

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**THAIS FERNANDES LUCIANO**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO DE *ZINGIBER*  
*OFFICINALE* SOBRE PARAMÊTROS METABÓLICOS E  
GENOTÓXICOS EM CAMUNDONGOS OBESOS INDUZIDOS POR  
DIETA**

**CRICIÚMA, JULHO DE 2018**

**THAIS FERNANDES LUCIANO**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO DE *ZINGIBER*  
*OFFICINALE* SOBRE PARAMÊTROS METABÓLICOS E  
GENOTÓXICOS EM CAMUNDONGOS OBESOS INDUZIDOS POR  
DIETA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pastoris Muller  
Co-orientadora: Profa. Dr. Vanessa Moraes de Andrade

**CRICIÚMA, JULHO DE 2018**

### **Folha informativa**

A tese foi elaborada seguindo a Resolução N.07/2015 do Colegiado do PPGCS/UNESC, que aprova elementos mínimos a constar na versão final de teses de doutorado e dissertações de mestrado. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biomedicina

Translacional do

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da

Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC)

...à meu irmão Cristiano (*in memoriam*), que  
infelizmente não pode estar presente neste momento tão importante da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Chegado o momento mais difícil deste trabalho, mas à tempo, o mais importante e verdadeiro, o momento de agradecer, lembrar, compartilhar com todos, os inúmeros, incontáveis momentos ou passagens desta trajetória. Foram 10 anos de vivência universitária, sendo que pelo período de 4 anos tive o prazer de fazer iniciação científica, por 2 anos fui bolsista de mestrado e 4 anos de dedicação a fim de concluir o presente doutorado. Dessa forma, não posso deixar de agradecer a oportunidade, a troca constante de conhecimentos e as amizades formadas ao longo desses anos.

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar pelos caminhos corretos e para mais essa conquista;

Aos meus pais, pelo incansável incentivo aos estudos desde minha infância até este tão importante momento de minha carreira, no qual, muitas vezes se doaram e renunciaram seus próprios sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Sendo assim, esta conquista não é só minha, mas nossa! Tudo que conquistei até então, só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre me deram.

Ao meu reconhecimento ao professor Alexandre Pastoris Muller pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela sua seriedade, compreensão e paciência diante das minhas limitações, pela rapidez em responder aos meus questionamentos, pelos ensinamentos e pela amizade;

A minha co-orientadora professora Vanessa Moraes de Andrade, agradeço imensamente a oportunidade de fazer parte do seu grupo, por todo apoio a mim dispensado, bem como as palavras de otimismo durante as estadas no LABIM e as trocas de conhecimento sobre o assunto que é nossa paixão: Nutrição.

Ao professor Claudio Teodoro de Souza a minha admiração e reconhecimento eterno, agradeço pela primeira oportunidade no meio científico, pela confiança que me foi depositada em sala de aula, pela amizade, conselhos e principalmente pela paciência.

Ao professor Ricardo Aurino Pinho, que exemplifica a ética e competência profissional, a dedicação e o aprimoramento contínuo, pelo incentivo e oportunidade de convívio.

A minha querida amiga/irmã Schérolin de Oliveira Marques, pelo privilégio de ser sua amiga. Sua alegria e energia boa que contagiam a todos que estão a sua volta. Agradeço pela parceria nesses 10 anos que se passaram, pelo qual, crescemos e aprendemos juntas. Obrigada pelo ombro amigo, viagens e momentos inesquecíveis que passamos juntas. Não importa a

distância ou o tempo, nossa amizade será eterna!

Agradeço ao meu namorado Dieison Bitencourt Isoppo que não mede esforços para me ver sempre feliz e realizada. Pelo incentivo nos momentos de desânimo. Por apoiar e vibrar comigo intensamente a cada fase vencida. Agradeço a compreensão pela minha ausência dedicada aos estudos, serei eternamente grata por todo seu apoio e amor. Me considero uma pessoa abençoada, pois tive a felicidade de encontrar um companheiro que não apenas me completa, mas que me “transborda”.

Agradeço ao “exército” do Lafibe, Labim e Biomedicina Translacional, pois todos irrestritamente foram fundamentais para que este trabalho, nascesse, crescesse e frutificasse. Agradeço em especial ao meu grande amigo e talentoso Gabriel Luiz, a minha linda e dedicada Naty Tramontim, a tranquilidade e prontidão da Kely Simon, a amorosa e organizada Paulinha Canteiro, a pessoa mais ética e humana Helen Soratto, a rainha dos blots e da paciência Barb Costa, o competente Gustavo de Bem, a futura médica Alana Colato e a dedicada plantonista Jéssica Luciano. Obrigada, vocês foram essenciais.

A todos os queridos amigos, obrigada pelo agradável e alegre convívio, pelos conhecimentos adquiridos nas reuniões de grupo e também pelos divertidos momentos de lazer, em especial a Giulia Strapazzon, Marina Magenis, Adri Damiani, Lu Longaretti, Maiara Pereira, Renata Nesi, Pauline Effting, Heron Sangaletti e Deivid Borges.

Não posso esquecer dos “antigos” mas eternos ICs/mestrandos/doutorandos, ou simplesmente amigos: Bruno Pieri, Dani Roxo, Gabi Mendonça, Matheus Rodrigues, Hemelin Farias, Lara Belletini, Vitor Comin, Elvis, Janesca, Ana Lucia e Mateus Caetano.

Agradeço aos meus amigos, em especial a Fernanda Maia, Bruna Martins, Lica Bobsin, Samara Barbosa, Marci Gelesky, Marco Fieira, além da TRIP BINOS/BOMBINETES que sempre manifestaram interesse, preocupação e ansiedade quanto ao andamento dos estudos.

Por fim, mas não menos importante, agradeço e parablenizo a UNESC e de maneira muito especial ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, pelo elevado nível organizacional e intelectual. Agradeço a Diana pela solicitude, prontidão e suporte administrativo. Estou muito feliz por ter escolhido essa universidade e por fazer parte da minha formação acadêmica.

A Capes que me concedeu uma bolsa de estudos durante a realização do presente doutorado, fato esse que contribuiu em muito para a viabilização desta tese. Portanto, deixo aqui registrado meu agradecimento.

O resultado final desses quatro anos não são apenas os resultados discutidos na análise de gráficos nesta tese, mas a principal marca desta caminhada é a amizade que nasceu e há de permanecer para sempre.

“Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa.”

**Mahatma Gandhi**

## RESUMO

O excesso de peso afeta mais de um bilhão de adultos em todo o mundo, e pelo menos 300 milhões deles são clinicamente obesos. A obesidade pode ser descrita como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal capaz de acarretar prejuízos à saúde. A obesidade é caracterizada pelo desequilíbrio no balanço energético, em que as combinações de alta ingestão calórica juntamente com o estilo de vida sedentário levam ao aumento significativo de peso corporal, seguido pelo aumento do tecido adiposo, menor longevidade e maior morbidade, com grandes propensões ao desenvolvimento de doenças como diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, dislipidemias e aterosclerose. Assim, o excesso de peso está envolvido em maior risco de um amplo espectro de alterações metabólicas. Nesse sentido, o gengibre foi utilizado na medicina chinesa para o tratamento de diversas patologias devido suas propriedades anti-inflamatória, antiemética, anticancerígena, antilipidêmica e hipoglicêmica. Diante disso, o presente estudo buscou avaliar se o extrato de *Zingiber officinale* pode resultar em melhora do perfil metabólico sistêmico e central em animais obesos, bem como identificar os possíveis mecanismos envolvidos neste processo. Camundongos Swiss foram alimentados por 16 semanas com dieta hiperlipídica (DIO). Após instalação da obesidade, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: i) dieta padrão + veículo ii) dieta padrão + *Zingiber officinale* iii) DIO + veículo e iv) DIO + *Zingiber officinale*. Os animais foram suplementados com 400 mg/kg/dia de *Zingiber officinale* por 35 dias por meio de gavagem oral. Ao final do período de tratamento, foram realizados os testes de tolerância oral à glicose, campo aberto, reconhecimento de objeto e labirinto em cruz elevado. Em seguida, os animais foram eutanasiados, o sangue, tecido adiposo epididimal, hepático, quadríceps e córtex cerebral foram removidos para análises histológicas, moleculares, bioquímicas e genotóxicas. Os resultados demonstraram que o extrato de *Zingiber officinale* foi capaz de reduzir a área sob a curva da glicose, ingestão alimentar bem como diminuir triglicérides séricos, mesmo sem alterações no peso corporal e no índice de adiposidade. Além disso, a suplementação com este extrato melhorou a memória de curto prazo nos animais obesos, reduziu o dano no DNA no sangue e no fígado. Corroborando com isso, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram menores no fígado e quadríceps dos animais obesos suplementados com 400mg/kg/dia de *Zingiber officinale*. A suplementação nos animais obesos reduziu a quantidade de espécies reativas em todos os tecidos analisados. Ademais, os danos oxidativos às proteínas foram reduzidos após suplementação nos animais obesos no tecido adiposo, quadríceps e no córtex. Já os danos em lipídeos foram reduzidos apenas no fígado dos animais obesos suplementados com *Zingiber officinale*. Por fim, a atividade antioxidante endógena foi maior especialmente no quadríceps e córtex de animais obesos suplementados. Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que a obesidade induzida por dieta altera diversos parâmetros metabólicos tecido dependente e que o extrato de *Zingiber officinale*, pode ser uma estratégia eficaz e segura, prevenindo o desenvolvimento das complicações da obesidade.

**Palavras chaves:** obesidade; *Zingiber officinale*; anti-inflamatório; antioxidante; genotoxicidade; função cognitiva.

## ABSTRACT

Overweight affects over one billion adults worldwide, and at least 300 million of them are clinically obese. Obesity can be described as an abnormal or excessive accumulation of body fat that can lead to health damage. Characterized by imbalance in energy balance, in which the combinations of high caloric intake together with the sedentary lifestyle lead to a significant increase in body weight, followed by an increase in adipose tissue, lower longevity and greater morbidity, with great propensities for the development of diseases such as diabetes, hypertension, cardiovascular diseases, dyslipidemias and atherosclerosis. Thus, being overweight is involved in a higher risk of a broad spectrum wide range of metabolic changes. In this regard, ginger has been used in Chinese medicine for the treatment of several pathologies due to its anti-inflammatory, antiemetic, anticancer, anti-lipid and hypoglycemic properties. Therefore, the present study sought to evaluate whether the extract of *Zingiber officinale* can result in improvement of the central and systemic metabolic profile in obese animals, as well as to identify the possible mechanisms involved in this process. Swiss mice were fed for 16 weeks on a hyperlipidic diet (DIO). After the installation of obesity, the animals were divided into four experimental groups: i) standard diet + vehicle ii) standard diet + *Zingiber officinale* iii) DIO + vehicle and iv) DIO + *Zingiber officinale*. The animals were supplemented with 400mg/ kg/day of *Zingiber officinale* for 35 days by oral gavage. At the end of the treatment period, oral tolerance tests were performed on glucose, open field, object recognition and high cross maze. Afterwards, the animals were euthanized, blood, epididymal adipose tissue, hepatic, quadriceps and cerebral cortex were removed for histological, molecular, biochemical and genotoxic analyzes. The results showed that the extract of *Zingiber officinale* was able to reduce the area on the glucose curve, food intake as well as decrease serum triglycerides, even without changes in body weight and adiposity index. In addition, supplementation with this extract improved short-term memory in obese animals, reduced DNA damage in blood and liver. Corroborating this, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were lower in the liver and quadriceps of obese animals supplemented with 400mg/kg/day of *Zingiber officinale*. Supplementation in obese animals reduced the amount of reactive species in all tissues analyzed. In addition, oxidative damage to proteins was reduced following supplementation in obese animals in adipose tissue, quadriceps and cortex. On the other hand, lipid damage was reduced only in the liver of obese animals supplemented with *Zingiber officinale*. Finally, the endogenous antioxidant activity was higher especially in the quadriceps and cortex of supplemented obese animals. Taken together, the results demonstrated that diet-induced obesity alters several tissue-dependent metabolic parameters and that the extract of *Zingiber officinale*, can be an effective and safe strategy, preventing the development of obesity complications.

**Key words:** obesity; *Zingiber officinale*; anti-inflammatory; antioxidant; genotoxicity; cognitive function.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Efeitos metabólicos do excesso alimentar. ....	21
<b>Figura 2:</b> Mecanismo da resistência à insulina induzida pela obesidade em resposta ao aumento da inflamação.....	23
<b>Figura 3:</b> Desequilíbrio entre a produção e neutralização da espécie reativa de oxigênio.....	24
<b>Figura 4:</b> Sinalização intracelular das enzimas antioxidantes.....	27
<b>Figura 5:</b> Desenho experimental. ....	355
<b>Figura 6:</b> Efeitos sobre a ingestão alimentar, composição corporal e sensibilidade a insulina em camundongos obesos tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	45
<b>Figura 7:</b> Efeitos sobre a concentração de citocinas no tecido adiposo epididimal de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	47
<b>Figura 8:</b> Efeitos sobre a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo no tecido adiposo epididimal de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> . ....	49
<b>Figura 9:</b> Efeitos sobre a concentração de citocinas no fígado de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	50
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografias histológicas de tecido hepático coradas em hematoxilina e eosina de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	51
<b>Figura 11:</b> Efeitos sobre a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo no fígado de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	53
<b>Figura 12:</b> Efeitos da suplementação com <i>Zingiber officinale</i> sobre os danos ao DNA avaliados pelo ensaio cometa. ....	54
<b>Figura 13:</b> Efeitos sobre a concentração de citocinas no quadríceps de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	55
<b>Figura 15:</b> Efeitos sobre as alterações cognitivas de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	59
<b>Figura 16:</b> Efeitos sobre a concentração de citocinas e neurotrofinas no córtex de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	60
<b>Figura 17:</b> Efeitos sobre a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo no córtex de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com <i>Zingiber officinale</i> .....	62
<b>Figura 18:</b> Desenho esquemático representando os efeitos benéficos do <i>Zingiber Officinale</i> e seus compostos ativos nas respostas metabólicas.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACC- Acetil CoA Carboxilase.
- ADP- Adenosina-5'-difosfato.
- AGE- Produtos Finais de Glicação Avançada, *Advanced Glycation end Products*.
- AKT- Proteína Cinase B, do inglês *Protein kinase B*.
- AMPK- Proteína Cinase Ativada por AMP, do inglês *AMP-activated Protein Kinase*.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- ATP- Adenosina Trifosfato, do inglês *Adenosine Triphosphate*.
- CAT- Catalase.
- ChREBP- Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo aos Carboidratos, do inglês *Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein*.
- CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais.
- COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
- DAC- Doença Arterial Coronariana.
- DAG- Diacilglicerol, do inglês *Diacylglycerol*.
- DCF- 2',7'-diclorofluoresceína, do inglês *2',7'-dichlorofluorescein*.
- DIO- Obeso Induzido por Dieta, do inglês *Diet Induced Obese*.
- ERO- Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês *Reactive Oxygen Species*.
- FAS- Ácido Graxo Sintase, do inglês *Fatty Acid Synthase*.
- GSK-3 $\beta$ - Glicogênio Sintase Cinase 3 $\beta$ , do inglês *Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* .
- HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Resolução, do inglês *high performance liquid chromatograph*.
- I $\kappa$ B - Indutor do Fator *Kappa B*.
- IKK - Complexo I $\kappa$ B Cinase.
- IL-1 $\beta$ - Interleucina 1 $\beta$ .
- IL-6 -Interleucina 6.
- IMC- Índice de Massa Corporal.
- IR - Receptor de Insulina.
- IRS1 e 2 - Substrato do Receptor de Insulina 1 e 2.
- ITT- Teste de Tolerância Intraperitoneal à Insulina.
- GLUT- Transportadores de Glicose, do inglês *Glucose Transporter*.
- GC- Glicocorticóide.
- GR- Glutathiona Redutase, do inglês *Glutathione Reductase*.

