidade.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública que afeta mais de 600 milhões de adultos em todo o mundo. As consequências da obesidade são severas para a saúde e acarretam aos seus portadores diminuição significativa da expectativa de vida por predispor o organismo a uma série de doenças e/ou distúrbios metabólicos. Tendo em vista as altas taxas de morbidade relacionadas ao aumento da obesidade, é de extrema importância o empenho de pesquisadores que encontrem medidas preventivas e terapêuticas eficazes para essa patologia e para as desordens metabólicas associadas.

Os produtos naturais são importantes alvos de estudos para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos. Os diterpenos formam uma importante classe de produtos naturais, da qual inclui o esclareol, extraído do óleo essencial da planta *Salvia sclarea*. Este diterpeno possui efeitos citotóxico

e citostático contra células tumorais por meio da indução à apoptose e da diminuição da expressão de protooncogene. Além disso, possui papel anti-inflamatório diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Tais efeitos benéficos sugerem papel promissor desse composto como nova terapêutica para o tratamento da obesidade. Entretanto, este diterpeno é altamente insolúvel em água, se acumula no tecido adiposo e apresenta toxicidade significativa.

Carreadores lipídicos como, nanoformulações lipídicas aumentam a biodisponibilidade e diminuem a toxicidade dos fármacos envolvidos. Por este motivo, a utilização de carreadores lipídicos é essencial para o estudo do esclareol *in vivo*. Os diversos efeitos benéficos de esclareol associados à uma nanoformulação lipídica podem formar uma importante alternativa terapêutica para o tratamento da obesidade.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar e comparar os efeitos do esclareol em diferentes formulações (livre e em nanoformulação lipídica) sobre o metabolismo de camundongos *swiss* obesos.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito de esclareol sobre o peso e adiposidade dos animais.
- Avaliar se o tratamento com esclareol, nas diferentes formulações, altera o perfil glicêmico e lipídico dos animais.

- Avaliar se o tratamento com esclareol, nas diferentes formulações, altera a expressão de importantes genes relacionados à inflamação e à obesidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e desenho experimental

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, número do processo: 111. Para este trabalho foram utilizados 48 camundongos machos *swiss* com aproximadamente 4 semanas de idade, obtidos do centro de bioterismo da UFMG. Os camundongos foram mantidos em ambiente controlado com acesso livre a água e a comida, de acordo com as dietas experimentais. Os animais foram separados em dois grupos (n=24) durante um mês. Grupo 1: animais alimentados por dieta padrão “*standard*” (ST) e Grupo 2: animais alimentados pela dieta 60% hiperlipídica “*high fat*” (HF). Após a indução da obesidade cada grupo foi separado aleatoriamente em 3 subgrupos de tratamento: apenas o veículo nanolipídico (L), esclareol em formulação livre (Sc) e esclareol em nanoformulação lipídica (L-Sc). Após um mês de tratamento os animais foram submetidos aos testes de sensibilidade à insulina e de tolerância à glicose. Os animais foram eutanasiados por decapitação com guilhotina de acordo com as normas do comitê de ética em experimentação animal.

4.2 Indução da obesidade

A indução da obesidade foi realizada por meio da disponibilização em tempo integral de dieta hiperlipídica indutora de obesidade 60% (HF). A dieta HF foi preparada de acordo com protocolos já descritos (Andrade et al., 2014 a, b e Santos et al., 2008). A dieta HF é composta de 24,55% de carboidratos, 14,47% de proteínas e 60,98% de gordura, apresentando um total de 5,28 Kcal/g de dieta (Andrade et al., 2014 a, b e Santos et al., 2008). Os componentes para 1Kg desta dieta são: BHT (0,014g), Bitartaro de colina (2,50g), metionina (3g), vitaminas AIN93M (10g), minerais (35g), celulose (50g), amido de milho (62g), caseína (200g), óleo de soja (20g), groselha (310g) e banha vegetal (355g). Os componentes da dieta HF foram obtidos na empresa Rhoster Industria e Alimentos LTDA. Os animais do grupo controle receberam dieta padrão do biotério. A dieta controle (Purina - Labina®) é composta de 50,30% de carboidratos, 31,90% de proteínas e 17,80% de gordura, apresentando total de 2,18 Kcal/g de dieta (Andrade et al., 2014 b). A água foi livremente disponibilizada para os dois grupos. As dietas acima foram mantidas ao longo de todo o experimento.

4.3 Peso corporal, adiposidade, consumos alimentar e energético

Para a avaliação de ganho e de perda do peso corporal os animais foram pesados duas vezes por semana ao longo de todo o trabalho. A ingestão alimentar foi calculada subtraindo o peso da ração remanescente pelo peso inicial. A partir do cálculo de ingestão alimentar também foi possível avaliar a ingestão energética durante todo o trabalho. A fim de analisar se o ganho e a perda de pesos obtidos eram reflexos da alteração de quantidade do tecido

adiposo branco, os tecidos adiposos brancos epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram pesados imediatamente após a eutanásia (Andrade et al., 2014 b).

4.4 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) de esclareol

As formulações livres e em nanopartículas lipídicas de esclareol foram desenvolvidas no laboratório de tecnologia farmacêutica (LTF) do departamento de produtos farmacêuticos da UFMG, pelos pesquisadores Lucas Ferreira e Samuel Mussi. As NLS de esclareol foram preparadas por meio do método da homogeneização a quente com o agitador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Alemanha) e com aparelho de homogeneização do tipo ultrassom com sonda de alta potência (Ultra-cell 750W; Sonics Materials Inc., EUA). A fase oleosa (FO) foi pesada e aquecida a 85°C e a fase aquosa (FA) foi aquecida até a mesma temperatura. A FA foi então lentamente vertida sobre a FO sob agitação (8.000 rotações por minuto) no agitador Ultra Turrax T-25. Após 2 minutos de agitação, a emulsão formada foi homogeneizada durante 10 minutos no ultrassom com sonda de alta potência (21% de amplitude). As NLS foram resfriadas sob agitação manual e o pH final corrigido para a faixa de 7,0 – 7,4 com HCl ou NaOH 1 M. Em seguida, as suspensões das NLS foram armazenadas em frascos de penicilina ao abrigo da luz e mantida sob refrigeração (4°C) (Mussi et al., 2014).

O diâmetro médio das NLS foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons utilizando um Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Inglaterra) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25° C. As dispersões de NLS foram diluídas em água destilada previamente filtrada através de membrana

de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (HAWPO4700, Millipore, EUA).

O potencial zeta foi determinado pela técnica de espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das nanopartículas. As medidas de potencial zeta foram realizadas utilizando um Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, Inglaterra) à temperatura de 25° C. As dispersões das NLS foram diluídas em solução de cloreto de sódio 1 mM previamente filtrada através de membrana de éster de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (HAWPO4700, Millipore, EUA), até a contagem de 100 a 1.000 Kcps. (Mussi et al., 2014 e Mussi e Torchilin, 2013).

As NLS com 0,2% de esclareol apresentaram diâmetro médio: 128 ± 1 0nm; índice de polidispersividade: 0.21 ± 0.05 e potencial zeta: -29.3 ± 0.9 mV.

4.5 Tratamento

Após a indução da obesidade com a dieta HF 60% os grupos foram divididos em 3 subgrupos cada (n=8), resultando em 6 grupos finais. (i) ST L, (ii) ST Sc, (iii) ST L-Sc, (iv) HF L, (v) HF Sc e (vi) HF L-Sc. O tratamento foi realizado todos os dias, na parte da manhã, durante um mês. As formulações foram administradas por via intraperitoneal com dose de 1mg/kg em um volume total de 300µl. A diluição do L e Sc foi realizada com salina. O esclareol livre, que apresenta composição sólida foi diluído em 1% de tween 80 e administrado em suspensão.

4.6 Testes de Sensibilidade à Insulina e da Tolerância à Glicose

Para avaliação do perfil glicêmico dos animais foram realizados testes de sensibilidade insulínica e de tolerância à glicose logo após 30 dias de tratamento. O teste de sensibilidade à insulina foi realizado pela manhã, com os animais no estado alimentado, por meio da aplicação intraperitoneal de 0,75U de insulina/kg de peso corporal. A fim de mensurar a glicemia, foram coletadas amostras de sangue da cauda. Uma gota de sangue foi coletada no tempo zero e com 30, 60, 90 e 120 minutos decorridos da aplicação de insulina. O teste de tolerância à glicose ocorreu também pela manhã com os camundongos em jejum durante 12 horas. Os animais receberam injeção intraperitoneal de glicose a 2 mg/g de peso corporal. O sangue foi coletado a partir de um pequeno corte da cauda para monitorar os níveis de glicose no tempo zero, antes da aplicação, e nos tempos 15, 30, 60 e 90 min após a injeção de glicose. O aparelho utilizado para leitura glicêmica nos dois testes foi o Accu-Chek® Advantage (Roche). Com os resultados foram realizados dois gráficos com uma curva glicêmica pelo tempo. (Santos et al., 2008).

4.7 Determinação de colesterol total, triglicérides e HDL

As dosagens de colesterol total e de HDL foram feitas de acordo com o método do colesterol oxidase pelo método da hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol esterase, produzindo colesterol livre. Os níveis de triglicérides séricos foram medidos de acordo com o método enzimático colorimétrico pelo método da hidrólise dos triglicérides pela lipase lipoprotéica, produzindo glicerol livre fosforilado pela glicerol quinase. Cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase, que em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Tais

dosagens de colesterol e triglicerídeos foram feitas por meio de kits comerciais utilizando kits da empresa Doles, Brasil (Santos et al. 2008).

4.8 Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados por decapitação sem uso de anestésicos. Após a decapitação o sangue foi, imediatamente, coletado em tubos de vidro, centrifugados a 3300rpm por 10 minutos e o plasma foi coletado para a realização das dosagens. Além disso, foram coletados os seguintes tecidos: tecidos adiposos brancos epididimal, mesentérico e retroperitoneal; tecido adiposo marrom e fígado. Os tecidos foram coletados e pesados imediatamente após a eutanásia, em seguida foram congelados em nitrogênio líquido e estocados no freezer a -80°C para posteriores análises de histologia e PCR (Santos et al. 2013).

4.9 Histologia

Os cortes histológicos foram realizados a fim de verificar o número e a área de adipócitos do tecido adiposo branco epididimal dos animais. Após a eutanásia o tecido adiposo epididimal foi armazenado a -80°C . Antes do processamento para emblocar em parafina foi necessário a reidratação dos tecidos com lavagem em série de etanol (70%, 50% e 30% em PBS) durante uma hora em cada. Este processo evitou a quebra dos adipócitos. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em solução de formaldeído a 10% durante 24 horas. Logo depois as amostras foram colocadas no processador automático para impregnação, com os seguintes banhos (1h em cada): etanol 70%; etanol 80%; etanol 90%; etanol 90%; etanol 100%; etanol

100%; etanol 100%; etanol 100%; xilol1; xilol2; parafina e parafina. Após este processo os tecidos foram emblocados em blocos de parafina. Ao final foram feitos cortes transversais de 5µm e os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisados com microscopia de campo claro por meio do microscópio Olympus BX50®. Foram mensurados a área e número de células utilizando o software NIS-ELEMENTS® BR 2.30 (Andrade et al., 2014 c).

4.10 RT-PCR

Para a análise da expressão genética de importantes fatores ligados à obesidade foi utilizado o RT-PCR. O tecido adiposo branco epididimal foi utilizado para extração de RNA. O RNA total foi extraído por meio da homogeneização do tecido na presença do reagente TRIzol® (Invitrogen Corp.®, San Diego, CA, USA) na proporção de 1 ml para cada 50 mg de tecido. Para cada 1ml de trizol 0,2ml de cloroformio (Merck®) foi utilizado para formação da fase aquosa. O RNA foi precipitado com isopropanol a 100%, lavado com etanol 75% e ressuspendido com água Depc. A concentração e a pureza foram determinadas por espectrofotômetro pela absorbância a 260 nm (A260) e pela razão das absorbâncias A260 / A280, respectivamente. Para prevenir a contaminação com DNA genômico e com atividade RNase as amostras de RNA foram tratadas com DNAaseI® (Invitrogen Life Technologies).

O RNA total extraído e tratado com DNAase foi retro transcrito e amplificado para a síntese do cDNA por meio da a M-MLV transcriptase reversa (Invitrogen Corp.®). Para a retro transcrição 2 µg de RNA e 0,5 µg de primer foram incubados a 37°C por 60 min na presença de 5 µl de tampão de reação M-MLV, 1,25µl de dNTPs, 25U de Rnasin recombinante, 200 U da transcriptase

reversa M-MLV e 10 mM de DTT em um volume final de 25 μ l. Os reagentes utilizados foram da empresa Promega® Corporation (USA) (Andrade et al., 2014 c. Santos et al., 2008). Os genes específicos NF- κ B, MCP-1 e SREBP-1 cDNA foram amplificados por meio de primers específicos (Invitrogen®).

4.11 Análise Estatística

Os dados obtidos foram transferidos para o software GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e analisados com confiança de 95% ($P < 0,05$). Os dados foram expressos como Média \pm SEM. A significância estatística das diferenças nos valores médios entre os grupos de camundongos foi avaliada por *one-way* ANOVA e *two-way* ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni (Santos et al., 2008).

5. RESULTADOS

5.1 Indução da obesidade

A análise do peso corporal dos animais mostrou que o grupo HF respondeu como o esperado à ingestão da dieta e obteve aumento significativo do peso corporal comparado ao grupo ST. O grupo ST obteve aumento de 7,578 \pm 1,382 gramas de peso corporal, já o grupo HF obteve aumento de 10,87 \pm 1,955 gramas de peso corporal ao logo de 30 dias (Figura 5).

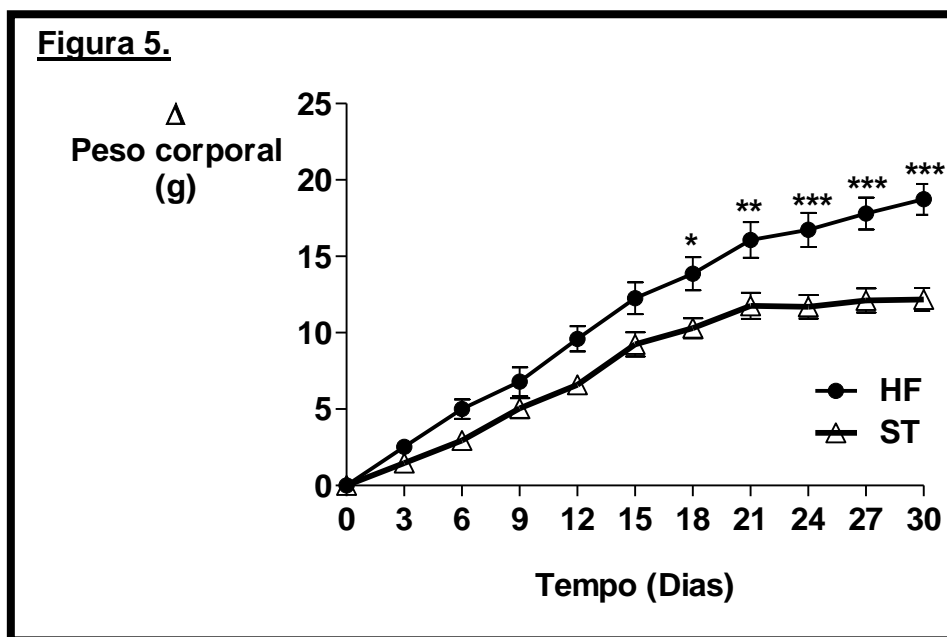


Figura 5. Peso corporal relativo antes do tratamento. Os dados representam média \pm SEM e foram analisados por meio do teste *two-way ANOVA*. Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significante * $p < 0,05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

5.2 Peso corporal, adiposidade, consumos alimentar e energético

As análises de peso corporal dos animais durante os tratamentos revelaram que o tratamento com L-Sc foi o mais eficaz para a diminuição do peso corporal. Os animais HF tratados com L-Sc perderam cerca de 6 gramas de peso corporal ao longo de todo o tratamento comparado com os animais HF L. (Figura 6).

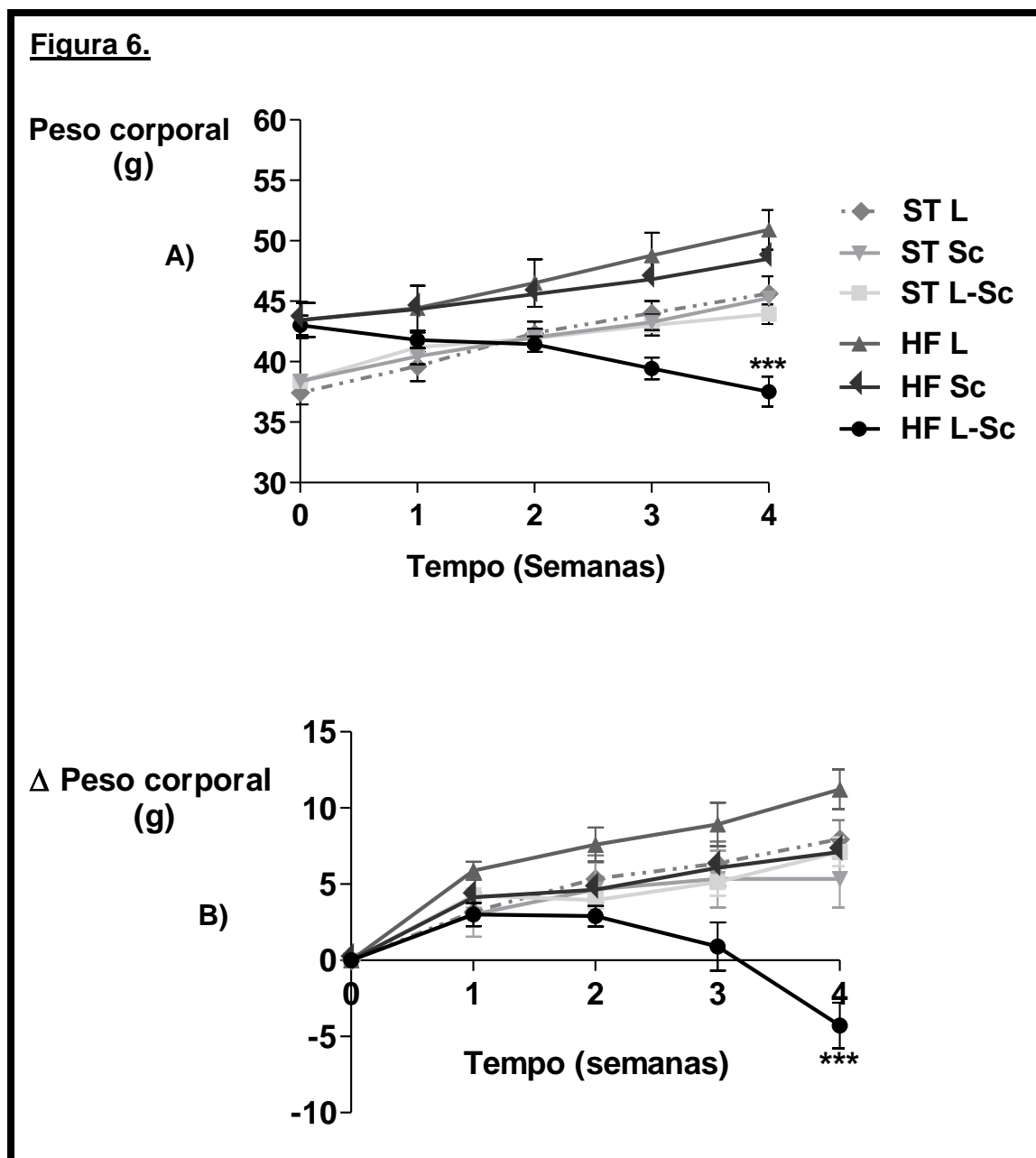


Figura 6. Peso corporal durante o tratamento. **A)** Peso corporal absoluto. **B)** Peso corporal relativo. Os dados representam média \pm SEM e foram analisados por meio do teste *two-way ANOVA*. Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo *** $P < 0.001$.

Os dados de ingestão alimentar e ingestão calórica comprovaram que o aumento do peso corporal dos animais HF não se deveu ao aumento de ingestão alimentar e sim ao aumento de ingestão calórica (Figura 7).