GPx- Glutationa Peroxidase, do inglês *Glutathione Peroxidase*.

GSH- Glutationa Reduzida.

GSK-3- Glicogênio Sintase Cinase 3, do inglês *Glycogen Synthase Kinase 3*.

HPA- Hipotálamo Hipófise Adrenal.

HSL- Lipase Sensível a Hormônio, do inglês *Hormone-Sensitive Lipase*.

JNK- c-Jun N-Terminal Cinase.

LDL- Lipoproteína de baixa densidade.

MCP-1- Proteína Quimiotática de Monócitos, do inglês *Monocyte Chemotactic Protein*.

NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*.

NFκB - Fator Nuclear Kappa B, do inglês *Factor Nuclear Kappa B*.

NMDA- N-metil D-Aspartato.

NO- Óxido Nítrico, do inglês *Nitric Oxide*.

NO<sub>2</sub>- Nitrito.

NOX- Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*.

NQO1- Quinona Oxidoreductase 1, do inglês *Quinone Oxidoreductase 1*.

NRF2- Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator, do inglês *Nuclear Factor-Erythro 2-Related Factor 2*.

PAI-1- Inibidor do Ativador de Plasminogênio, do inglês *Plasminogen Activator Inhibitor-1*.

PCR- Proteína C Reativa, do inglês *C-Reactive Protein*.

PGC1α- Co-ativador-1α do Receptor ativado por Proliferador de Peroxissoma, do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α*.

PI3K - Fosfatidilinositol 3 Cinase, do inglês *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PKCy- Proteína Serina Cinase, do inglês *Protein Serine Kinase*.

PPARγ- Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissoma, do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*.

SBCAL- Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

SH2- Homologia a Src2.

SNC - Sistema Nervoso Central.

SOD- Superóxido Dismutase, do inglês *Superoxide Dismutase*.

STZ- Estreptozotocina, do inglês *Streptozotocin*.

TAG- Triacilglicerol.

TGFβ- Fator de Transformação do Crescimento, do inglês *Transforming Growth Factor*.

TLR4- Receptor Semelhante ao Toll da drosophilla, do inglês *Toll Like Receptor*.

TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ , do inglês *Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$* .

UCP-1- Proteína Desacopladora 1, do inglês *Uncoupling Protein-1*.

UNESC- Universidade do Extremo Sul Catarinense.

VIGITEL- Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico.

VLDL- Lipoproteína de Densidade Muito Baixa.

ZO- *Zingiber Officinale*.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 OBESIDADE.....	16
1.2 TECIDO ADIPOSEO E CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS .....	19
1.3 PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA OBESIDADE .....	23
1.4 OBESIDADE E FUNÇÃO COGNITIVA .....	27
1.5 EFEITOS METABÓLICOS DO <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> .....	29
1.6 JUSTIFICATIVA .....	31
2 OBJETIVO GERAL.....	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	34
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E EXPOSIÇÃO À DIETAS.....	34
<b>3.2.1 Suplementação com extrato de gengibre .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2 Controle da ingestão alimentar .....</b>	<b>36</b>
3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA (ITT).....	36
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	36
<b>3.4.1 Teste comportamental de atividade exploratória: habituação ao campo aberto ....</b>	<b>36</b>
<b>3.4.2 Teste de reconhecimento de objeto .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.3 Teste do labirinto em cruz elevado .....</b>	<b>37</b>
3.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COMPOSIÇÃO CORPORAL .....	38
<b>3.5.1 Avaliação histológica .....</b>	<b>38</b>
3.6 LÍPIDEOS SÉRICOS .....	38
3.7 DOSAGENS DE CITOCINAS .....	38
3.8 DOSAGENS DE FATORES NEUROTRÓFICOS.....	39
3.9 PRODUÇÃO DE OXIDANTES .....	40
<b>3.9.1 Espécies reativas por diacetato de difluoresceína (DCFH).....</b>	<b>40</b>
<b>3.9.2 Indicador de formação de óxido nítrico (NO).....</b>	<b>40</b>
3.10 DEFESAS ANTIOXIDANTES .....	40
<b>3.10.1 Superóxido Dismutase (SOD) .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10.2 GSH/GSSG .....</b>	<b>41</b>
<b>3.10.3 Atividade da catalase.....</b>	<b>41</b>
3.11 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.....	41
<b>3.11.1 Carbonil.....</b>	<b>41</b>
<b>3.11.2 Formação de malondialdeído (MDA) .....</b>	<b>41</b>
3.12 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	42
3.13 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE .....	42
<b>3.13.1 Ensaio cometa alcalino .....</b>	<b>42</b>
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	43
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA, CONSUMO ENERGÉTICO E COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	44
4.2 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> SOBRE LÍPIDEOS SÉRICOS.....	46
4.3 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL.....	46

4.4 PRODUÇÃO DE OXIDANTES, SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO NO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL.....	47
4.5 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NO TECIDO HEPÁTICO .....	49
4.6 MORFOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO .....	50
4.7 PRODUÇÃO DE OXIDANTES, SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO NO TECIDO HEPÁTICO.....	52
4.8 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> SOBRE OS DANOS AO DNA AVALIADOS PELO ENSAIO COMETA .....	54
4.9 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NO MÚSCULO QUADRÍCEPS .....	55
4.10 PRODUÇÃO DE OXIDANTES, SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO NO QUADRÍCEPS .....	55
4.11 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> SOBRE A COGNIÇÃO .....	58
4.12 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i> SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS E NEUROTROFINAS NO CÓRTEX CEREBRAL ..	60
4.13 PRODUÇÃO DE OXIDANTES, SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO NO CÓRTEX .....	61
5 DISCUSSÃO .....	63
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>74</b>
ANEXO A- Carta de aprovação da CEUA .....	110
ANEXO B- Laudo analítico do extrato de <i>Zingiber officinale</i> .....	111

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OBESIDADE

A obesidade tornou-se um tema de crescente preocupação, dado o importante aumento em sua prevalência e a sua associação com diversas doenças (Upadhyay et al., 2018). Apesar de não ser um fenômeno novo na história da humanidade, gera intensa preocupação na saúde pública por ter alcançado proporções epidêmicas (NCD-RisC, 2016). Estudo realizado por Ezzati et al. (2016), com o objetivo de estimar as tendências do índice de massa corporal (IMC), tomando 1698 estudos com base em medidas de 19,2 milhões de pessoas de 200 países. O estudo foi realizado entre os anos de 1975 a 2014 e apontou um aumento do IMC de 21.7 kg/m<sup>2</sup> em 1975 para 24.2 kg/m<sup>2</sup> em 2014 para os homens e 22.1kg/m<sup>2</sup> em 1975 para 24.4 kg/m<sup>2</sup> em 2014 para as mulheres. O mesmo estudo apontou que a prevalência da obesidade padronizada por idade aumentou de 3,2% em 1975 para 10,8% em 2014 para homens e de 6,4% para 14,9% para as mulheres; 2,3% dos homens e 5,0% das mulheres são classificados como obesos severos (i.e. IMC  $\geq$ 35 kg/m<sup>2</sup>). Além disso, globalmente a prevalência da obesidade mórbida é de 0,64% em homens e 1,6% em mulheres. De acordo com a interpretação do estudo, se esta tendência continuar até 2025, a prevalência mundial de obesidade alcançará 18% nos homens e ultrapassará os 21% nas mulheres. No Brasil, conforme revelam os dados da vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL), 57,7% dos homens apresentam sobrepeso e 18,1% são obesos, enquanto entre as mulheres, 50,5% possuem sobrepeso e 19,6% obesidade (Ministério da Saúde, 2016).

A etiologia da obesidade é multifatorial e envolve fatores biológicos, psicológicos, nutricionais, hormonais, econômicos, sociais, comportamentais e ambientais, os quais se inter-relacionam resultando em acúmulo de gordura corporal (Mendonça et al., 2010; Santos e Rabinovich, 2011; Moraes et al., 2013). Dentre esses fatores, o excessivo consumo de energia associado ao baixo nível de atividade física são reconhecidamente os que mais contribuem para o excesso de peso corporal (Santos e Rabinovich, 2011). No que diz respeito ao Brasil, as alterações no consumo alimentar acompanharam as mudanças econômicas, sociais e demográficas das populações, promovendo uma modificação no perfil das doenças e agravos, gerados pela nutrição inadequada. Essa transição iniciou a partir do processo de industrialização e mecanização, proporcionando avanços na agricultura e no processamento dos alimentos, tornando-os mais disponíveis no mercado. Em adição, com o ingresso da

mulher no mercado de trabalho, adquiriu-se novos hábitos, dando preferência por alimentos rápidos, reduzindo o consumo de frutas, hortaliças e fibras e, acrescentado a isso, o aumento de alimentos industrializados com alta densidade energética, tais como gordura e açúcar (Malik et al., 2013; Ríos-Hoyo et al., 2014).

Um dos maiores fatores que contribuem para a prevalência da obesidade e suas comorbidades, é a escolha da dieta, destacando-se aqueles induzidos por excesso de gorduras. O excesso do ácido graxo saturado palmitato leva ao aumento da fosforilação da proteína pró-inflamatória c-jun cinase N-terminal (JNK) e da liberação da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Por outro lado, o ácido graxo insaturado palmitoleato é incapaz de induzir a liberação de TNF- $\alpha$  ou a fosforilação da JNK (Lancaster et al., 2018). Além disso, Lancaster e colaboradores (2018) demonstraram que o palmitato ativa moléculas da via inflamatória e que o excesso de ácidos graxos saturados de cadeia longa, ativam, indiretamente, os receptores *Tool like 4* (TLR-4), os quais desempenham uma conexão importante entre o sistema imune inato e o sistema metabólico, regulando a inflamação induzida pela obesidade.

Em adição, tem sido relatado o papel inflamatório da microbiota intestinal e, conseqüentemente, na inflamação sistêmica (Sonnenburg e Backhed, 2016). Especificamente, foi demonstrado que a obesidade e dietas ricas em gordura saturada alteram a composição da microbiota intestinal, aumentando a absorção intestinal de produtos microbianos derivados do intestino que levam a um aumento da concentração de lipopolissacarídeos circulantes, um processo denominado endotoxemia metabólica (Cani et al., 2007; Sonnenburg e Backhed, 2016). Este processo, pode iniciar a inflamação do tecido adiposo e a ativação de macrófagos de maneira dependente da sinalização inflamatória via TLR-4 (Caesar et al., 2015). Os macrófagos, uma vez recrutados para o tecido adiposo, como resultado de uma reprogramação metabólica, tornam-se altamente sensíveis aos efeitos inflamatórios dos ácidos graxos saturados de cadeia longa, cujas concentrações estão elevadas no tecido adiposo dos obesos (Lancaster et al., 2018).

Por outro lado, um recente estudo clínico randomizado em humanos relatou controvérsias quanto ao consumo de gorduras (Dehghan et al., 2017). Os estudos mostram que em humanos o consumo de gorduras, em especial a gordura saturada, não altera vias bioquímicas na mesma proporção que os carboidratos. Apesar de grande parte dos estudos experimentais induzirem a obesidade com dieta hiperlipídica, há discrepâncias que precisam ser identificadas como: diferentes composições dos ácidos graxos, tempo de duração da dieta, variação sazonal e características genéticas dos animais (Heydemann et al., 2016).

Interessantemente, o estudo recente de Maioli e colaboradores (2016) onde foram comparados os efeitos da dieta rica em gordura associada a dieta rica em carboidratos refinados, mostrou que tal combinação desencadeou alterações similares à síndrome metabólica. Os resultados do estudo de Maioli e colaboradores 2016, demonstraram que o alto teor de gordura associado com carboidratos refinados apresentou sintomas mais graves do que gordura ou carboidratos isolados, incluindo hiperglicemia, hipercolesterolemia, maiores concentrações de mediadores inflamatórios e menores níveis de células T reguladoras. Collins e colaboradores (2018) observaram relações positivas significativas entre o percentual de gordura corporal e os níveis séricos de IL-1 $\beta$  em animais obesos induzidos por dieta rica em gorduras e em açúcares.

O aumento do tecido adiposo está associado a menor longevidade e maior morbidade, com grandes propensões ao desenvolvimento de doenças como aterosclerose, hipertensão, doenças cardiovasculares, dislipidemias e diabetes (Pérez et al., 2013; Sasson et al., 2014). Essas alterações culminam no aumento da ingestão alimentar, redução do gasto energético por meio de ações no hipotálamo e alterações na homeostase de tecidos como músculo e fígado, promovendo resistência à insulina (Galic et al., 2010). Nesse contexto, a correlação entre a obesidade e diabetes é comprovada por estudos os quais demonstraram que 90% dos portadores de diabetes mellitus tipo 2 são obesos (Sartorelli e Franco, 2003; WHO, 2003; Li et al., 2015). Acredita-se que o elo entre a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 seja o surgimento da resistência à ação do hormônio insulina. É defendido que a resistência à insulina em obesos ocorra por três principais alterações provocadas pelo tecido adiposo, como elevados níveis de ácidos graxos livres na circulação, liberação de citocinas pró-inflamatórias e acúmulo de ácidos graxos no músculo, fígado e pâncreas (lipotoxicidade) (Després e Lemieux, 2006; Osborn e Olefsky, 2012). Assim, o excesso de tecido adiposo é um dos principais fatores para a ativação de vias sinalizadoras inflamatórias que causam prejuízos na transdução intracelular da insulina (Jung e Choi, 2014).