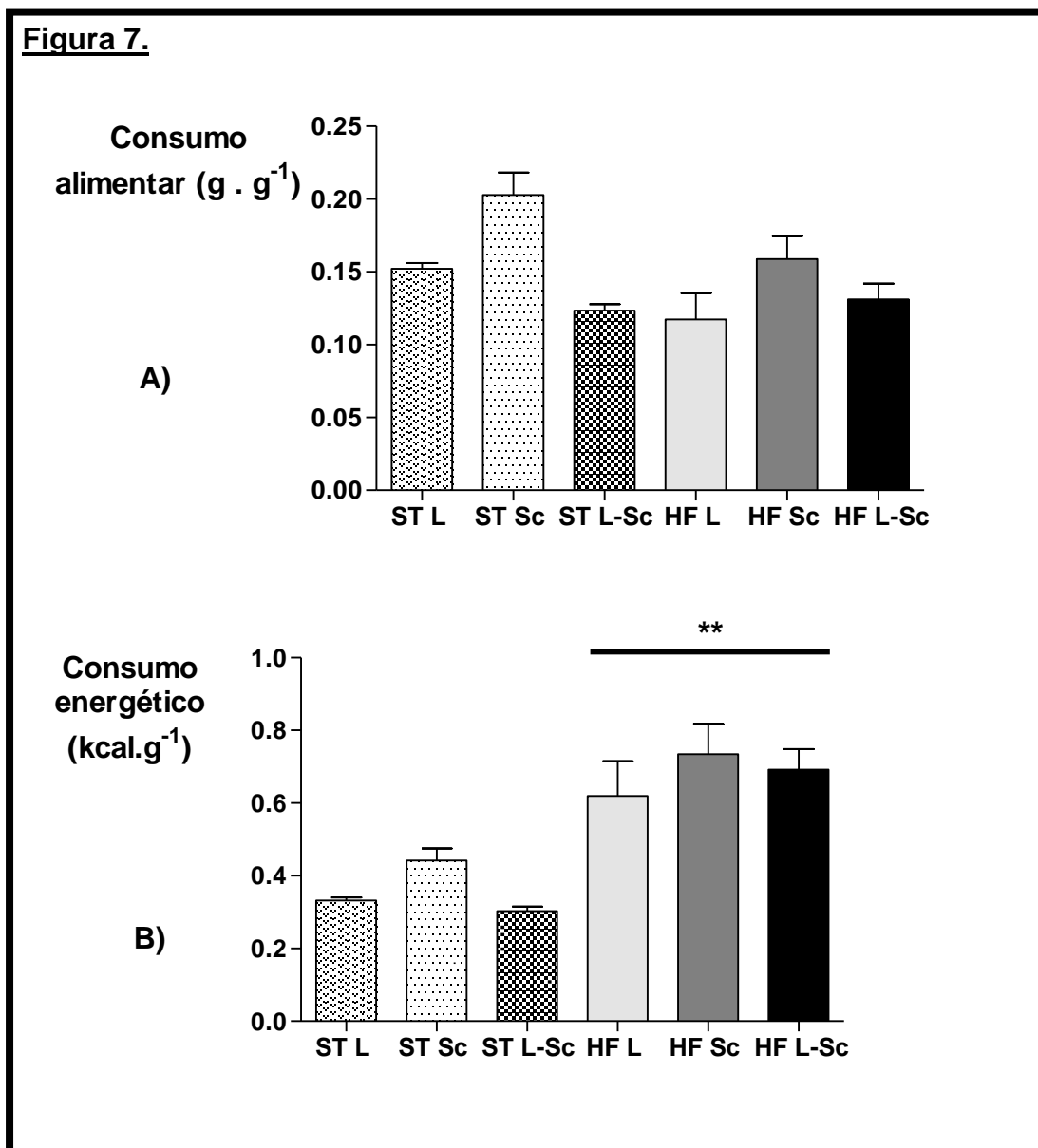
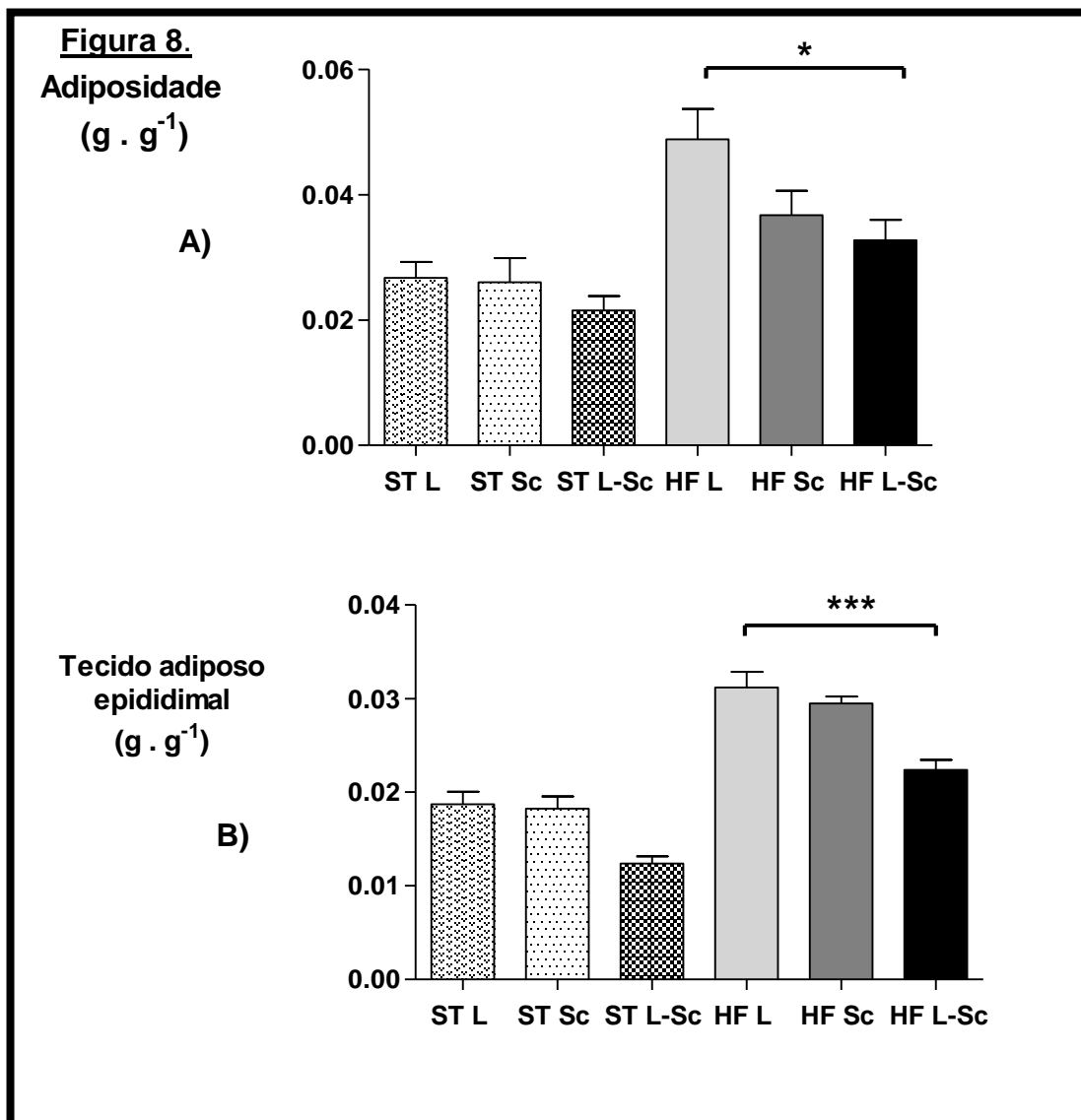


Figura 7. Ingestão de dieta. **A)** Consumo alimentar (g de dieta por animal por dia). **B)** Consumo energético (Kcal de dieta por animal por dia). Os dados representam média \pm SEM e foram analisados por meio do teste *one-way ANOVA*. Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo $**P < 0.01$. Todos os grupos HF vs. Todos os grupos ST.

Além disso, com os dados de peso dos tecidos adiposos brancos epididimal, retroperitoneal e mesentérico foi possível confirmar que o aumento do peso

corporal dos animais HF foi devido ao aumento de deposição de lipídeo no tecido adiposo branco (Figura 8).



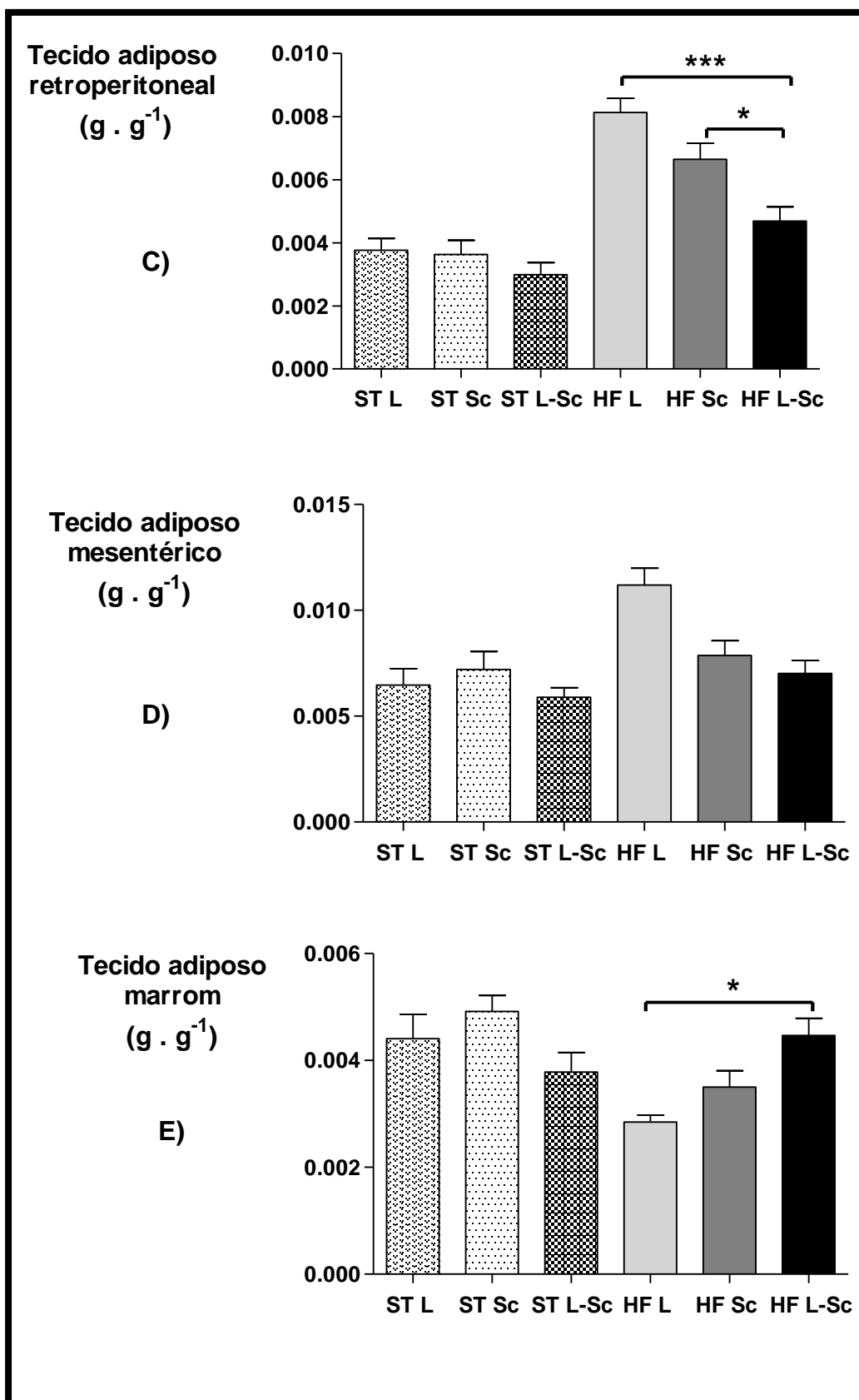


Figura 8. Peso dos tecidos adiposos. **A)** Adiposidade, **B)** TAE, **C)** TAR, **D)** TAM, **E)** TAMR. Os dados representam média \pm SEM e foram analisados por meio do teste *one-way ANOVA*.

Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.3 Teste de tolerância à glicose e teste de sensibilidade à insulina

Após 30 dias de tratamento os TTG e de TSI foram realizados. Os resultados do TTG revelaram que o esclareol aumentou a tolerância à glicose nos animais tratados, sendo que houve melhora mais pronunciada nos animais tratados com L-Sc (Figura 9).

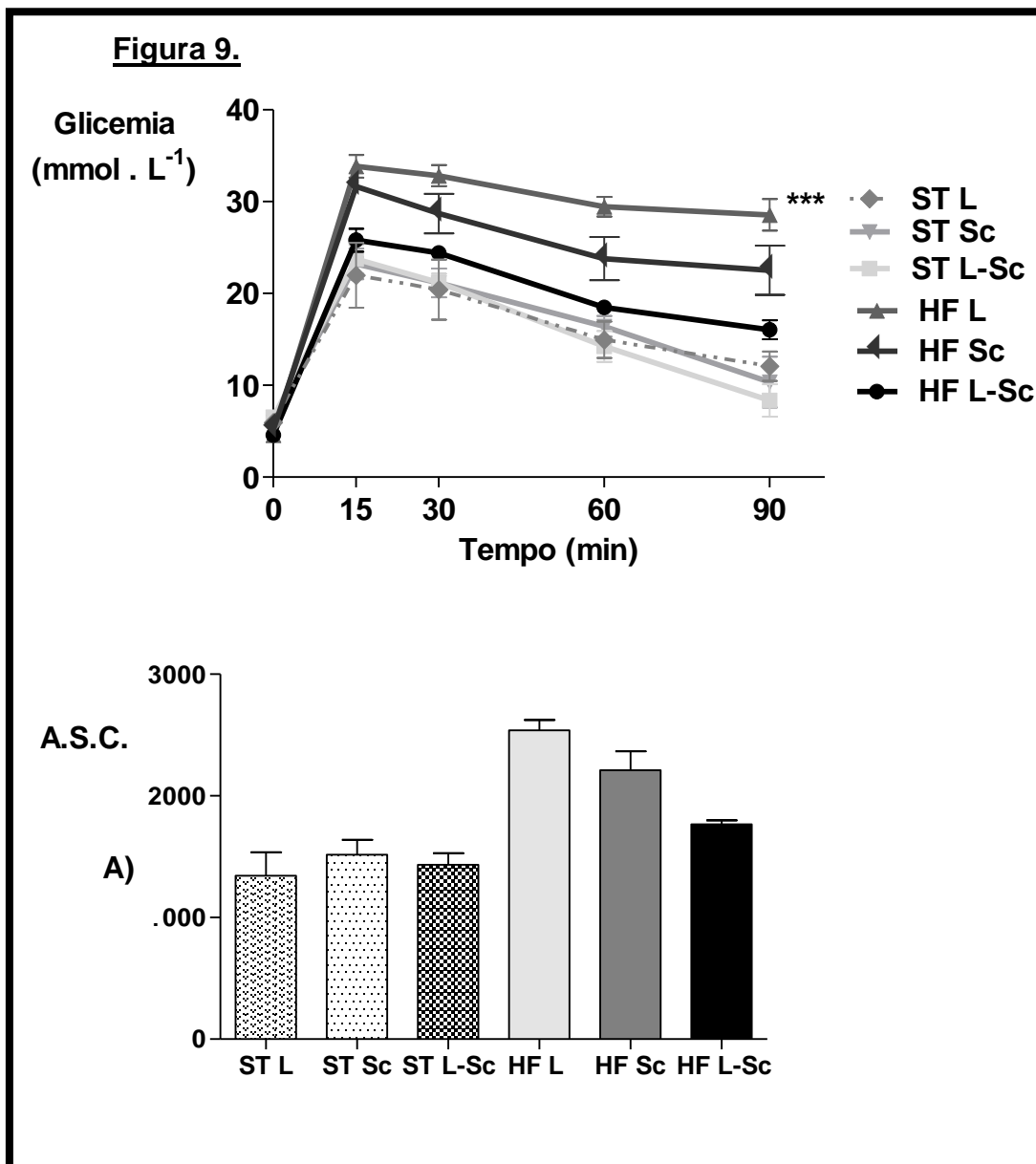
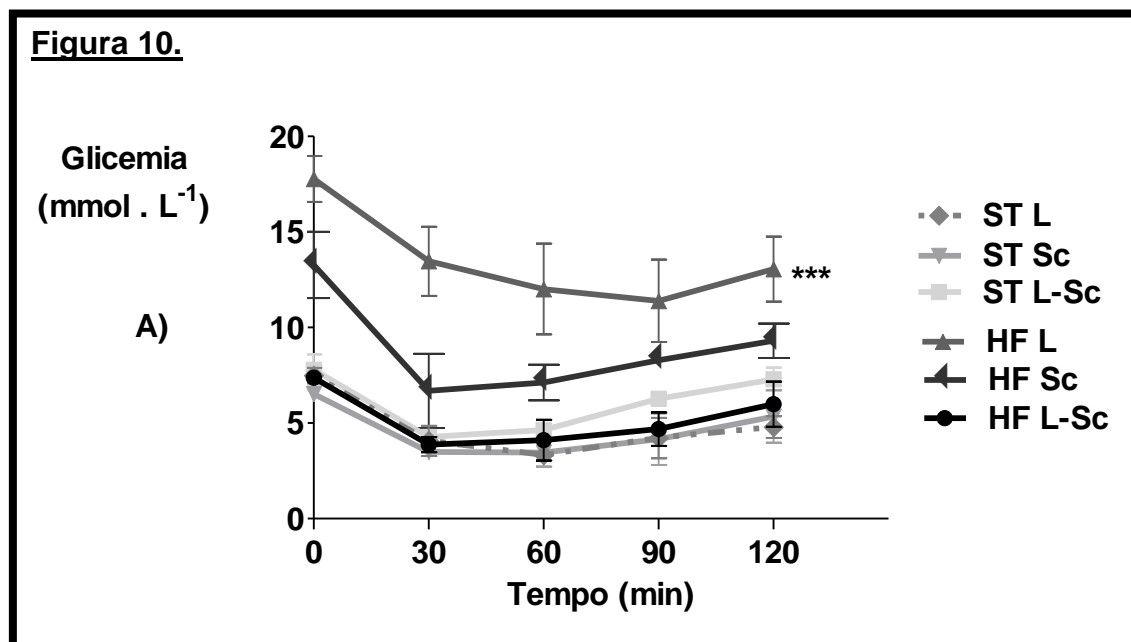


Figura 9. Teste de tolerância à glicose. A) TTG B) Área sob a curva. Os dados representam a média \pm SEM e foram analisados por meio dos testes *two-way* e *one-way ANOVA*. Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significante ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ HF L vs. Todos os grupos ST e HF L-Sc. A.S.C= Áreas sob a curva.

O TSI foi realizado nos animais em jejum e revelou que o grupo HF L-Sc apresentou melhor resposta insulínica comparada ao grupo HF L. Após a administração de insulina seguida da queda glicêmica, os animais HF tratados com L-Sc responderam de forma similar aos animais ST L. Os resultados mostraram a eficiência do tratamento com L-Sc na melhora do perfil glicêmico de animais obesos (Figura 10).



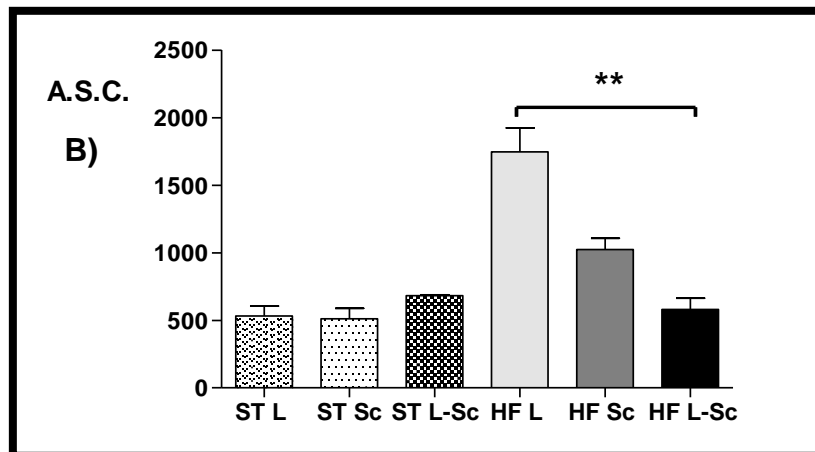
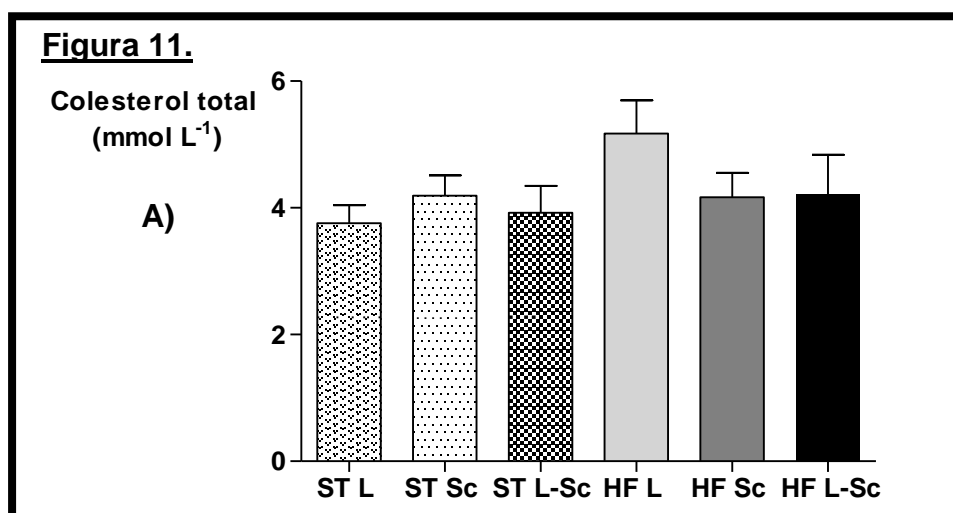