A insulina é um potente hormônio anabólico peptídico produzido e secretado pelas células  $\beta$  pancreáticas em resposta ao aumento da concentração de glicose e aminoácidos na corrente sanguínea (Hoang e Thorn, 2015). Esse hormônio mantém normais os níveis de glicose no sangue, facilitando a captação de glicose pelas células, regulando o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, e promovendo a divisão e o crescimento celular por meio de efeitos mitogênicos (Boucher et al., 2014). A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação ao receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina (IR) (Youngren, 2007), levando à alteração conformacional e à autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163) (Ebina et al., 1985). A ativação do IR estimula a

fosforilação em tirosina de diversos substratos, conhecidos por substrato do receptor da insulina (IRS) (White, 1998). A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para outras proteínas como a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), promovendo sua ativação. A PI3K regula a quinase dependente de fosfoinosítideos 1 (PDK-1), uma proteína serina/treonina cinase que fosforila e aciona outra serina/treonina cinase conhecida como Akt (Alessi e Cohen, 1998; Chen et al., 2001). A ativação da Akt induz a captação periférica de glicose principalmente nos tecidos muscular e adiposo por aumentar o direcionamento dos transportadores de glicose (GLUT) do citoplasma para a membrana plasmática (Martini et al., 2014).

A modificação na ativação de qualquer proteína envolvida na sinalização necessária para as ações da insulina pode resultar em resistência a esse hormônio, na qual as células alvo têm uma resposta subnormal aos níveis de insulina circulante, resultando em menor captação da glicose (Dey et al., 2006). Em consequência à menor captação de glicose, o pâncreas secreta mais insulina para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando desta forma os níveis circulantes de insulina (hiperinsulinemia) (Pessin e Saltiel, 2000; Correia et al., 2002; Lois, 2010). Além de comprometer a captação da glicose, a resistência à insulina compromete a ativação das vias anabólicas (Avramoglu et al., 2006).

## 1.2 TECIDO ADIPOSEO E CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS

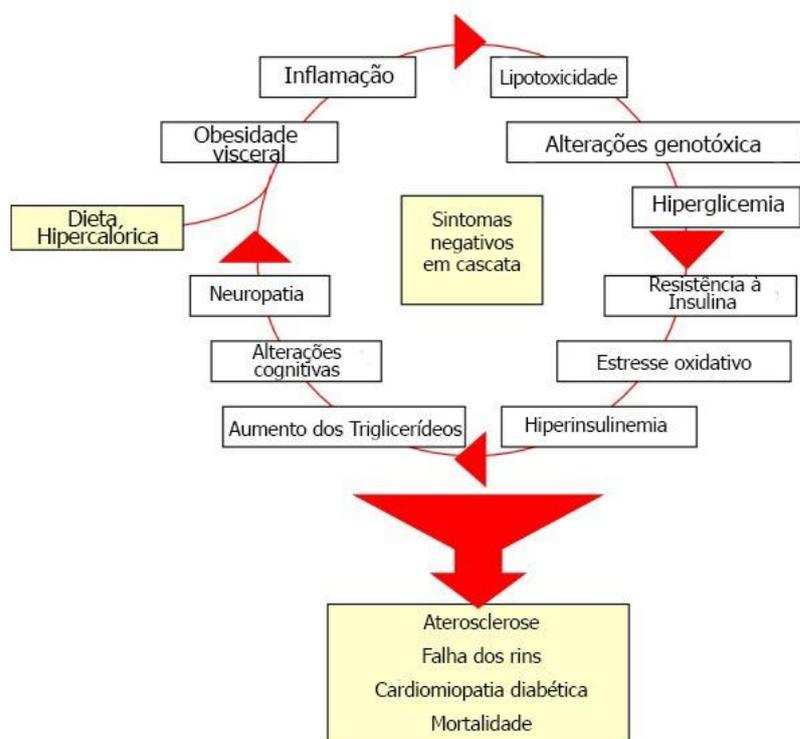
Em indivíduos obesos, a expansão do tecido adiposo é resultante de dois processos, o aumento dos depósitos de triglicerídeos nos adipócitos (hipertrofia), bem como a maior diferenciação de novos adipócitos (hiperplasia). O tecido adiposo é classificado em tecido adiposo branco e marrom. O tecido adiposo marrom, possui adipócitos multiloculares com abundantes mitocôndrias que expressam grandes quantidades de proteína desacopladora 1 (UCP-1). Além disso, o tecido adiposo marrom é altamente vascularizado e ricamente innervado pelos nervos simpáticos, sua ativação é predominantemente regulada pelo sistema nervoso simpático por meio de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Dulloo et al., 2010). Por outro lado, o tecido adiposo branco é responsável pelo armazenamento de gordura e consiste de diferentes tipos celulares, dentre eles os adipócitos e células do estroma vascular que incluem: fibroblastos, células endoteliais, pré-adipócitos, adipócitos maduros e células do sistema imunológico, como os macrófagos (Maury e Brichard, 2010). Os adipócitos também atuam a nível de sistema nervoso central (SNC) controlando a ingestão alimentar, por meio da secreção de leptina (Friedman, 2011).

Adipócitos hipertróficos-hiperplásicos exibem menor densidade de receptores da insulina e maior de receptor  $\beta_3$  adrenérgico, o que facilita a diapedese de monócitos ao estroma do adiposo visceral, iniciando um ciclo pró-inflamatório promovendo uma inflamação sistêmica de baixo grau (Deng e Scherer, 2010). Em conjunto, ocorre maior taxa de lipólise e liberação de ácido graxo livre, aumento da produção de radicais livres, indução de resistência à insulina, sinergismo na ação da interleucina 6 (IL-6), interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) e do TNF- $\alpha$  e indução de apoptose em células beta pancreáticas (Nakamura et al., 2014). O efeito entre o aumento do tecido adiposo e a inflamação é proporcional, ou seja, quanto maior a adiposidade, maior os níveis de citocinas inflamatórias e quanto maior a quantidade de tecido adiposo maior associação com a síndrome metabólica (Volp et al., 2008). Dentre as adipocinas secretadas pelo tecido adiposo branco com ação pró-inflamatória destacam-se: TNF- $\alpha$ , IL-6, proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), angiotensinogênio, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF $\beta$ ), leptina, adpsina e resistina (Ottaviani et al., 2011; Panee, 2012; Nitta e Orlando, 2013; Alomar et al., 2015).

Além disso, é observada alteração do perfil de células imunológicas, com características mais inflamatórias tais como aumento de macrófagos M1 e linfócitos T auxiliares (Th1) (Li et al., 2018). Macrófagos que migram para o tecido adiposo de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura, diferem dos que residem no tecido adiposo de animais alimentados com dieta padrão (Haase et al., 2014). Macrófagos residentes ou M2 são caracterizados por expressão e produção de citocinas anti-inflamatórias, enquanto os macrófagos recrutados em consequência de obesidade induzida por dieta ou M1, produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL6 (Lumeng et al., 2007; Galic et al., 2010). Corroborando a isso, Bertin et al. (2000) observaram que os níveis de TNF- $\alpha$  estão aumentados no tecido adiposo de pacientes obesos e resistentes à insulina. Assim, o tecido adiposo não é considerado apenas um mero estocador de energia ou regulador da temperatura corporal, mas um órgão endócrino, metabolicamente ativo, secretor de peptídeos bioativos que apresentam ação local e sistêmica (Ottaviani et al., 2011; Panee, 2012; Nitta e Orlando, 2013; Alomar et al., 2015).

De fato, estudos demonstram que o indivíduo obeso possui um estado inflamatório aumentado (Nascimento et al., 2010; Villarroya et al., 2018). O excesso de tecido adiposo resulta em concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias como já mencionado, levando a um desequilíbrio entre estímulos inflamatórios e anti-inflamatórios, resultando no quadro crônico de inflamação de baixo grau (Jung e Choi, 2014); associado à isso, elevado

nível da proteína C reativa (PCR) (Greenfield et al., 2004). Sendo assim, o tecido adiposo pode ser responsável pela fisiopatogenia, interligando mecanismos fisiológicos e bioquímicos, clínicos e metabólicos das doenças crônicas associadas à obesidade, que incluem: aterosclerose, hipertensão arterial, dislipidemias, doença arterial coronariana (DAC), esteatose hepática não alcoólica e principalmente diabetes tipo 2 (Vischer e Seidell, 2001; Volp et al., 2008; Leite et al., 2009; Odegaard e Chawla, 2013; Sasson et al., 2014) (Figura 1).



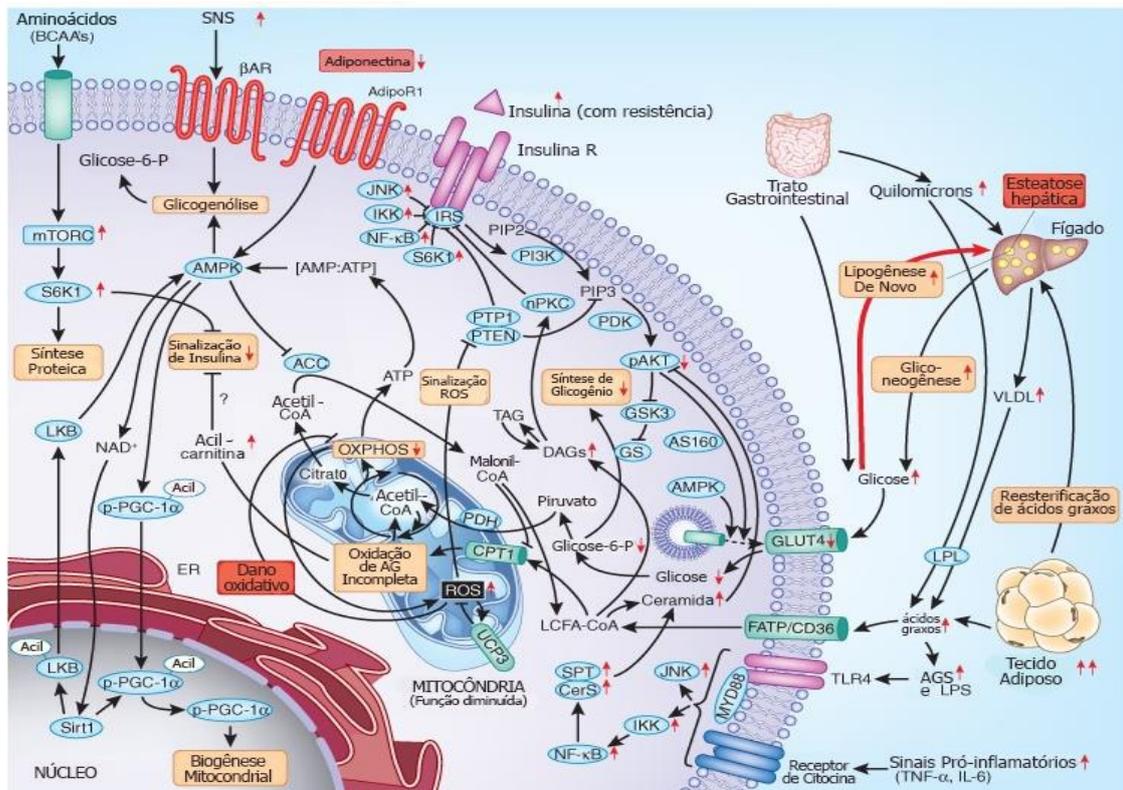
**Figura 1:** Efeitos metabólicos do excesso alimentar. Associação entre alterações negativas e complexas induzidas pela obesidade (Adaptada de Heydemann, 2016).

A descoberta da infiltração de macrófagos no tecido adiposo visceral e da produção de adipocitocinas permitiu uma melhor compreensão acerca dos mecanismos que regulam o desenvolvimento de resistência à insulina. Além disso, o aumento da absorção e menor taxa de oxidação de ácidos graxos livres nos obesos contribui para o acúmulo de metabólitos lipídicos, o que provoca defeitos na via de sinalização da insulina (Mokdad et al., 2003; Kashyap et al., 2004; Hansen et al., 2010; Urbanavičius et al., 2013). Aumento dos níveis plasmáticos de AGL na obesidade são resultado de três principais eventos fisiopatológicos: (i) insulina inibe a lipólise, por meio da inibição da lipase sensível a hormônio (HSL) (Jansson et al., 1994). A redução da atividade da insulina e conseqüentemente da supressão da lipólise do tecido adiposo no período pós-prandial é observado em casos de resistência à insulina, promovendo a liberação de AGL para a circulação; (ii) redução na oxidação de AGL; (iii)

níveis elevados de AGL inibem os efeitos anti-lipolíticos da insulina, aumentando ainda mais a liberação de AGL na circulação (Rachek et al., 2014).

Os AGL, quando não oxidados, são redirecionados para o fígado e músculo esquelético aumentando o conteúdo de diacilglicerol (DAG), um sinalizador intracelular, que estimula a proteína serina cinase (PKC $\gamma$ ). A PKC $\gamma$  é responsável pela resistência à insulina, redução na fosforilação da tirosina dos substratos do receptor de insulina 1/2, com consequente fosforilação do IRS1 em Serina 307 e ativação do fator nuclear Kappa B (NF $\kappa$ B) (Yu et al., 2002; Boden et al., 2009). Os mecanismos pelos quais os lipídeos intramiocelulares contribuem para resistência à insulina na obesidade ainda não estão completamente compreendidos, mas metabólitos lipídicos tais como acil CoA de cadeia longa, DAG e ceramidas estão envolvidos (Muoio, 2012).

Um dos principais substratos da via de sinalização do TNF- $\alpha$ , é a serina cinase, JNK. A via de sinalização da proteína JNK está envolvida na patogênese da obesidade e resistência à insulina (Weston e Davis, 2007). Experimentos realizados com roedores relatam que camundongos com mutação genética dessa proteína apresentaram melhor captação de glicose e menor depósito de gordura mesmo quando submetidos a uma dieta rica em gordura (Dandona et al., 2004). Além da JNK, outra via pró-inflamatória (ativada por citocinas) pode levar à fosforilação em serina do IRS, via do IKK/I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B (Shoelson et al., 2003) (Figura 2). A ativação de IKK promove a separação do complexo I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B atenuando o sinal da insulina. NF $\kappa$ B é um fator de transcrição que regula a expressão de mais de 400 diferentes genes, a maioria deles estando relacionados a expressão de proteínas inflamatórias. Diante das evidências, conclui-se que a inflamação desempenha um papel importante na obesidade. Sendo assim, o consumo de nutrientes com ação anti-inflamatória pode melhorar as complicações induzidas pela obesidade no tecido adiposo, hepático e muscular, reduzindo o estado inflamatório (Connaughton et al., 2016).



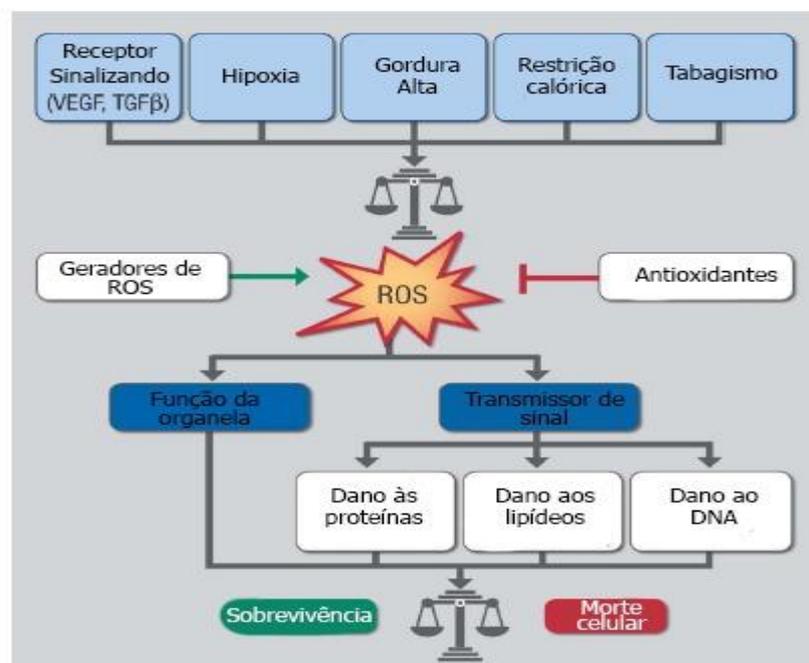
**Figura 2:** Mecanismo da resistência à insulina induzida pela obesidade em resposta ao aumento da inflamação.

1) Aumento da lipólise nos adipócitos com consequente liberação de AGL, na corrente sanguínea. Quando não oxidados, os AGL, são redirecionados para o fígado e músculo esquelético aumentando o conteúdo DAG, um sinalizador intracelular, que estimula a PKCγ. 2) Aumento das proteínas serina cinases, conhecidas por promover a fosforilação em serina do IRS1, comprometendo a transdução do sinal da insulina. 3) Aumento das proteínas fosfatases, no qual, retiram fosfatos de moléculas essenciais para a transdução do sinal da insulina (Adaptada e-posters Nature Medicine).

### 1.3 PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA OBESIDADE

Estudos realizados em humanos e modelos experimentais de obesidade mostraram forte correlação entre adiposidade e aumento de marcadores do estresse oxidativo sistêmico (Pausova, 2006; Manna e Jain, 2015). Os mecanismos para estas alterações parecem estar relacionados, em parte, à excessiva formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Esposito et al., 2006; Diniz et al., 2008). As ERO são moléculas ou fragmentos moleculares altamente instáveis e reativos, com meia vida curta, possuindo um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo que tendem a extrair elétrons de outras moléculas para alcançar um estado mais estável (Halliwell e Gutteridge, 2007). Diversas moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio são denominadas de ERO, dentre elas: o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), as espécies oxidantes não radicalares como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio *singlet* (Mandal et al., 2010).

Em concentrações fisiológicas, os processos de oxidação são importantes para a sobrevivência das células, diferenciação e proliferação celular, crescimento e apoptose (Allen e Tresini, 2000; Droge, 2002; Ji, 2007), porém a produção excessiva de ERO, pode levar a condição metabólica chamada de estresse oxidativo (Bernhard e Wang, 2007; Csiszar et al., 2009; Varela-Carver et al., 2010). O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre a formação e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração excessiva de ERO, diminuição de antioxidantes endógenos ou ambos (Echtay, 2007; Matsuzawa-nagata et al., 2008). Em grande extensão, o estresse oxidativo, induz danos às macromoléculas devido a capacidade de reagir facilmente com biomoléculas que se localizam em torno de seu sítio de formação, podendo levar a prejuízos celulares como: peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e fragmentação de ácidos nucleicos (Valko et al., 2007; Roberts e Sindhu, 2009; Talukder, 2011). Harman (1956), sugeriu que os radicais livres provocam danos cumulativos e irreversíveis a macromoléculas, perda da função e morte celular ao longo do tempo impactando diretamente na saúde e na expectativa de vida (Figura 3).



**Figura 3:** Desequilíbrio entre a produção e neutralização da espécie reativa de oxigênio. Em altas concentrações as espécies reativas de oxigênio levam a danos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, no entanto, em concentrações menores podem atuar como sinalizadores moléculas (Adaptado de Egea et al., 2017).

As espécies oxidantes são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial, no metabolismo dos ácidos graxos peroxissômicos, nas reações do citocromo P450 e em uma resposta imunológica (Giordano, 2005; Madamanchi et al., 2005). As mitocôndrias tem

grande relevância na produção de ERO (Balaban et al., 2005; Hamanaka e Chandel, 2010; Waypa e Schumacker, 2010). Na mitocôndria, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, a partir da oxidação do citocromo c pela ação da enzima citocromo oxidase, com consequente formação de água. Dessa forma, a ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria (Srinivasan et al., 2013). No entanto, cerca de 2 a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1989; Schneider e Oliveira, 2004).

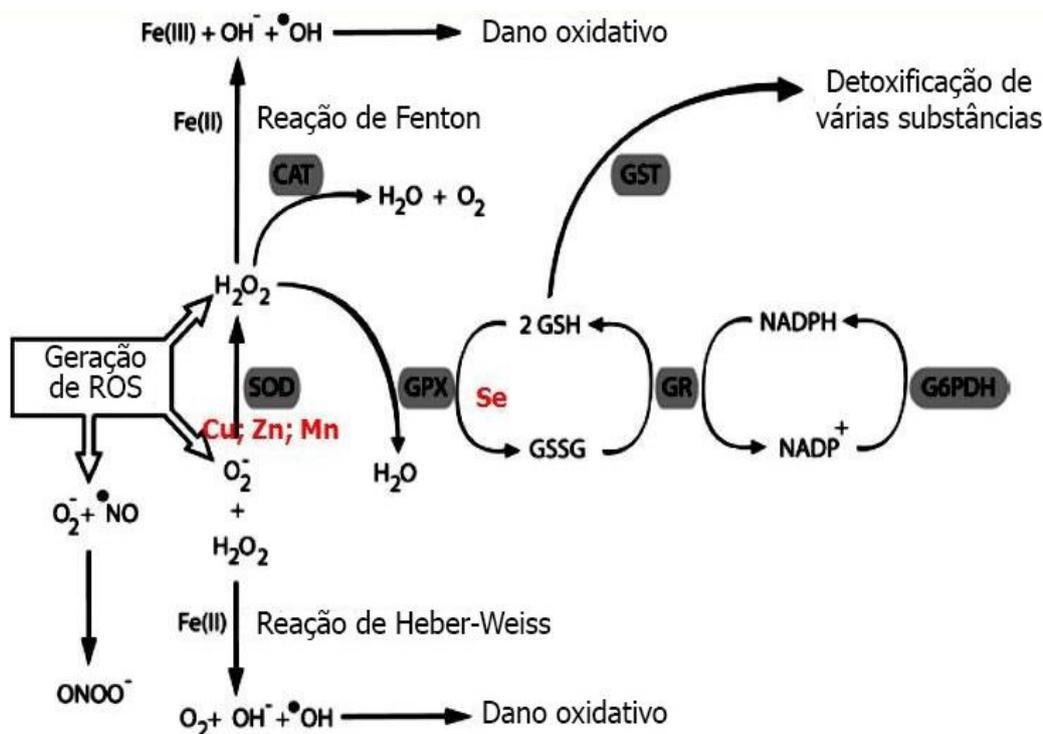
Os possíveis contribuintes para o aumento de ERO na obesidade incluem hiperglicemia (Aronson et al., 2002), elevado acúmulo de lipídeos teciduais (Beltowski et al., 2000), deficiências de vitaminas e minerais (Ortega et al., 2012), inflamação crônica (Fernández-Sánchez et al., 2011), hiperleptinemia (Bouloumie et al., 1999), comprometimento da função mitocondrial (Pennathur e Heinecke, 2007), tipo de dieta (Khan et al., 2006) e hiperglicemia. A hiperglicemia induz o aumento na produção de ERO na mitocôndria, por meio do aumento do gradiente de prótons na membrana interna mitocondrial. Quando o gradiente excede o limiar, a transferência de elétrons no complexo III da cadeia respiratória é bloqueada, levando a escapes de elétrons da ubiquinona, com consequente formação de  $O_2^{\bullet-}$  (Choi et al., 2008). O radical livre inibe a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e redireciona a glicose para vias alternativas: a glicose é deslocada para a via do poliol; a frutose-6-fosfato é deslocada para a via da hexosamina. Além disso, a triose fosfato produz metilglioxal, o principal precursor de produtos finais de glicação avançada (AGE); e o di-hidroxiacetona fosfato é convertido em DAG, que ativa a PKC. A ativação de vias alternativas, como a do poliol, metilglioxal e DAG aumentam o estresse oxidativo/nitrosativo. Em especial, a ativação da via do poliol depleta a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Evans et al., 2002; Pennathur e Heinecke, 2004; Savini et al., 2013) e a formação de AGE e PKC estimulam a produção de ERO/ERN ativando NOX e NF- $\kappa$ B (Diaz-Meco e Moscat, 2012; Piperi et al., 2012).

Além disso, a correlação entre estresse oxidativo e obesidade deve-se possivelmente à presença excessiva do tecido adiposo. As citocinas pró-inflamatórias, produzidas nos adipócitos, são potentes estimuladores da produção de ERO e ERN por macrófagos e monócitos. A infiltração de macrófagos é uma das fontes de ERO no tecido adiposo (Rudich et al., 2007). TNF- $\alpha$  inibe a atividade da PCR, aumentando a interação entre elétrons com oxigênio gerando superóxido (Fonseca-Alaniz et al., 2007). Além disso, o tecido adiposo secreta angiotensina II, que estimula a atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato oxidase (NOX). A NOX4 compreende a principal via de produção de ERO nos adipócitos (Morrow, 2003; Matsuzawa-nagata et al., 2008). Outro mecanismo proposto, pelo qual a obesidade pode aumentar o estresse oxidativo é o armazenamento de triglicerídeos. Depósitos gordurosos são vulneráveis a sofrer oxidação. Se a produção de ERO excede a capacidade antioxidante da célula adiposa, a peroxidação lipídica pode contribuir para o desenvolvimento da síndrome metabólica (Khan et al., 2006). Sendo assim, o estresse oxidativo é considerado um marcador precoce da síndrome metabólica tanto em animais quanto em humanos e pode ser considerado, portanto, um novo alvo terapêutico para essa alteração metabólica (Hopps et al., 2010).

Por outro lado, o sistema de defesa antioxidante consiste em uma série de enzimas antioxidantes, além de numerosos compostos antioxidantes endógenos e exógenos que reagem com as ERO neutralizando-as (Roberts e Sindhu, 2009). Pode-se destacar os antioxidantes enzimáticos, tais como superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx), catalase, assim como antioxidantes não enzimáticos, glutathione, vitaminas A, C e E, dentre outros (Miller et al., 2013). O  $O_2^{\bullet-}$  é o radical livre mais comum e abundante da célula, é rapidamente dismutado em peróxido de oxigênio pela enzima SOD, constituindo assim na primeira linha de defesa contra os radicais livres. O  $H_2O_2$  produzido na reação catalisada pela SOD é reduzido à água pela catalase e/ou GPx (Halliwell e Gutteridge, 1999; Camello-Almaraz et al., 2006). A enzima GPx neutraliza o  $H_2O_2$  por acoplar sua redução com a oxidação da glutathione reduzida (GSH), associada a capacidade redutora da enzima GR (Figura 4).

O estresse oxidativo desempenha um importante papel no desenvolvimento de complicações na obesidade. Em indivíduos obesos, há uma relação inversa entre gordura corporal, obesidade visceral e marcadores de defesa antioxidante (Chrysohoou et al., 2007). Assim, como mostrado por Crujeiras e colaboradores (2013), a atividade antioxidante está diminuída pela obesidade levando ao consequente aumento do estresse oxidativo. Modular o estresse oxidativo e a inflamação é um desafio e representa chances significativas de buscar novas formas de identificar, prevenir e tratar a obesidade e alterações associadas a esta condição.



**Figura 4:** Sinalização intracelular das enzimas antioxidantes. O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui SOD, GPx e CAT. A SOD constitui o maior sistema de defesa do organismo contra o ânion superóxido por catalisar a dismutação do ânion superóxido à  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  formado pela dismutação do superóxido é convertido em  $H_2O$  e  $O_2$  pela catalase ou pela GPx.

#### 1.4 OBESIDADE E FUNÇÃO COGNITIVA

Sabe-se que a obesidade aumenta o risco de um amplo espectro de alterações metabólicas (Haslam e James, 2005) bem como prejuízo na cognição, sugerindo que mecanismos comuns que contribuem para a progressão da doença podem ser perpetuados pela adiposidade visceral. A alta ingestão de gordura reduz a plasticidade sináptica no hipocampo e córtex cerebral de roedores (Molteni et al., 2002; Wu et al., 2003; Stranahan et al., 2008). Ademais, há evidências que suportam a hipótese do aumento de apoptose neuronal alterando a função cognitiva (Moraes et al., 2009; Rivera et al., 2013).

Cognição é um termo utilizado para a descrição do funcionamento mental superior do indivíduo, e engloba as habilidades de perceber, lembrar, tomar decisões, planejar, organizar e produzir respostas adequadas (Anstey e Low, 2004). Como citado, existe forte associação entre a obesidade e a redução da função cognitiva, bem como o desenvolvimento de demências, como a doença de Alzheimer. Uma revisão sistemática sobre IMC e demência, que incluiu oito estudos longitudinais, com 28.697 participantes, mostrou um risco de

demência maior em indivíduos com IMC elevado (Gorospe e Dave, 2007). Estudos mostraram que o IMC elevado está associado a déficits de aprendizado, memória e funcionamento executivo em adultos de meia-idade não dementes, independente da relação com doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Elias et al., 2005; Cournot et al., 2006; Sabia et al., 2009) e atrofia cerebral (Enzinger et al., 2005; Ward et al., 2005).