Figura 10. Teste de sensibilidade à insulina. A) TSI B) Área Sob a curva. Os dados representam a média \pm SEM e foram analisados por meio dos testes *two-way* e *one-way ANOVA*. Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ HF L vs. Todos os grupos ST e HF L-Sc. A.S. C= Áreas sob a curva.

5.4 Dosagens plasmáticas

O sangue periférico foi coletado no momento da eutanásia para as análises plasmáticas. Não houve alteração nos níveis tanto de colesterol total quanto de triglicerídeos, entre todos os grupos. O esclareol em nanoformulação lipídica foi eficiente para aumentar os níveis plasmáticos de HDL no grupo HF L-Sc comparado com o grupo HF L (Figura 11).



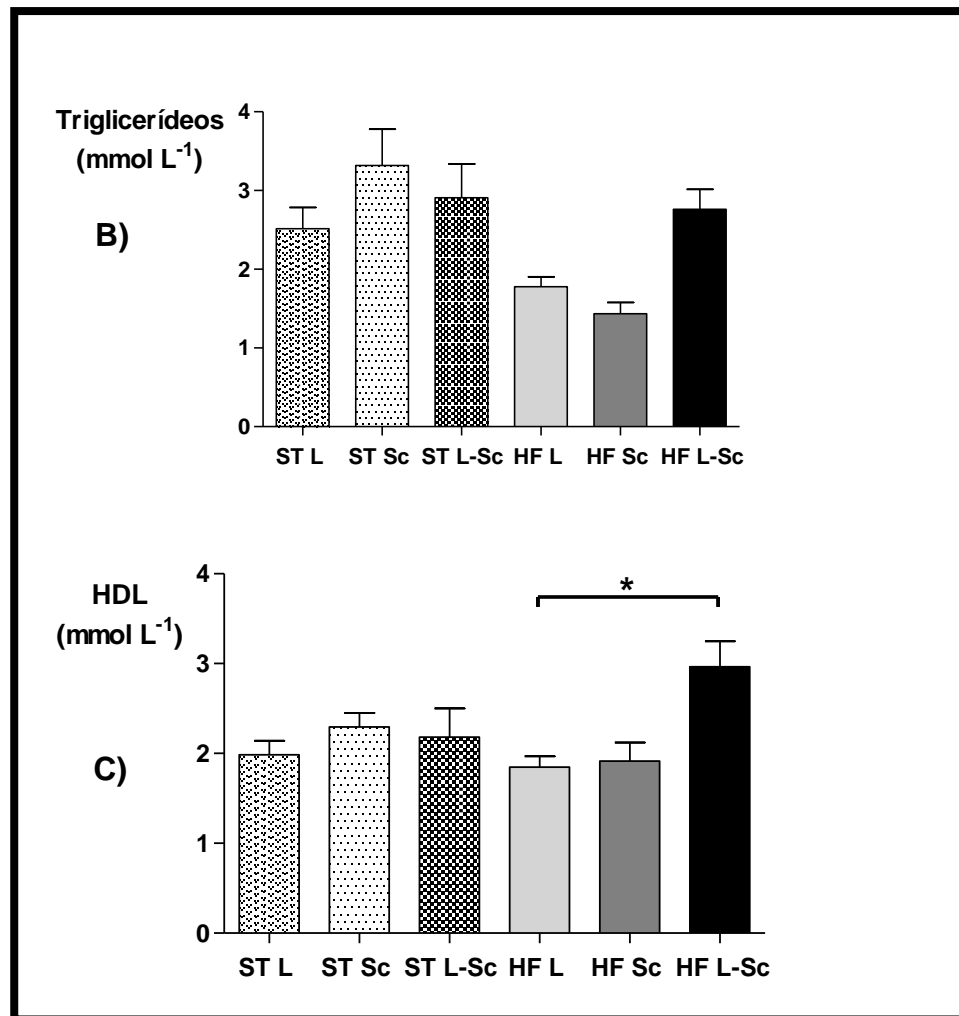


Figura 11. Dosagens plasmáticas. **A)** Colesterol total. **B)** Triglicerídeos. **C)** HDL. Os dados representam média \pm SEM e foram analisados por meio do teste *One-way ANOVA*. Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo * $p < 0,05$.

5.5 Histologia

As análises histológicas do tecido adiposo branco epididimal revelaram que os animais HF apresentaram hipertrofia dos adipócitos. O tratamento com esclareol diminuiu a área dos adipócitos. Entretanto o tratamento com L-Sc foi mais eficaz comparado com o tratamento apenas com Sc. Estes resultados demonstram que, possivelmente, a perda significativa de peso dos animais HF L-Sc refere-se a uma menor acumulação de gordura pelo tecido adiposo (Figura 12).

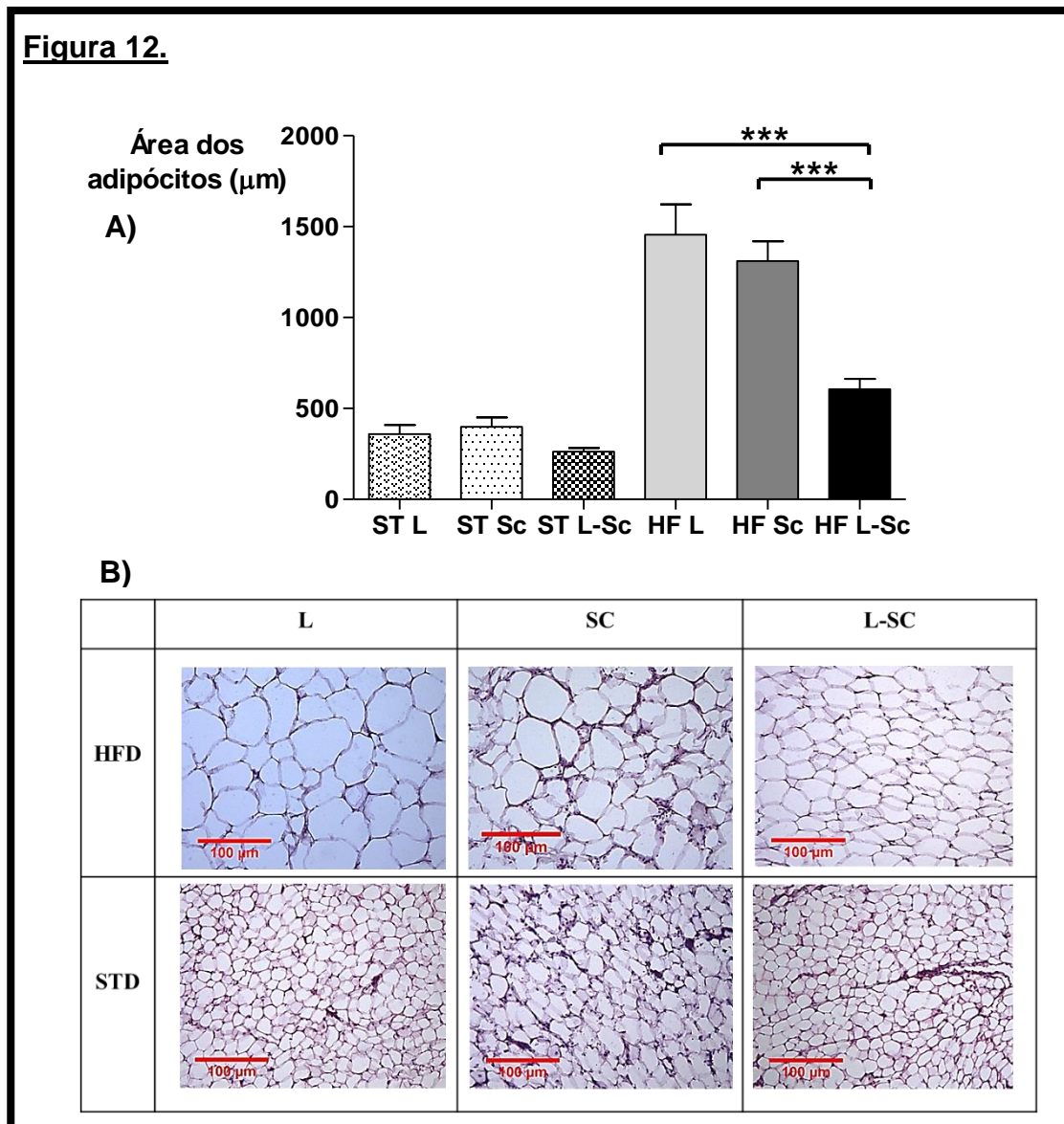


Figura 12. Histologia. **A)** Área dos adipócitos. **B)** Imagens representativas do TAE de cada grupo corado em HE. Os dados representam média \pm SEM e foram analisados por meio do teste *One-way ANOVA*. Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo * $p < 0,05$; *** $P < 0.001$.

5.6 RT-PCR

As análises de expressão de mRNA indicaram que houve diminuição da expressão de NF- κ B, MCP-1 e SRBP-1 no TAE do grupo HF L-Sc comparado ao grupo HF L. Esses resultados mostraram que o L-Sc foi eficiente em reduzir

a expressão de marcadores de citocinas pró-inflamatórias e de adipogênese (Figura 13).

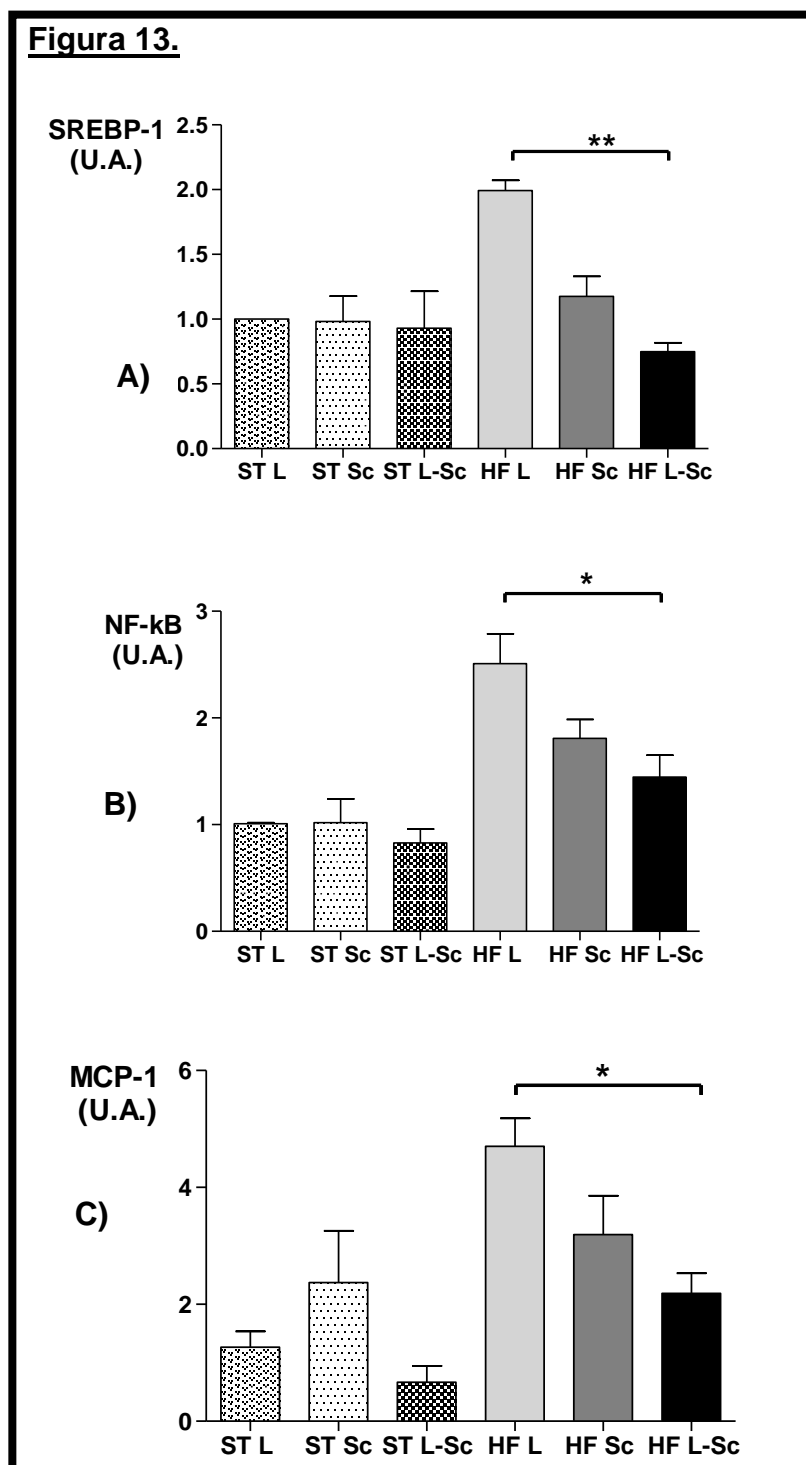


Figura 13 RT- PCR. Expressão gênica de mRNA: **A)** SREBP-1. **B)** NF-κB. **C)** MCP-1. U.A.= Unidade arbitrária. Os dados representam média \pm SEM e foram analisados por meio do teste

One-way ANOVA. Seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado estatisticamente significativo * $p < 0,05$; ** $P < 0.01$.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a administração intraperitoneal de L-Sc e Sc em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Os principais resultados foram: (i) redução do peso corporal (ii) redução da adiposidade corporal, (iii) melhora do perfil glicêmico, (iv) aumento do HDL plasmático e (v) diminuição da expressão de marcadores inflamatórios e lipogênicos (Figura 14). O aumento de tecido adiposo é responsável por causar os prejuízos metabólicos da obesidade. Dessa forma, neste estudo, a administração de L-Sc foi eficaz em melhorar o perfil metabólico de camundongos obesos, principalmente, devido à diminuição do excesso de gordura corporal.

O acúmulo de gordura corporal está relacionado à ocorrência de problemas de saúde, como resistência à insulina, diabetes e hiperlipidemia (Andrade et al., 2014 b; Santos e Andrade, 2014 e Santos et al., 2010). Em pessoas obesas, as complicações metabólicas ocorrem frequentemente devido à alteração na secreção de adipocinas, ao aumento das citocinas inflamatórias e ao acúmulo de lipídios na circulação, o que contribui para o prejuízo da sinalização da insulina (Santos e Andrade, 2014). As complicações metabólicas decorrentes de acúmulo de glicose no plasma podem evoluir para insuficiência renal, amputações, aumento do risco de doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral (Taylor, 1999). Outras complicações da resistência à insulina são: aumento da produção de ácidos graxos livres, aumento da gliconeogênese hepática, aumento da produção hepática de VLDL e diminuição do HDL (Santos

e Andrade, 2014). O aumento dos níveis de lipídeos circulantes e a secreção alterada de adipocinas podem causar hiperlipidemia; uma condição também associada a baixos níveis de HDL circulantes (Grundy et al., 2004 e Taylor, 1999).

Tratamentos que visam a diminuição do sobrepeso variam desde mudanças de estilo de vida, tratamentos farmacológicos até cirurgias bariátricas. As alterações no estilo de vida com a atividade física e a modificação de comportamentos podem contribuir para a perda de peso, mas após 1 – 5 anos, aproximadamente 90% dos pacientes retornam ao peso inicial ou o aumentam. Quando tais alterações não são suficientes ou eficazes, tratamentos medicamentosos podem ser indicados, entretanto, o perde-se em média apenas entre 2 – 8kg de peso corporal (Madsbad, 2014). Por este motivo, é de extrema importância o estudo de produtos naturais para o tratamento da obesidade.

Foram feitos vários esforços no estudo de compostos naturais a fim de prolongar o tempo de permanência do fármaco e melhorar a sua farmacocinética. Os transportadores lipídicos são capazes de melhorar as propriedades farmacocinéticas de fármacos lipofílicos. A utilização de SLN e NLC como transportadores para diferentes fármacos é vantajosa porque tem pouca ou nenhuma toxicidade, é estável, tem liberação controlada, biodisponibilidade crescente e também pode minimizar a degradação da droga (Mussi et al., 2013). O esclareol é um exemplo de diterpeno extraído de plantas que pode ter seu efeito biológico aumentado quando encapsulado em carreadores lipídicos.

O esclareol é um diterpeno lipofílico que possui atividade anti-inflamatória diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias, diminui o crescimento celular induzindo apoptose em células com câncer e aumenta a concentração de

adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) no cérebro de camundongos. (Dimas et al., 2007; Georgieva, 1989; Hatziantoniou et al., 2006; Huang et al., 2012 e Mahaira, 2011). Apesar dos benefícios farmacológicos, o esclareol tem alta lipofilicidade, o que dificulta o transporte no plasma e sua administração para estudos *in vivo* (Hatziantoniou et al., 2006). Neste trabalho nós mostramos que as nanopartículas lipídicas sólidas modularam positivamente o esclareol. Uma vez que, não foram observados sinais de toxicidade e foram obtidos resultados positivos comparado com a formulação livre, como por exemplo, diminuição de tecido adiposo nos animais obesos.

O tecido adiposo branco atua como um importante órgão endócrino, uma vez que os adipócitos secretam fatores que regulam o metabolismo de lipídios e da glicose em todo o corpo (Santos e Silva, 2014). Assim, os fármacos que visam reduzir o excesso de tecido adiposo branco são eficazes no tratamento da obesidade e de distúrbios metabólicos (Andrade et al., 2014). A administração por via IP de L-Sc revelou-se eficaz na redução da gordura corporal e, conseqüentemente, na redução do peso corporal dos camundongos HF. Devido à sua estrutura e à sua característica química, o esclareol tende a se acumular no tecido adiposo (Environment Canada, 2013). De forma interessante, o tratamento com L-Sc em camundongos obesos aumentou o peso do tecido adiposo marrom, não apresentou efeito anorexígeno (confirmado pelo consumo alimentar) e aumentou o nível de HDL plasmático. Esses resultados sugerem que, nos animais HF L-Sc houve um aumento de atividade termogênica, com aumento do gasto energético e conseqüentemente diminuição do peso corporal e da adiposidade (Saito, 2013)

A diminuição da gordura corporal pode restaurar a homeostase metabólica por meio da normalização da secreção de importantes adipocinas. A administração intraperitoneal de L-Sc foi eficaz na melhora do perfil glicêmico em camundongos obesos com resistência à insulina. A obesidade é uma das principais causas de resistência à insulina (Donath, 2014). Assim, uma intervenção que melhore a obesidade abdominal e a resistência à insulina tem implicações importantes para a prevenção do diabetes tipo 2. A análise histológica do tecido adiposo epididimal indicou que os camundongos HF L-Sc diminuíram a área de adipócitos em comparação com o grupo HF L. Assim, as nanopartículas lipídicas de esclareol melhoraram o perfil glicêmico dos camundongos obesos, por diminuir o acúmulo de lipídeos nos adipócitos. Este estudo sugere que o uso de L-Sc pode prevenir a ocorrência de diabetes melito tipo 2.