Ouyang e colaboradores (2014) sugeriram que a obesidade induzida por dieta suprime seletivamente algumas proteínas transportadoras e a atividade enzimática de proteínas do citoesqueleto que compõem a barreira hematoencefálica fornecendo uma nova visão mecanicista sobre como a obesidade afeta as funções do SNC. Buckman e colaboradores (2014) identificaram que a obesidade induzida por dieta rica em gordura em camundongos leva ao aumento do recrutamento de monócitos para o SNC. A migração de células imunitárias periféricas para o SNC, bem como permeabilidade da barreira hematoencefálica, podem ativar células gliais, tais como microglia e astrócitos, que desempenham um papel fundamental na neuroinflamação (Gao et al., 2014; Miller e Spencer, 2014; Kälin et al., 2015). Corroborando isso, animais alimentados 8 semanas de dieta rica em gordura exibiram menor desempenho em tarefas que requerem o córtex pré frontal, como reconhecimento de um novo objeto (Bocarsly et al., 2015).

Em diabéticos, o risco de doença de Alzheimer aumenta em 1,5 a 2 vezes e de demência vascular em 2 a 2,5 vezes (Elias et al., 2004), e risco de déficit cognitivo, demência e de atrofia (Cherbuin et al., 2012) sendo associado a maiores valores de glicemia mesmo em indivíduos não-diabéticos (Crane et al., 2013). Alguns mecanismos foram propostos para risco elevado de disfunção cognitiva na obesidade, como a glicotoxicidade e hiperinsulinemia. A glicação avançada de proteínas funcionais e estruturais, causa mudanças microvasculares no cérebro. Além de que, em nível central, a sinalização da insulina encontra-se prejudicada induzindo alterações no metabolismo das placas amiloide. No diabetes, ocorre aumento da produção e diminuição da degradação do peptídeo beta amiloide (A $\beta$ ), levando à deposição excessiva em algumas regiões cerebrais. A redução da degradação do A $\beta$  é decorrente da concorrência enzimática que promove a proteólise entre insulina e placas  $\beta$ - amiloide (Haque e Nazir, 2014; Kurauti et al., 2017).

Além disso, o aumento das ERO pode levar à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo, ambos associados a resistência à insulina e a doença de Alzheimer. O estresse oxidativo provocado pelo A $\beta$  é bloqueado por insulina por meio da ativação da Akt e prevenção da ativação anormal do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA). A disfunção do

NMDA por sua vez parece ter um papel no estresse oxidativo e na sinalização defeituosa da insulina na doença de Alzheimer (De Felice, 2013).

O eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA) desempenha um papel importante em muitas funções do cérebro. A desregulação do eixo HPA e a hipersecreção de glicocorticóides (GC) estão ligados à prejuízo na cognição, associada a deficiências de memória em várias condições, incluindo depressão, doença de Alzheimer e síndrome de Cushing (Raber, 1998). Sabendo que a obesidade está associada hiperatividade do HPA (Spencer e Tilbrook, 2011), levanta-se a possibilidade de que a desregulação do eixo HPA possa ser um importante contribuinte para as mudanças estruturais e cognitivas durante a obesidade. Além da hiperatividade do eixo HPA, estudos sugerem associação entre a síntese de leptina pelos adipócitos e prejuízo da função cognitiva em obesos (Durakoglugil et al., 2005).

### 1.5 EFEITOS METABÓLICOS DO *ZINGIBER OFFICINALE*

O gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*), descrito em 1807 por William Roscoe, é uma das especiarias mais utilizadas no mundo, a qual, pertence à família *Zingiberaceae* (Palatty et al., 2013). O gengibre é comercializado fresco, seco, picado, em conserva, cristalizado, em pó ou seu óleo essencial e possui sabor picante, levemente agri-doce (Panizza, 2001; Boletim, 2004; Elpo e Negrelle, 2006). Está especiária, apresenta alto teor de água (80 a 90%) e quantidade significativa de amido e fibras (5,4 a 16,2%, respectivamente) (Taveira Magalhães et al., 1997). Além disso, contém uma variedade de fitoquímicos, como os compostos fenólicos e flavonóides (Ghasemzadeh e Jaafar, 2012).

Os constituintes químicos do gengibre podem ser voláteis e não voláteis (Govindarajan, 1982). Os componentes voláteis consistem principalmente de vários terpenóides, já os compostos não-voláteis incluem os gingeróis [5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone], shogaols [1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)dec-4-en-3-one] e zingerone (Butt e Sultan, 2011). Dentre eles, o gingerol e shogaol foram identificados como os principais derivados bioativos encontrados no gengibre fresco e seco, respectivamente (Connell e Sutherland, 1969). Foi relatado que shogaols são componentes secundários do gengibre, e a proporção de 6-shogaol e 6-gingerol é aproximadamente 1:1 no gengibre seco (Govindarajan, 1982; Sang et al., 2009; Wu et al., 2010).

Durante anos, o gengibre foi utilizado na medicina chinesa e *Ayurveda* para o tratamento de diversas patologias (Ali et al., 2008) devido suas propriedades já comprovadas, destacando-se a atividade anti-inflamatória (Grzanna et al., 2005; Li et al., 2012; Mashhadi et

al., 2013), antiemética (Zick et al., 2008; Palatty et al., 2013), anticancerígena (Pereira et al., 2011), antilipidêmica (Alizadeh et al., 2008; Saravanan et al., 2014) e hipoglicêmica (Lee et al., 2015). Estudo de Kadnur e Goyal (2005) demonstrou que o extrato metanólico de gengibre seco impediu a elevação do colesterol, triglicerídeos, glicose, insulina e o ganho em peso corporal em animais submetidos a modelo de diabetes, induzida por frutose.

O extrato de gengibre contendo gingerol, composto mais ativo da planta (Elshater et al., 2009), foi capaz de reduzir a diferenciação dos adipócitos (Sekiya et al., 2004; Tzeng e Liu, 2013) e aumentar captação de glicose sensível à insulina. Além disso, uma análise da respiração celular revelou que em miotubos de músculo esquelético humano pré-tratados com extrato de gengibre a taxa de consumo de oxigênio induzida por palmitato foi maior, sugerindo que a oxidação de ácidos graxos estava aumentada (Misawa et al., 2015). Em adição a esses mecanismos, vários estudos indicam que o gengibre reduz os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias (Isa et al., 2008; Okamoto et al., 2011; Saravanan et al., 2014; Shalaby e Saifan, 2014) e assim, como demonstrado por Elshater et al. (2009), o consumo de gengibre produz efeito hipoglicêmico em animais diabéticos.

Embora os mecanismos pelos quais o gengibre regula os níveis de adipocinas não foram bem esclarecidos até o momento, há evidências de que os componentes do gengibre, shogaol e gingerol, podem aumentar a expressão gênica de algumas adipocinas, como a adiponectina (Isa et al., 2008) e inibir a expressão da resistina (Ahn e Oh, 2012). A adiponectina tem sido identificada como um sensibilizador à insulina, e encontra-se diminuída na obesidade (Kubota et al., 2002; Horakova et al., 2010; Mitterberger et al., 2010). Foi relatado também, no estudo conduzido por Isa et al. (2008), que o 6-shogaol, mas não 6-gingerol, possui atividade agonista de receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ). Sabe-se que a concentração de adiponectina está reduzida nos estados obesos e resistentes à insulina; assim, acredita-se que a regulação positiva de adiponectina, seria capaz de melhorar a sensibilidade à insulina, acompanhada por aumento nos níveis de oxidação de ácidos graxos e uma diminuição dos triglicerídeos séricos. Sugere-se que os efeitos mediados por 6-shogaol e 6-gingerol deve-se, pelo menos em parte, a regulação positiva de adiponectina (Ebrahimzadeh et al., 2016; de Las Heras et al., 2017).

Vários estudos demonstram que o gengibre pode influenciar na redução do peso corporal por meio de dois principais mecanismos: (i) o aumento da termogênese e maior liberação de catecolaminas (Pulbutr et al., 2011; Mansour et al., 2012) e (ii) aumento da lipólise no tecido adiposo branco (Pulbutr et al., 2011; Ahn e Oh, 2012).

O aumento na secreção de catecolaminas resulta em aumento no metabolismo energético de ratos e seres humanos (Kawada et al., 1986), embora sugira-se que o gengibre possa aumentar a temperatura corporal, e assim, maior gasto energético, o potencial de gingeróis e shogaols para aumentar secreção de catecolaminas não foi totalmente elucidado.

Foi observado que a administração oral de extrato de gengibre reduziu significativamente o peso corporal em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura (Misawa et al., 2015). Corroborando a isso, estudos pré-clínicos mostraram efeitos benéficos do gengibre sobre a oxidação de ácidos graxos e redução do colesterol (Beattie et al., 2011), normalização dos níveis glicêmicos (Kadnur e Goyal, 2005; Elshater et al., 2009; Na et al., 2016), maior ação do sistema antioxidante (Elshater et al., 2009; Butt e Sultan, 2011), prevenção da obesidade (Misawa et al., 2015) e síndrome metabólica (Nammi et al., 2009; Okamoto et al., 2011) induzida por dietas.

No entanto, grande parte dos estudos que suplementaram o extrato de gengibre e os compostos isolados da planta mostraram apenas efeitos fisiológicos sobre o metabolismo, sendo raros os relatos sobre os efeitos da suplementação com extrato de gengibre sobre os níveis inflamatórios, oxidativos e genotóxicos em animais obesos. *In vitro*, um dos principais derivados bioativos presente no gengibre, o 6-shogaol inibiu a produção de ERO, aumentou os níveis de glutathione total, heme oxigenase-1 e da quinona oxidoreductase 1 (NQO1) por meio da ativação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) (Park et al., 2016). Além da possível ação antioxidante do 6-shogaol, outro estudo apontou que o 6-gingerol protege as células  $\beta$  pancreáticas do estresse oxidativo, reduzindo a produção de ERO (Son et al., 2015) possivelmente como demonstrado em estudo posterior, elevando a atividade das enzimas antioxidantes SOD3 e catalase (Lee et al., 2018).

## 1.6 JUSTIFICATIVA

Atualmente, existem diversos tratamentos para a perda de peso, dentre os quais se destaca uma variedade de dietas, psicoterapias, medicamentos e programas de atividades físicas, bem como diferentes métodos cirúrgicos. No campo das cirurgias bariátricas, uma classificação quanto ao tipo de cirurgia, caracteriza-se como disabsortiva, a qual consiste em uma diminuição no tamanho do intestino delgado para aproximadamente 50 cm, que infelizmente, apresenta alguns desfechos desfavoráveis como diarreia, perda excessiva de

peso (60 a 70% do peso) e desnutrição grave (Zeve e Tomaz, 2011). Ainda no campo da cirurgia bariátrica, outra classificação descrita, constitui o método restritivo o qual consiste em uma redução da cavidade gástrica. Porém, o sucesso com relação à perda de peso e controle de doenças associadas não é tão efetivo quando comparado à outras técnicas, devido a recuperação de peso (Zilberstein et al. 2011). Assim, a epidemia da obesidade, juntamente com os seus elevados custos para a saúde, demonstram que novas abordagens terapêuticas são urgentemente necessárias. Modular o estresse oxidativo e a inflamação é um desafio e representa chances significativas de buscar novas formas de identificar, prevenir e tratar a obesidade e alterações associadas a esta condição. Fitoterápicos identificados de plantas medicinais tradicionais parecem representar uma oportunidade para o desenvolvimento de novas classes terapêuticas. No entanto, pouco se sabe sobre a função do *Zingiber Officinale* em indivíduos obesos. A partir dessas considerações, percebeu-se que seria de extrema relevância estudar o papel do extrato de *Zingiber Officinale* em concentração moderada em animais obesos, com o intuito de prevenir as alterações moleculares, bioquímicas, genotóxicas e comportamentais decorrentes deste processo. Neste contexto, torna-se necessário o entendimento dos mecanismos relacionados aos efeitos da suplementação do *Zingiber Officinale* na obesidade, sugerindo que a suplementação apresente propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes significativas, de modo que, espera-se que as propriedades do *Zingiber officinale* resultem em inúmeros efeitos benéficos para a saúde. Assim, a hipótese deste trabalho é que o extrato de *Zingiber officinale* possa apresentar efeito positivo sobre parâmetros metabólicos sistêmicos e centrais, estresse oxidativo, genotóxico e em prejuízos cognitivos em animais obesos.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com extrato de gengibre sobre parâmetros metabólicos, comportamentais e genotóxicos em camundongos *Swiss* obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a suplementação com extrato de *Zingiber officinale* em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica sobre:

- Ingestão alimentar, peso corporal, tolerância à insulina e índice adiposidade;
- A concentração de citocinas no tecido adiposo, fígado, quadríceps e córtex cerebral;
- A morfologia do tecido hepático;
- Os níveis de triglicerídeos e colesterol séricos;
- Status anti e pró oxidante no quadríceps, tecido adiposo, fígado e córtex cerebral;
- Os danos no DNA no fígado e sangue;
- Funções cognitivas e ansiedade;
- A concentração no córtex cerebral de neurotrofinas

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

A metodologia do presente estudo seguiu os princípios éticos para o uso de animais de laboratório determinados pelo Colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA) e Sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório (SBCAL). Este projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo número 059/2017-1 (Anexo A) e respeitou estritamente os princípios éticos na experimentação animal. Todos os procedimentos foram realizados conforme RDC nº 306/2004 da Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA).

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS E EXPOSIÇÃO À DIETAS

Foram utilizados 40 camundongos *Swiss* machos, recebidos com quatro semanas de vida provenientes do Centro de Bioterismo da UNESC, mantidos em ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, ambiente com 70% de umidade e com temperatura entre 20 e 22°C, alojados em gaiolas de poliuretano com cobertura metálica (dez animais por caixa), alimentados com ração padrão para roedores e água *ad libitum* durante o período de adaptação.

Após período de adaptação, foram aleatoriamente divididos em dois grupos (n=20): camundongos alimentados por 16 semanas com dieta padrão para roedores (22,0% de proteína, 53,0% de carboidrato, 4% de lipídeos o que corresponde a aproximadamente 2,9 kcal/g (Puro Lab 22PB, Porto Alegre, RS), denominado grupo controle. Para instalação da obesidade segundo De Souza e colaboradores (2005), os camundongos foram alimentados por 16 semanas com dieta hiperlipídica: (carboidrato 26,0%; proteína 14,9%; gordura 59%, totalizando 5,35 kcal/g) (tabela 1) (PragSoluções Serviços e Comércio Ltda, Jaú, SP) denominada DIO.