Outro importante resultado deste trabalho foi o aumento dos níveis plasmáticos de HDL nos animais HF L-Sc. A dislipidemia é um distúrbio metabólico caracterizado por níveis plasmáticos elevados de triglicerídeos, colesterol total e baixo HDL (Santos e Andrade, 2014). A dislipidemia é frequentemente associada a complicações da obesidade e da síndrome metabólica e é considerada um fator de risco para doença cardiovascular (Santos *et al.*, 2013 a). O nível de HDL tem uma razão inversa com o risco de doença arterial coronária. A diminuição do nível de HDL é considerada fator de risco, enquanto o aumento de HDL é considerado fator protetor (Cohen e Rader, 2001). HDL exibe propriedades antioxidantes, remove o excesso de colesterol das células, ajuda na manutenção da função das células endoteliais e fornece proteção contra trombose, inibindo a atividade pró-coagulante induzida pelo

cálcio e mantendo a viscosidade do sangue normal. Uma vez que, a administração de L-Sc aumentou os níveis de HDL em camundongos HF, é possível que as nanopartículas lipídicas de esclareol tenham um papel protetor para a dislipidemia e suas consequências. Além da dislipidemia, a obesidade e a resistência à insulina também são associadas ao estresse oxidativo e ao aumento da inflamação, principalmente no tecido adiposo branco.

Em pacientes obesos, o tecido adiposo branco é caracterizado por inflamação de alta intensidade e aumento da secreção e expressão de citocinas pró-inflamatórias e lipogênicas, incluindo NF- κ B, MCP-1 e SREBP-1 (Heijden et al., 2015; Lee e Lee, 2014 e Santos e Silva, 2014). O NF- κ B está envolvido em várias respostas celulares principalmente na inflamação vascular, estresse oxidativo e disfunção endotelial. A dieta rica em gordura leva ao aumento da inflamação vascular por meio de diferentes vias de sinalização, uma delas está ligada ao aumento do estresse oxidativo, à redução dos mecanismos antioxidantes endógenos e à ativação de NF- κ B (Quilley, 2010). O aumento de NF- κ B está envolvido em várias complicações metabólicas, incluindo o desenvolvimento da resistência à insulina (Carlsen et al., 2009). MCP-1 é um fator quimiotático para monócitos e é super-expresso na obesidade. Kanda H et al., 2014, mostraram que o aumento da expressão de MCP-1 no tecido adiposo branco e no fígado aumenta a infiltração de macrófagos e favorece a esteatose hepática e a resistência à insulina (Hatziantoniou et al., 2006; Lee e Lee, 2014 e Santos e Andrade, 2014). Ademais, a intensidade da lipogênese depende dos níveis de glicose e de insulina na circulação. Este processo ocorre por meio da atividade de fatores de transcrição específicos. Por exemplo, a proteína SREBP-1c, que é ativada pela insulina. SREBP-1 ativa a expressão de

genes glicolíticos e lipogênicos e aumenta o metabolismo da glicose e de lipídeos (Ferré e Foufelle, 2010). Vários estudos mostram o aumento da expressão de SREBP-1 em animais obesos (Andrade *et al.*, 2014 c e Feltenberger *et al.*, 2013). Neste trabalho o tratamento com L-Sc diminuiu a expressão de MCP-1, NF- κ B e SREBP-1 no tecido adiposo branco. O esclareol em nanoformulação lipídica protege os adipócitos da superexpressão de fatores pró-inflamatórios e pró-lipogênicos.

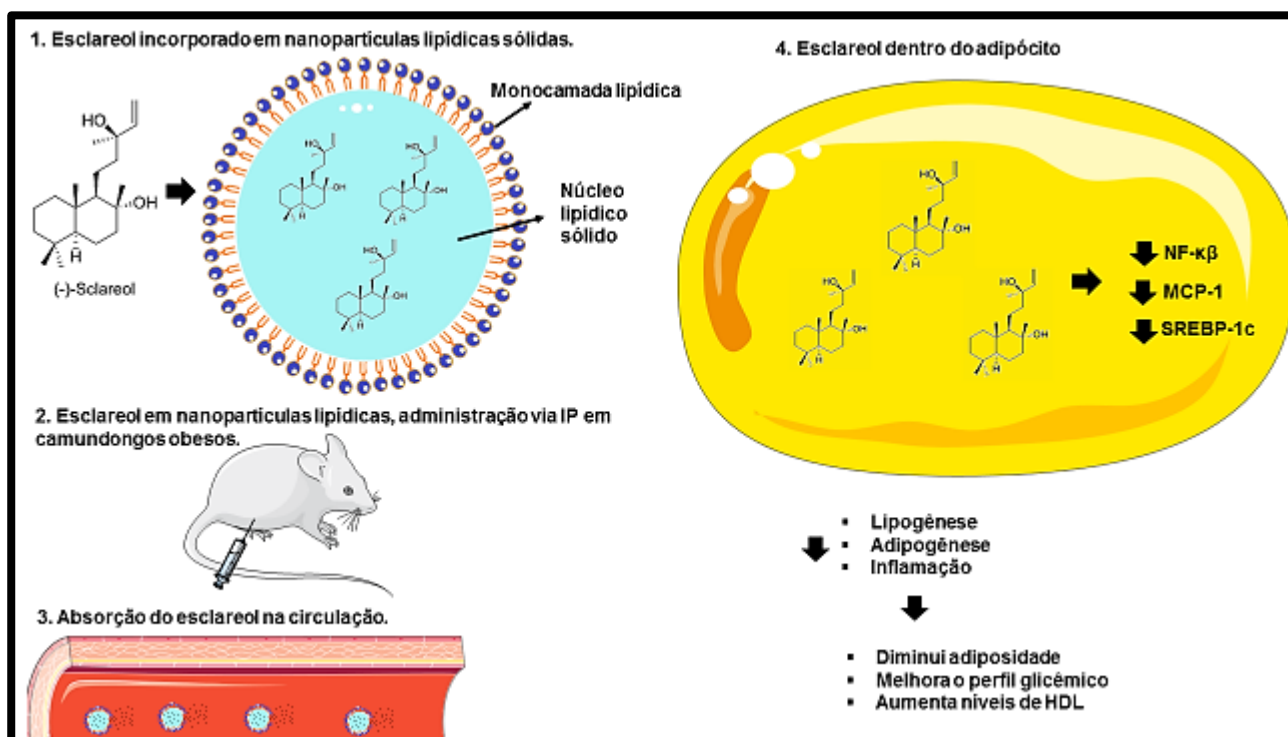


Figura 14. Esclareol em nanopartículas lipídicas melhora o metabolismo de camundongos obesos.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo revelou que a nanopartícula lipídica modulou o esclareol aumentando sua eficácia. A administração intraperitoneal de L-Sc em camundongos obesos induzidos por dieta HF foi eficaz na melhora

do perfil metabólico, na diminuição da adiposidade, no aumento dos níveis de HDL e na melhora do perfil glicêmico. O efeito de L-Sc está associado, pelo menos em parte, à diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (NF- κ B e MCP-1) e do marcador de lipogênese SREBP-1. Assim, o uso de L-Sc pode ser promissor para o tratamento de distúrbios metabólicos causados por aumento no tecido adiposo.

8. REFERENCIAS

Aditya N. P., Macedo A. S., Doktorovova S., et al. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *Food Science and Technology*. 59: 115 - 121. 2014.

Allison D. B, Downey M., Atkinson R.L., Billington C. J., Bray G. A., Eckel R. H., et al. Obesity as a Disease: A white paper on evidence and arguments commissioned by the council of the obesity society. *Obesity*. 16:1161–1177. 2008.

Andrade JM, Lemos FO, Pires SF, Millán DS, Sousa FB, et al. Proteomic white adipose tissue analysis of obese mice fed with a high-fat diet and treated with oral angiotensin(1–7). *Peptides*. 60: 56–62. 2014 a.

Andrade JM, Paraíso AF, Oliveira MV, Martins AM, et al. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. *Nutrition*. 30: 915–919. 2014 b.

Andrade J. M., Paraíso A. F., Oliveira M. V., Martins A. M., Neto J. F., Guimarães A. L., et al. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. *Nutrition*. 30: 915–919. 2014 c.

Arçari DP, Bartchewsky W, Santos TW, et al. Antiobesity Effects of yerba maté Extract (*Ilex araguariensis*) in High-fat Diet–induced Obese Mice. *Obesity*. 17: 2127–2133. 2009.

Baker R. G., Hayden M. S., Ghosh S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metabolism*. 13:11-22. 2011.

Barrett K. E., Barman S. M., Boitano S., Brooks H. L. Fisiologia médica de Ganong. 24^a ed. AMGH Editora Ltda. 2014.

Bhatia S.P, McGinty D, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on sclareol. Food and Chemical Toxicology. 46: 270 – 274. 2008.

Bray, G. A History of Obesity, in Obesity: Science to Practice (eds G. Williams e G. Frühbeck), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi: 10.1002/9780470712221.ch1. 2009;1: 3-18.

Bray, G. A. Handbook of Obesity: Etiology and Pathophysiology. (Ed. C. Bouchard), Taylor and Francis group, UK. 2003.

Cao H, Favier ih, Kelly Ma, et al. Green Tea Polyphenol Extract Regulates the Expression of Genes Involved in Glucose Uptake and Insulin Signaling in uptake by HCT-116 cancer cell lines. Biomedicine & Pharmacotherapy. 61:120 - 124. 2007.

Choi HS, Jeon HJ, Lee OH, et al. Indole-3-carbinol, a vegetable phytochemical, inhibits adipogenesis by regulating cell cycle and AMPKa signaling. Biochimie. 104: 127-136. 2014.

Choi S., Cho I., Han S. H., Jeon y., Choi j., Kim J., et al. Antiobesity Effects of Salvia plebeia R. Br. Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. J Med Food 19 (11) 2016, 1048–1056

Cohen A M and Rader D J. Dyslipidemia. Current Treatment Options in cardiovascular Medicine. 3:347–357. 2001.

Coimbra M, Isacchi B, Bloois L, et al. Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. International Journal of Pharmaceutics. 416: 433– 442. 2011.

Cordain L., Eaton S. B. Sebastian A., Mann N., Lindeberg S., Watkins B. A. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. Am J Clin Nutr.81:341–54. 2005.

Deshmane S. L., Kremlev S., Amini S. e Sawaya B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of interferon & cytokine research*. 29: 313 – 326. 2009.

Dimas K, Hatziantoniou S, et al. Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells in vitro and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice. *Apoptosis*. 12:685–694. 2007.

Dole V. P. Body fat. *Scientific American*. 201:70-77. 1959.

Donath MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nature reviews, drug discovery*. v13. 2014.

Eberlé D., Hegarty B., Bossard P., Ferré P., Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 86:839–848. 2004.

Environment Canada, Health Canada. Draft Screening Assessment for the Challenge 1-Naphthalenopropanol, α -ethenyldecahydro-2-hydroxy- α ,2,5,5,8 α -pentamethyl-, [1R-[1 α (R*),2 β ,4 α β ,8 $\alpha\alpha$]]- (Sclareol). Draft Screening Assessment CAS RN 515-03-7. 2013.

Feltenberger J. D., Andrade J. M. O, Paraíso A, Barros L. O., Maia Filho A. B., Sinisterra R. D. M, Sousa F. B. Oral Formulation of Angiotensin-(1–7) Improves Lipid Metabolism and Prevents High-Fat Diet–Induced Hepatic Steatosis and Inflammation in Mice. *Hypertension*. 62:324-330. 2013.

Georgieva J. V. Diterpene Sclareol Glycol Inhibits Clonidine-Induced Aggressive Responses in Mice. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 34:503-505. 1989.

Grundy S M, Brewer H B, Cleeman J I, Smith S C, Lenfant C. Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:13-18. 2004.

Hajer G. R., Haeften T. W., Visseren F. L. J., Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*. 29: 2959–2971. 2008.

Haslam D. Obesity: a medical history. *Obesity reviews*. 8: 31–36. 2007.

Haslam D. W. e James W. P. T. Obesity. *The Lancet*. 366: 1197–209. 2005.

Hatziantoniou S, Dimas K, Georgopoulos A, Sotiriadou N, Demetzos C. Cytotoxic and antitumor activity of liposome-incorporated sclareol against cancer cell lines and human colon cancer xenografts. *Pharmacological Research*. 5: 380 –87. 2006.

He Y, Zhang H, Teng J, et al. Involvement of calcium-sensing receptor in inhibition of lipolysis through intracellular cAMP and calcium pathways in human adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 404: 393–399. 2011.

Hotamisligil G. S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M. F., Spiegelman B. M. IRS-I-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α - and Obesity-Induced Insulin Resistance. *SCIENCE*. 271: 665 – 668. 1996.

Huang GJ, Pan CH, Wu CH. Sclareol Exhibits Anti-inflammatory Activity in Both Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages and the λ -Carrageenan-Induced Paw Edema Model. *J. Nat. Prod.* 75: 54–59. 2012.

Józsa L. G. Obesity in the paleolithic era. *Hormones*.10(3):241-244. 2011.

Kahn B B. Type 2 Diabetes: When Insulin Secretion Fails to Compensate for Insulin Resistance. *Cell*. 92: 593–596.1998.

Kelly T, Yang W, Chen C S, Reynolds K and He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International journal of obesity*. 32(9):1431-7. 2008.

Jung U. J. e Choi M. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (4): 6184-6223. 2014.

Kahn S. E., Hull R. L. e Utzschneider K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *NATURE*. 444: 840 – 846. 2006.

Kang MS, Hirai S, Goto Tsuyoshi, et al. Dehydroabietic acid, a phytochemical, acts as ligand for PPARs in macrophages and adipocytes to regulate inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 369: 333–338. 2008.

Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K e He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 32(9):1431-7. 2008.

Kyrikou, I., Georgopoulos, a, Hatziantoniou, S., Mavromoustakos, T., & Demetzos, C. A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, a bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. *Chemistry and physics of lipids*. 133(2):125–34. 2005.

Liang G., Yang J., Horton J. D., Hammer R. E., Goldstein J. L. e Brown M. S. Diminished Hepatic Response to Fasting/Refeeding and Liver X Receptor Agonists in Mice with Selective Deficiency of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c. *The journal of biological chemistry*. 277(11): 9520–9528. 2002.

Liu R, Liu Z, Zhang C, Zhang B. Nanostructured Lipid Carriers As Novel Ophthalmic Delivery System for Mangiferin: Improving In Vivo Ocular Bioavailability. *Journal of pharmaceutical sciences*.101:10. 2012.

Lobstein T., Baur L. e Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obesity reviews*. 5:4–85. 2014.

Madsbad S., Dirksen C. e Holst J. J. Mechanisms of changes in glucose metabolism and bodyweight after bariatric surgery. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2: 152–64.

Mahaira LG, Tsimplouli C, Sakellaridis N, et al. The labdane diterpene sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) induces apoptosis in human tumor cell lines and suppression of tumor growth in vivo via a p53-independent mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*. 666: 173–182. 2011.

Markus A. Neurobiology of obesity. *Nature Neuroscience*. 8:551. 2005.

Monteros LE, Gallegos ER, Torres NT, Escobedo RM. Effect of Germinated Soybean Protein Hydrolysates on Adipogenesis and Adipolysis in 3T3-L1 Cells. *Plant Foods Hum Nutr*. 66:355–362. 2011.

Mussi SV, Sawant R, Perche F, et al. Novel Nanostructured Lipid Carrier Co-Loaded with Doxorubicin and Docosahexaenoic Acid Demonstrates Enhanced *in Vitro* Activity and Overcomes Drug Resistance in MCF-7/Adr Cells Pharm Res. 31:1882–1892. 2014.

Mussi SV, Silva RC, Oliveira MC, et al. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. European Journal of Pharmaceutical Sciences.48: 282–290. 2013.

NCD Risk Factor Collaboration. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. The lancet. 387: 1377-1396. 2016.

Panee J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in Obesity and Diabetes. Cytokine. 60(1): 1–12. 2012.

Paradissis A, Hatziantoniou S, Georgopoulos A, Psarra AM, Dimas K, Demetzos C. Liposomes modify the subcellular distribution of sclareol uptake by HCT-116 cancer cell lines. Biomedicine & Pharmacotherapy. 61:120-124. 2007.

Park SJ, Philp A, Williams T, Luo H. et al. Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. Cell. 148: 421–433. 2012.

Patel, N. R., Hatziantoniou, S., Georgopoulos, A., Demetzos, C., Torchilin, V. P., Weissig, V., & D'Souza, G. G. M. Mitochondria-targeted liposomes improve the apoptotic and cytotoxic action of sclareol. Journal of liposome research. 20(3): 244–9. 2010.

Pinho L., Andrade J. M. O., Paraiso A., et al. Diet Composition Modulates Expression of Sirtuins and Renin-Angiotensin System Components in Adipose Tissue. Obesity. 21:1830-1835. 2013.

PubChem, Compound Summary, Sclareol. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. 2005. Data de acesso: 02/12/2016.

Pund S, Thakur R, More U, Joshi A. Lipid based nanoemulsifying resveratrol for improved physicochemical characteristics, *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* antiangiogenic efficacy. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.120: 110 –117. 2004.

Qatanani M. e Lazar M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*. 21:1443–1455. 2007.

Roden M., Price T. B., Perseghin G., Petersen K. F., Rothman D. L., Cline G. W. e Shulman G. Mechanism of Free Fatty Acid–induced Insulin Resistance in Humans. *The American Society for Clinical Investigation*. 97(12): 2859–2865. 1996.

Saito M. Brown Adipose Tissue as a Regulator of Energy Expenditure and Body Fat in Humans. *Diabetes Metab J* 2013;37:22-29.

Sánchez-Villavicencio M. L., Vinqvist-Tymchuk M., Kalt W., Matar C., et al. Fermented blueberry juice extract and its specific fractions have an anti-adipogenic effect in 3 T3-L1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 17:24. 2017.

Santos C F, Santos S H, Ferreira A V, Botion L M, Santos R A, Campagnole-Santos M J. Association of an oral formulation of angiotensin-(1–7) with atenolol improves lipid metabolism in hypertensive rats. *Peptides*. 43: 155–159. 2013 a.

Santos S H, Andrade J M, Fernandes L R, Sinisterra R D, Sousa F B, Feltenberger J D, et al. Oral Angiotensin-(1–7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF-kappaB in rats fed with high-fat diet. *Peptides*. 46:47–52. 2013 b.

Santos S H, Fernandes L R, Mario E G, Ferreira A V, Pôrto L C, Alvarez-Leite J I, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 57:340–347. 2008.

Santos SH e Andrade JM. Angiotensin 1–7: A peptide for preventing and treating metabolic syndrome. *Peptides*. 59: 34–41. 2014.

Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto LC, Alvarez-Leite JI, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*. 57:340–7. 2008.

Santos SH, Silva AC. The Therapeutic Role of Renin-Angiotensin System Blockers in Obesity-Related Renal Disorders. *Current Clinical Pharmacology*. 9: 2-9. 2014.

Sartipy P. e Loskutoff D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *100*:7265–7270. 2003.

Seshadri K. G. Obesity: A Venusian story of Paleolithic proportions. *Endocrinology and the Arts*. 16:134-136. 2012.

Solinas G. e Karin M. JNK1 and IKK: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *The FASEB Journal*. 24(8): 2596-2611. 2010.

Sone H., Takahashi A., Iida K. e Yamada N. Disease model: hyperinsulinemia and insulin resistance Part B – polygenic and other animal models. 7(8): 373-376. 2001.

Taylor S I. Deconstructing Type 2. *Cell*. 97: 9–12. 1999.

Tzanavari T., Giannogonas P., Karalis K. P. TNF- α and obesity. *Molecular and Cellular Mechanisms. Curr Dir Autoimmun*. 11: 145–156. 2010.

Vega-Monroy M. e Fernandez-Mejia C. Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism*. DOI: 10.5772/22089. Disponível em: <http://www.intechopen.com/sci-hub.bz/books/type-1-diabetes-pathogenesis-genetics-and-immunotherapy/beta-cell-function-and-failure-in-type-1-diabetes>. 2011.

Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico, 2011.

Vuksan V., Jenkins A.L., Brissette C., Choleva L., Jovanovski E., Gibbs A.L., et al. Salvia (Salvia hispanica L.) in the treatment of overweight and obese patients with type 2 diabetes: a double-blind randomized controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017 Feb;27(2):138-146.

Wan-Loy C. e Siew-Moi P. Marine Algae as a Potential Source for Anti-Obesity Agents . *Marine Drugs*.14(12): 222. 2016.

WHO. Childhood overweight and obesity. Disponível em: <www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/> Acesso em: 16/01/2016.

World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> . Data de acesso: 03/10/2016.

Zerb P. and Bohlmann J. Enzymes for synthetic Biology of Aambroxide-Related Diterpenoid Fragrabce Coumpounds. Adv Biochem Eng Biotechnol.148:427-47. 2015a.

Zerb P. and Bohlmann J. Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. Trends in Biotechnology xx.;1-10. 2015 b.

Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. TRENDS in Cell Biology. 11 (2). 2001.

Agradecimento às agências de fomento

Este trabalho foi apoiado e executado com a contribuição das seguintes agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).