**Tabela 1:** Composição da dieta hiperlipídica da empresa PragSoluções

	g/1000g	Kcal/1000g
Amido de milho	147,5	590
Caseína	200	800
Amido Dextrinizado	100	400
Sacarose	100	400
Óleo de soja	40	360
Celulose Microcristalizada	50	-
Mix Mineral AIN93G	35	-
Mix Vitaminas AIN93	10	-
L-cistina	3	-
Bitartarato de Colina	2,5	-
Banha de Porco	312	2808

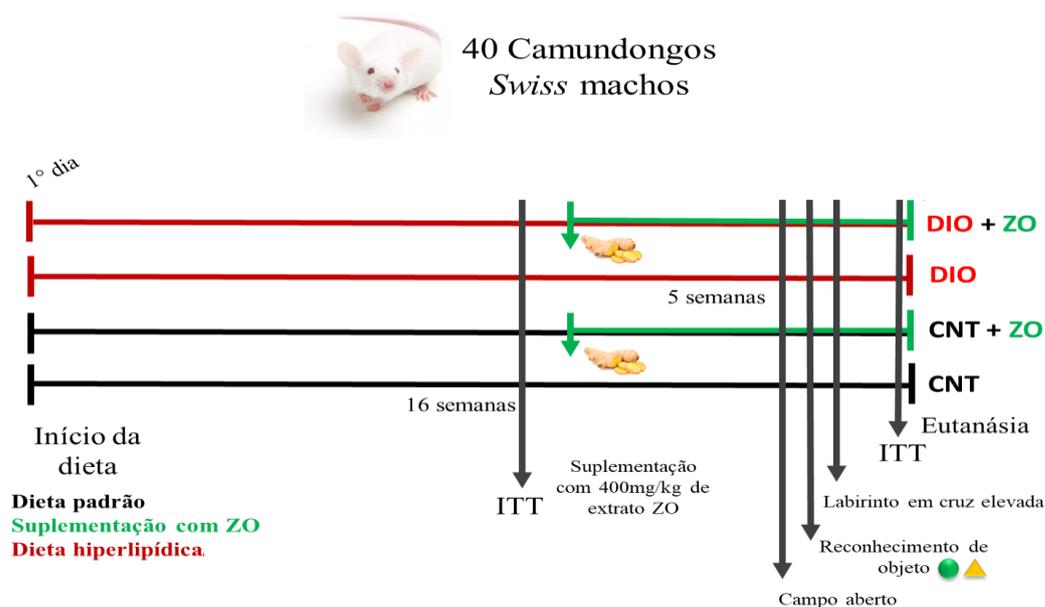
Após instalação do quadro de obesidade e resistência à ação da insulina (comprovada pelo teste de tolerância à insulina, ITT), os animais foram distribuídos randomicamente em quatro (4) grupos experimentais (n=10) (Figura 5):

Grupo 1 – Dieta padrão, não suplementado (Controle + veículo);

Grupo 2 – Dieta padrão, suplementado com extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) (Controle + ZO);

Grupo 3 – Obeso induzido por dieta, não suplementado (DIO + veículo);

Grupo 4 – Obeso induzido por dieta, suplementado com extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) (DIO + ZO).

**Figura 5:** Desenho experimental.

### **3.2.1 Suplementação com extrato de gengibre**

O extrato seco de *Zingiber officinale*, apresentando 5.2% de gingeróis (Essential Nutrition, Brasil) (Anexo B) foi dissolvido diariamente em água potável e suplementado na dose de 400 mg/kg/dia por meio de gavagem oral por 35 dias consecutivos (Nammi et al., 2009). Além disso, os animais do grupo 1-dieta padrão, não suplementado (Controle + veículo) e grupo 3- obeso induzido por dieta, não suplementado (DIO + veículo) foram tratados diariamente com água potável por meio de gavagem oral por 35 dias. A dimensão da cânula foi suficiente para alcançar a orofaringe. Durante o período de suplementação, ambos os grupos continuaram a receber suas respectivas dietas.

### **3.2.2 Controle da ingestão alimentar**

Durante todo período experimental, foram avaliadas as variáveis consumo de ração e peso corporal. O alimento ingerido foi calculado semanalmente a partir da subtração da quantidade ofertada pela quantidade restante de ração no comedouro. O volume de ingestão diária foi calculado, tomando o consumo de ração semanal dividindo por sete dias.

## **3.3 TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA (ITT)**

O teste foi realizado no início e no final do período experimental e utilizado para o cálculo da área sobre a curva. O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue foi equivalente ao tempo zero do teste. Após isso, a insulina (1U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente (i.p.) e amostras do sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, para a determinação da glicose sérica através de glicosímetro.

## **3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS**

### **3.4.1 Teste comportamental de atividade exploratória: habituação ao campo aberto**

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora dos animais (Kaster et al., 2005; Salehi-Sadaghiani et al., 2012). O aparelho consistia em uma caixa de madeira medindo 40 × 60 × 50 centímetros. O piso da arena foi dividido em 12 quadrados iguais. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o número total

de cruzamentos e levantamentos foi registrado por 5 minutos. Um cruzamento foi registrado quando o animal atravessou o quadrado com as quatro patas e o levantamento caracterizado pelo levantamento do animal apoiado as patas traseiras. Após cada teste, o aparelho foi higienizado com uma solução de etanol a 10%. A luz no interior do aparelho foi mantida no mínimo para evitar comportamentos relacionados à ansiedade.

### **3.4.2 Teste de reconhecimento de objeto**

O teste de reconhecimento do objeto foi utilizado para avaliar a memória dos animais (Ainge et al., 2006). Primeiramente, no dia anterior ao teste os animais foram individualmente habituados ao campo aberto durante 5 minutos. Na sessão treino, dois objetos idênticos eram apresentados aos camundongos. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa, durante 5 minutos. Os animais retornaram às suas gaiolas imediatamente depois do treino. Uma hora após o treino, os animais foram reintroduzidos no campo aberto que continha um objeto novo e um objeto previamente explorado. Neste período registrava-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos durante 5 minutos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Um índice de reconhecimento - onde o tempo total de discriminação dos objetos foi considerado 100% e normalizado pelo tempo gasto em cada objeto (Greco et al., 2010; Lopes et al., 2015).

### **3.4.3 Teste do labirinto em cruz elevado**

Neste teste, o aparato, feito de madeira e fórmica, consiste de dois braços abertos (18 x 6 cm), opostos a dois braços fechados (18 x 6 cm), elevados 60 cm do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 6 x 6 cm. Os experimentos foram conduzidos em ambiente com baixa luminosidade (12 lux) Cada camundongo foi colocado na plataforma central de frente para um braço fechado. Os animais foram observados durante um período de 5 minutos. Foram analisados os seguintes parâmetros: o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estivessem no interior do braço). Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA: entradas nos braços abertos/(entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados) x 100] e porcentagem de permanência nos

braços abertos [%TBA: tempo nos braços abertos/(tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados) x100].

### 3.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COMPOSIÇÃO CORPORAL

O peso dos animais foi verificado com a utilização de uma balança de precisão da marca Marte, modelo AS 2000C no 259711. Decorrido o período de indução da obesidade e suplementação com extrato de gengibre, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação com guilhotina e, então, foram extraídos o tecido adiposo epididimal, mesentérico, retroperitoneal e peri-renal para o cálculo do índice de adiposidade (grama de gordura /grama peso corporal x 100). Além disso, foi realizada a dissecação de outros tecidos como o córtex cerebral, fígado, tecido adiposo epididimal e quadríceps. As amostras foram processadas, aliqüotadas e armazenadas no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análises bioquímicas e moleculares.

#### 3.5.1 Avaliação histológica

Fragmentos de tecido hepático foram coletados e colocados em frasco contendo paraformaldeído tamponado à 4% por 48 horas. As amostras foram então processadas com álcool em diferentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), xilol. Posteriormente, o tecido foi incluído em blocos de parafina, seccionado em cortes de 5  $\mu\text{m}$  para posteriores análises histológicas. As lâminas foram coradas com coloração de hematoxilina e eosina (HE) a fim de avaliar a histoarquitetura do tecido. A aquisição das imagens foi realizada por meio de microscópio óptico (Nikon Eclipse Ti-U).

### 3.6 LÍPIDEOS SÉRICOS

Os níveis de colesterol (Analisa, Palmitos-SC) e triglicerídeos (Vida Biotecnologia, Belo Horizonte-MG) foram determinados no soro por ensaio colorimérico enzimático Trinder de acordo com especificações do fabricante.

### 3.7 DOSAGENS DE CITOCINAS

As dosagens das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4 e TNF- $\alpha$  foram realizadas no quadríceps, tecido adiposo e fígado por meio do método de ELISA, segundo as especificações do fabricante (ThermoFisher Scientific).

Uma placa de 96 poços, foi primeiramente recoberta com 100  $\mu$ L de solução contendo anticorpo de captura anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  ou anti-IL-4, diluídos em tampão *Coating Buffer* (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e água deionizada). As placas foram incubadas *overnight*, na geladeira. Após sucessivas lavagens com 300  $\mu$ L de *Wash buffer* (PBS e Tween 20 (0,05%)), foi adicionado 200  $\mu$ L de *Assay diluent* (PBS contendo 1% de albumina) para o bloqueio, e a placa foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com 100  $\mu$ L de amostras (quadríceps, tecido adiposo, fígado e córtex cerebral) e suas respectivas curvas padrões.

Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos de detecção anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  ou anti-IL-4 durante 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com avidina diluída 1:1000 em *Assay diluent*, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com *TMB substrate solution* (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). A reação foi interrompida por adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura da absorbância foi realizada em 450 nm.

### 3.8 DOSAGENS DE FATORES NEUROTRÓFICOS

As dosagens dos fatores neurotróficos foram realizadas no córtex por meio do método de ELISA, segundo as especificações do fabricante (R&D systems).

Uma placa de 96 poços, foi primeiramente recoberta com 100  $\mu$ L de solução contendo anticorpo de captura anti-BDNF e anti- $\beta$ -NGF em tampão *Coating Buffer* (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio e água deionizada). As placas foram incubadas *overnight*, na geladeira. Após sucessivas lavagens com 300  $\mu$ L de *Wash buffer* (PBS e Tween 20 (0,05%)), foi adicionado 200  $\mu$ L de *Assay diluent* (PBS contendo 1% de albumina) para o bloqueio, e a placa foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com 100  $\mu$ L de amostras (córtex) e suas respectivas curvas padrões.

Decorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas com os anticorpos de detecção anti-BDNF e anti- $\beta$ -NGF durante 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com avidina diluída 1:1000

em *Assay diluent*, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e reveladas com *TMB substrate solution* (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). A reação foi interrompida por adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura da absorbância foi realizada em 450 nm.

### 3.9 PRODUÇÃO DE OXIDANTES

#### 3.9.1 Espécies reativas por diacetato de difluoresceína (DCFH)

Os níveis de espécies reativas foram mensurados com base na oxidação da sonda 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (DCF) acetato em um composto fluorescente 2',7'- diclorodihidrofluoresceína, como previamente descrito (Hempel et al., 1999). A amostra foi incubada com DCF-DA 80 mM a 37°C durante 15 minutos. A DCF-DA é desesterificada no interior das células por esterases endógenas para o ácido livre ionizado, DCFH. DCFH é oxidado em DCF pelas espécies reativas. A formação deste derivado oxidado fluorescente foi monitorada com os comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente. A produção de espécies reativas foi quantificada utilizando uma curva padrão de DCF e os dados foram expressos como mol DCF/mg de proteína.

#### 3.9.2 Indicador de formação de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro - Shimadzu) por meio do metabólito estável nitrito (NO<sub>2</sub>). Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 0,1 mol/L de HCl e 0,1% de N-(1-naftil) etilenodiamina, dicloridrato) em temperatura ambiente por 10 min, seguido de leitura em 540 nm no espectrofotômetro. O conteúdo de nitrito foi calculado a partir da curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) - 0 a 200 nM. Os resultados foram expressos em μmol nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

### 3.10 DEFESAS ANTIOXIDANTES

#### 3.10.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi estimada por meio da inibição da auto-oxidação da adrenalina e lida em um comprimento de onda de 480 nm (McCord e Fridovicj, 1969).

### 3.10.2 GSH/GSSG

Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado após precipitação de proteína com 1 mL de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e DTNB 500  $\mu$ M. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras. A GSSG foi mensurada a partir da reciclagem da GSSG redutase com monitoramento NADPH espectrofotometricamente na presença de 2-vinilpiridina. A concentração de GSH total e GSSG foram determinadas usando uma curva de regressão gerada a partir de vários padrões de GSH (Rahman et al., 2006).

### 3.10.3 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio, analisada em espectrofotômetro a 240 nm, conforme descrito anteriormente por Aebi (1984). Os resultados foram expressos em U/mg proteína.

## 3.11 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

### 3.11.1 Carbonil

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupos carbonils baseado na reação com dinitrofenilhidrazina, conforme previamente descrito por Levine et al. (1990). O conteúdo de carbonil foi determinado espectrofotometricamente a 370 nm utilizando o coeficiente 22.000 M.

### 3.11.2 Formação de malondialdeído (MDA)

Como índice de lipoperoxidação foi quantificada a formação de MDA, mensurado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (Proeminence Shimadzu, JP), em uma coluna Ascentis® C18 (250 x 2.1 mm, 5  $\mu$ m, Supelco Sigma-Aldrich), segundo (Grotto et al., 2007).

### 3.12 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor de proteína foi determinado usando albumina bovina do soro como padrão (Lowry et al., 1951). O conteúdo total de proteína foi mensurado utilizando o reagente folin-fenol (reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico) adicionado para ligar a proteína. O reagente ligado foi lentamente reduzido e alterado de amarelo para azul. A absorvância de 750 nm foi utilizada.

### 3.13 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Para realização dos testes de genotoxicidade, foram utilizadas as seguintes amostras biológicas: sangue e fígado dos camundongos, para ambas as versões do ensaio cometa.

#### 3.13.1 Ensaio cometa alcalino

O ensaio cometa (EC) foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000).

O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de fígado, foram dissecadas e imersas em tampão Merchant's refrigerado. Em seguida foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, a fim de obter uma suspensão celular.

As células do sangue (alíquotas de 5  $\mu$ L) e as células obtidas da dissociação de tecidos (alíquotas de 25  $\mu$ L) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0.75%, w/v, 95  $\mu$ L ou 75  $\mu$ L, respectivamente). A mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta posteriormente com uma lamínula e levada, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação.

Em seguida, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

As lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas

estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado Syber Gold (Sigma Brasil, 1239-45-8) para posterior análise.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda considerada 0, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al., 1997). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero ( $100 \times 0 = 0$ ; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ( $100 \times 4 = 400$ ; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda.

As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de 100 cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento. Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.

### 3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para todas as análises os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, com exceção das análises do ensaio cometa, no qual os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e igualdade de variância (teste de Levene) e analisadas estatisticamente pelo teste de ANOVA de uma via. Devido à distribuição não-normal do % tempo de entradas nos braços abertos, no teste labirinto em cruz, essa variável foi expressa como mediana e intervalo interquartil. Quando ANOVA apresentou diferença significativa análises post hoc foram realizadas utilizando o teste de Tukey. Para avaliar o efeito da dieta ou do *Zingiber officinale* isoladamente, foi utilizado teste *t de student* dentro de um mesmo grupo de dieta. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de p forem menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 6.0.

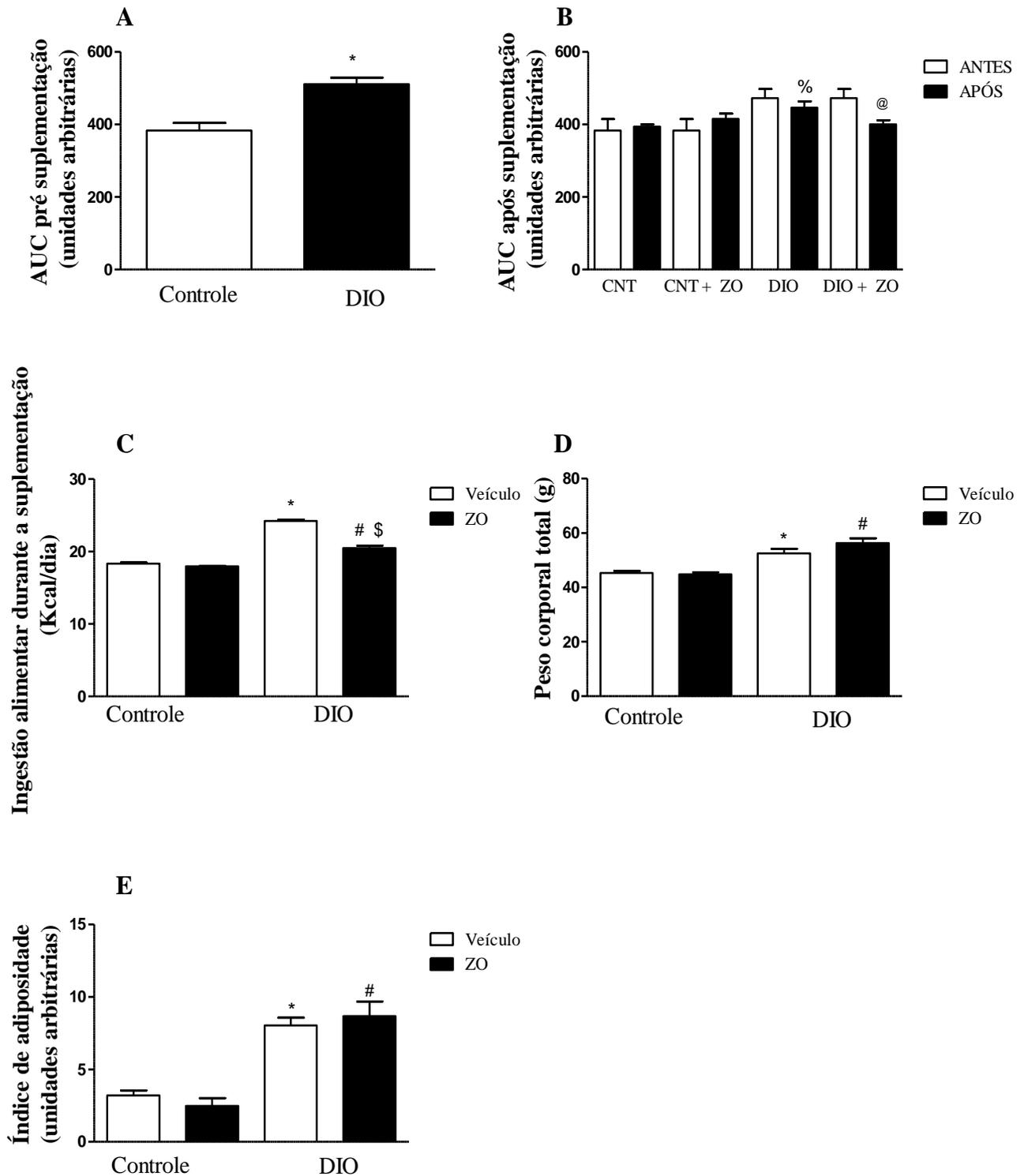
## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA, CONSUMO ENERGÉTICO E COMPOSIÇÃO CORPORAL

A eficácia do modelo experimental foi verificada antes do início da suplementação com *Zingiber officinale* uma vez que os animais DIO apresentaram maior AUC de glicose em relação aos animais controle, comprovando a resistência a insulina induzida pela dieta hiperlipídica (Figura 6A). Após a suplementação com 400mg/dia do extrato de *Zingiber officinale* a área sobre a curva de glicose diminuiu significativamente nos animais DIO + ZO em relação aos animais obesos não suplementados (Figura 6B).

Durante todo o experimento foram mensuradas a quantidade de ração controle e hiperlipídica (DIO) ingerida pelos animais. A Figura 6C, mostra a ingestão diária em calorias por grama durante os 35 dias de tratamento com *Zingiber officinale*. Os grupos DIO + veículo e DIO + ZO, apresentaram maior ingestão energética em relação aos animais Controle + veículo e Controle + ZO. No entanto, o grupo DIO + ZO apresentou menor ingestão calórica durante a suplementação em relação ao grupo DIO + veículo (Figura 7C).

Em relação ao peso corporal total e o índice de adiposidade no final do experimento, os grupos DIO + veículo e DIO + ZO apresentaram aumento significativo do peso corporal total e do índice de adiposidade em relação aos animais Controle + veículo e Controle + ZO (Figura 6D e 6E, respectivamente).



**Figura 6:** Efeitos sobre a ingestão alimentar, composição corporal e sensibilidade a insulina em camundongos obesos tratados com *Zingiber officinale*. A) AUC Pré suplementação B) AUC após suplementação C) Ingestão alimentar diária D) Peso corporal total E) Índice de adiposidade. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=5-10 animais por grupo). \*p<0,05 vs Controle + veículo; #p<0,05 vs Controle + ZO; \$p<0,05 vs DIO + Veículo; % p<0,05 vs Controle + veículo após @ p<0,05 vs DIO + ZO antes da suplementação.

## 4.2 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE LIPÍDEOS SÉRICOS

Ao analisar os níveis séricos de triglicerídeos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Controle + veículo e Controle + ZO. De maneira importante, a suplementação com *Zingiber officinale* reduziu os valores de triglicerídeos do grupo DIO + ZO em relação aos grupos Controle + ZO e DIO + veículo (Tabela 2). Quando avaliados os níveis séricos de colesterol total, observou-se um aumento significativo do colesterol total no grupo DIO + veículo quando comparado aos animais Controle + veículo. No entanto, neste caso não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos DIO + veículo e DIO + ZO (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeitos sobre os lipídeos séricos de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*.

Variáveis	Controle	Controle	DIO	DIO
	+ Veículo	+ ZO	+ Veículo	+ ZO
	<b>Média + EPM</b>			
<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	<b>167,8 ± 33,30</b>	<b>184 ± 10,52</b>	<b>220,42 ± 8,80</b>	<b>138,18 ± 9,28<sup>#s</sup></b>
<b>Colesterol Total (mg/dl)</b>	<b>156 ± 3,92</b>	<b>164,5 ± 6,75</b>	<b>191 ± 4,20*</b>	<b>181,75 ± 11,53</b>

ZO: *Zingiber officinale*

EPM: Erro Padrão da Média

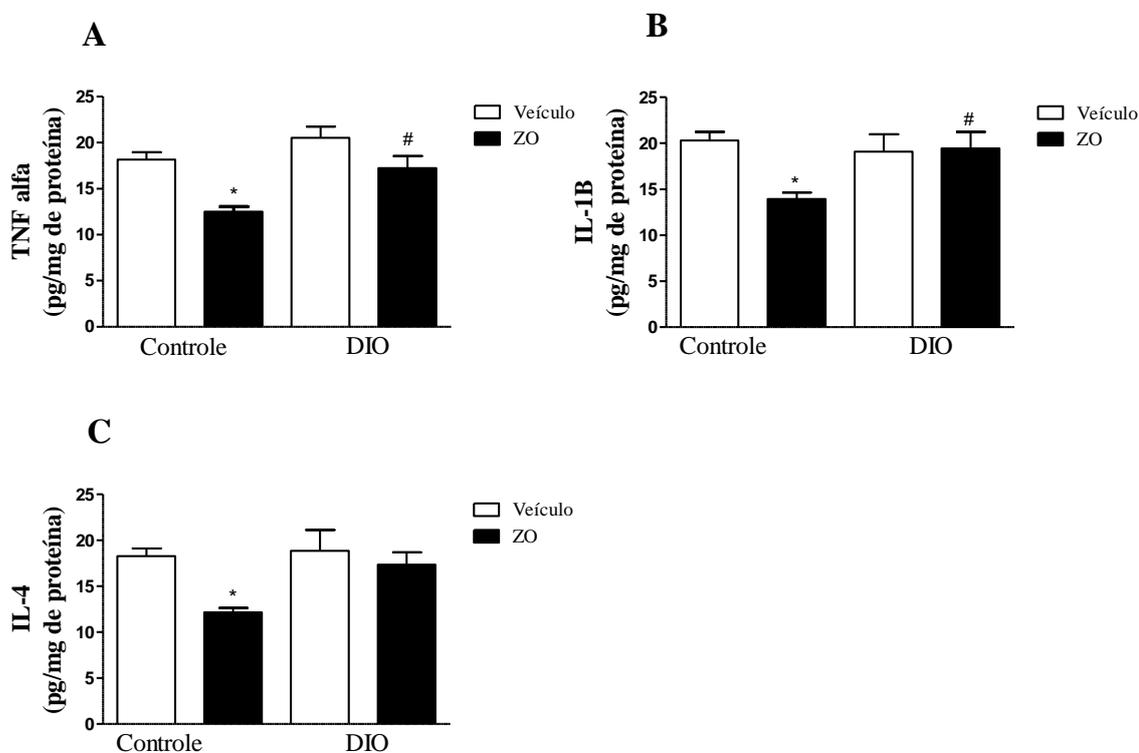
Médias obtidas das amostras de soro de 6 animais por grupo. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. \*p<0,05 vs CONTROLE + veículo; #p<0,05 vs CONTROLE + ZO; \$p<0,05 vs DIO + Veículo.

## 4.3 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL

Sabendo que a obesidade induzida por dieta pode levar a alterações no perfil inflamatório (Jung e Choi, 2014), a concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e da citocina anti-inflamatória IL-4 foram avaliados no tecido adiposo epididimal. Observou-se diminuição nas concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no grupo Controle + ZO em relação ao grupo Controle + veículo (Figura 7A e 7B, respectivamente). Além disso, observou-se aumento do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no grupo DIO + ZO em relação ao grupo CNT + ZO.

No entanto, nos animais DIO + ZO, a suplementação não foi eficaz em diminuir os níveis dessas citocinas pró-inflamatórias em relação ao grupo DIO + veículo.

Nos níveis de IL-4 a suplementação levou a sua diminuição nos animais Controle + ZO em relação ao grupo Controle + veículo. Não foram encontradas diferenças entre os animais DIO suplementados ou não (Figura 7C).



**Figura 7:** Efeitos sobre a concentração de citocinas no tecido adiposo epididimal de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) TNF- $\alpha$  B) IL-1 $\beta$  C) IL-4. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=4-6 animais por grupo). \*p<0,05 vs Controle + veículo; #p<0,05 vs Controle + ZO.

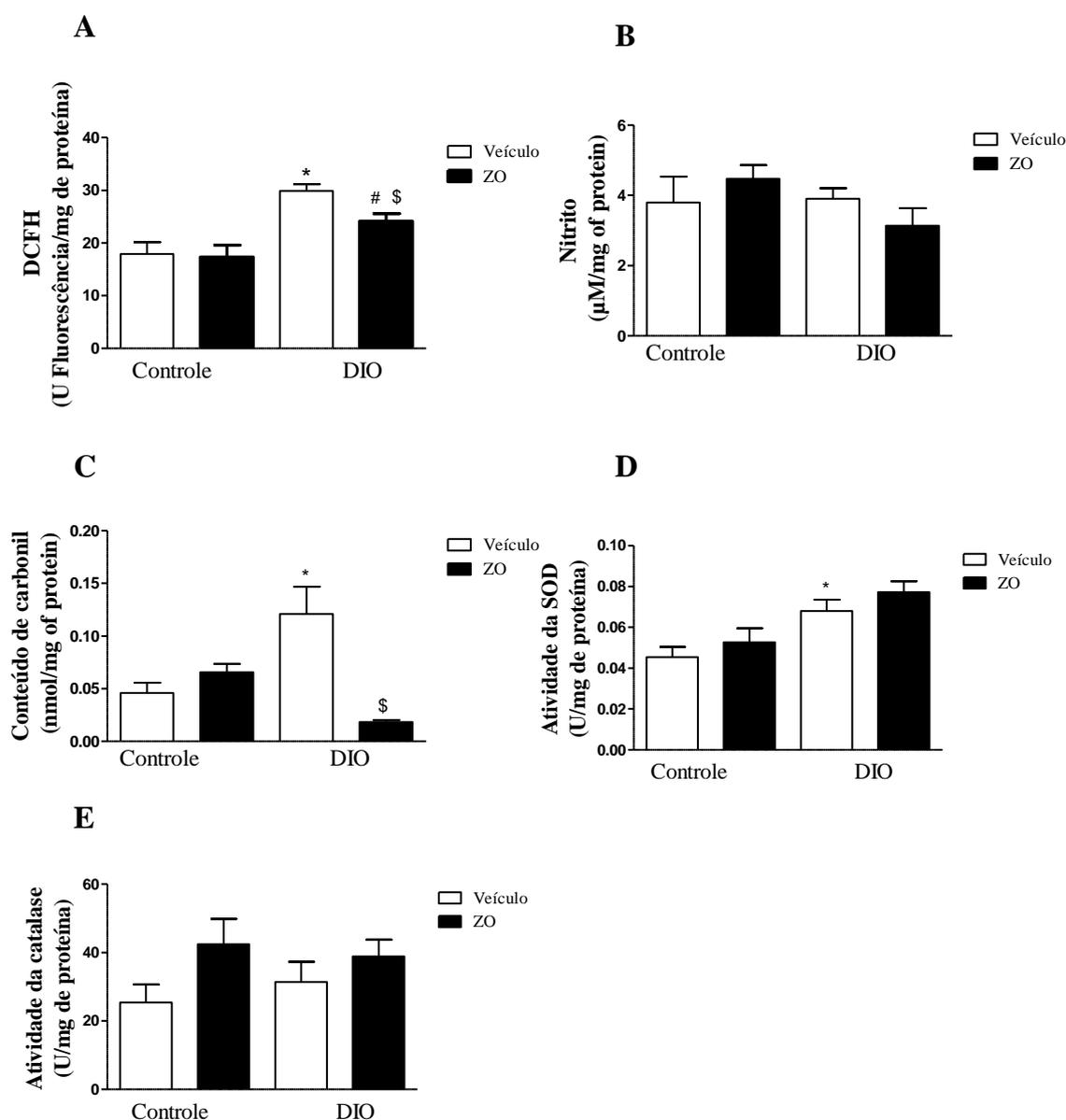
#### 4.4 PRODUÇÃO DE OXIDANTES, SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO NO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL

A fim de avaliar as alterações sobre o estado redox induzidas pela dieta hiperlipídica e pela suplementação com *Zingiber officinale* foi analisada a oxidação do DCFH e os níveis de nitrito como parâmetros oxidativos (Figura 8A e 8B, respectivamente). A oxidação do DCFH foi aumentada no grupo DIO + veículo quando comparado ao grupo Controle + veículo. Todavia, apesar de o grupo DIO + ZO apresentar maior oxidação da DCFH em relação ao

grupo Controle + ZO, pode-se observar significativa redução da DCFH no grupo DIO + ZO quando comparado ao DIO + veículo. Ao avaliar a concentração de nitrito, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figura 8B).

Os resultados para carbonilação de proteínas, um marcador de oxidação de proteínas demonstraram aumento no conteúdo de carbonil no tecido adiposo epididimal dos animais DIO + veículo quando comparados aos animais Controle + veículo. De modo notório, o conteúdo de carbonil foi reduzido nos animais DIO + ZO quando comparados aos animais DIO + veículo (Figura 8C).

Para analisar o sistema de defesa antioxidante, a atividade das enzimas SOD e Catalase foram avaliadas. A atividade da SOD foi maior no grupo DIO + veículo em relação ao grupo Controle + veículo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os demais grupos, assim o tratamento não foi capaz de alterar a atividade da SOD (Figura 8D). Quanto à atividade da catalase, não houve diferenças entre os grupos (Figura 8E).



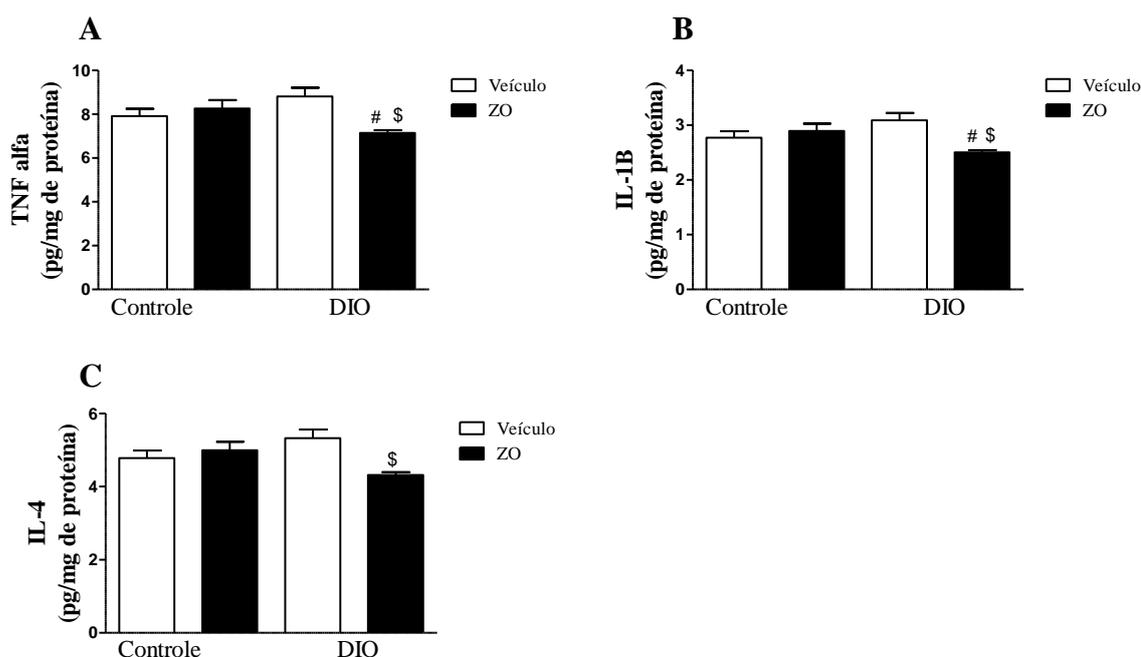
**Figura 8:** Efeitos sobre a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo no tecido adiposo epididimal de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) DCFH B) Nitrito C) Carbonil D) SOD E) Catalase. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6-9 animais por grupo). \*  $p < 0,05$  vs Controle + veículo; #  $p < 0,05$  vs Controle + ZO; \$  $p < 0,05$  vs DIO + veículo.

#### 4.5 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NO TECIDO HEPÁTICO

Para melhor caracterizar o perfil inflamatório no fígado dos animais suplementados com *Zingiber officinale*, foram analisadas os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-4. No tecido

hepático, a suplementação com *Zingiber Officinale* reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos animais DIO + ZO em relação aos DIO + veículo e ao Controle + ZO. Não foram encontradas diferenças entre os demais grupos (Figura 9A e 9B, respectivamente).

Para analisar o efeito anti-inflamatória do *Zingiber Officinale*, a concentração de IL-4 foi avaliada no tecido hepático de camundongos Controles e DIO, suplementados ou não (Figura 9C). Após 35 dias de suplementação, os animais DIO + ZO apresentaram menores níveis de IL-4 quando comparados ao grupo DIO + veículo.

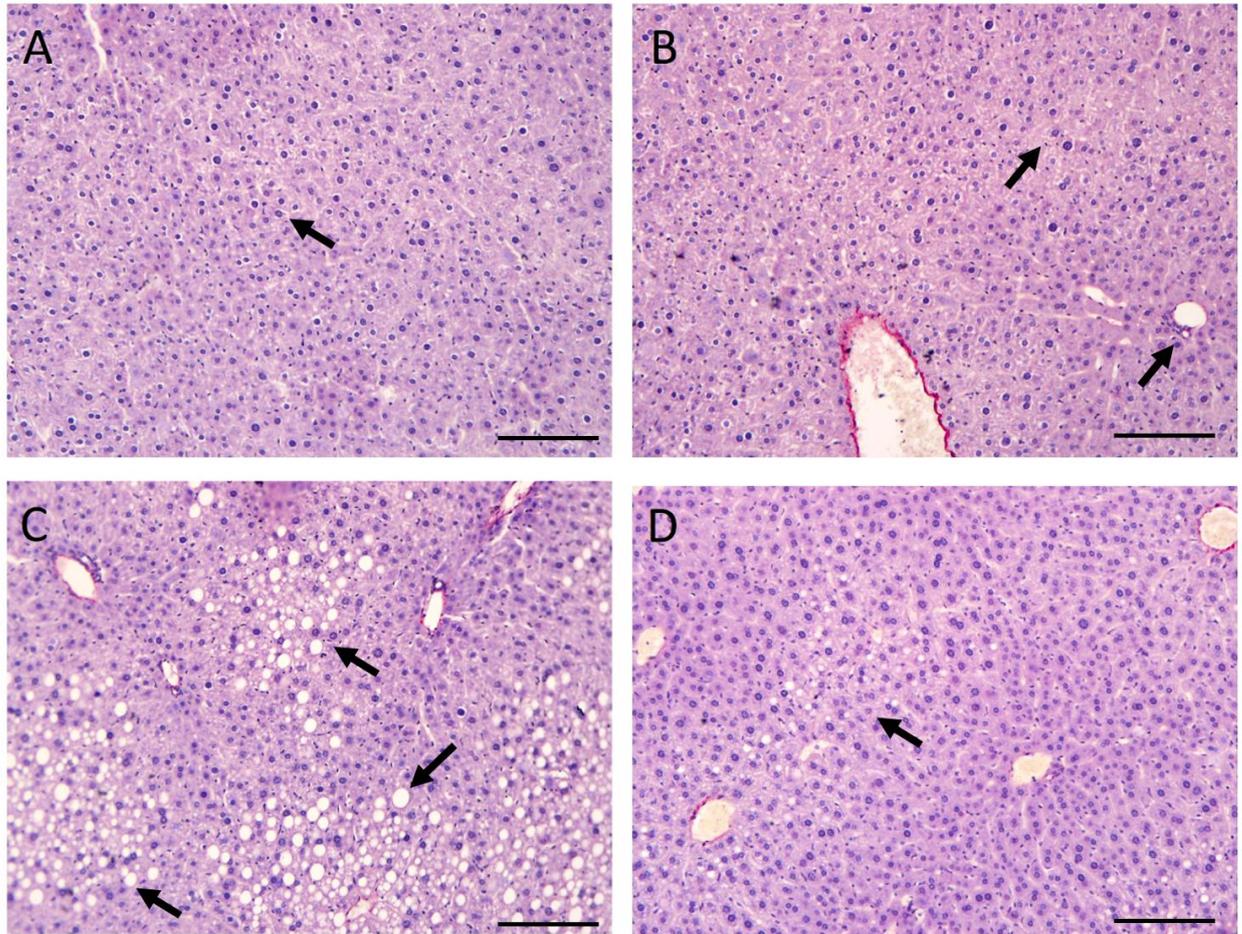


**Figura 9:** Efeitos sobre a concentração de citocinas no fígado de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) TNF- $\alpha$  B) IL-1 $\beta$  C) IL-4. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=4-6 animais por grupo). #p<0,05 vs Controle + ZO; \$p<0,05 vs DIO + veículo.

#### 4.6 MORFOLOGIA DO TECIDO HEPÁTICO

Ao observar a histologia do tecido hepático dos camundongos corados em hematoxilina e eosina, demonstrada na Figura 10A (Controle + veículo) e 11B (Controle + ZO) observa-se uma arquitetura normal. Os hepatócitos estão em formato poliédricos com núcleo fortemente corado, orientados radialmente e separados por tecido conjuntivo. Em contraste, quando os animais se tornam obesos (Figura 10C), há aparecimento de infiltrados de células com morfologia de adipócitos, i.e., aumento de gordura no fígado, que pode ser

indicativo de esteatose hepática. De particular importância, quando esses animais foram submetidos a suplementação com extrato de *Zingiber officinale* o aparecimento de adipócitos diminuiu. (Figura 10D).

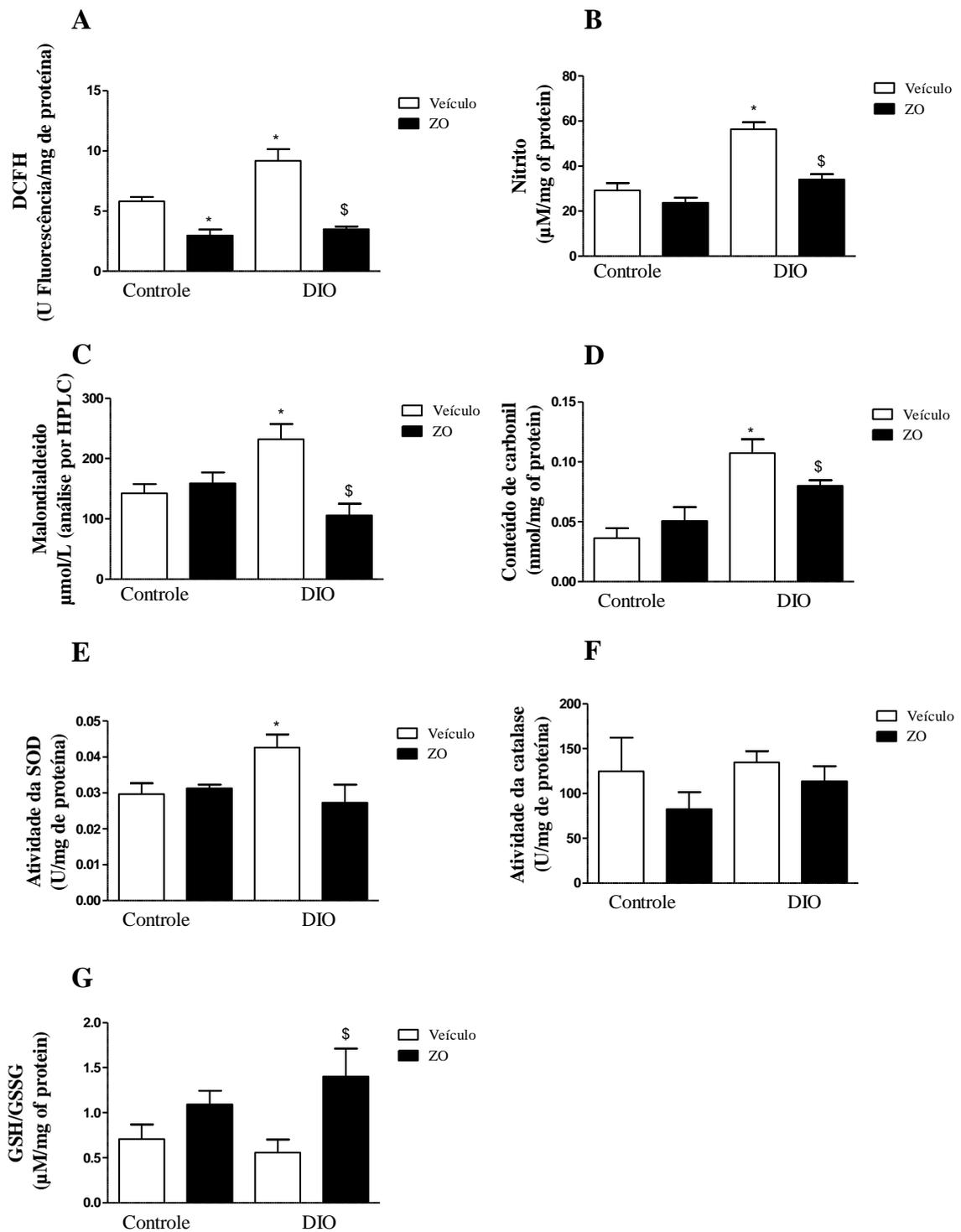


**Figura 10:** Fotomicrografias histológicas de tecido hepático coradas em hematoxilina e eosina de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) Grupo Controle + veículo: Imagens histológicas compatíveis com tecido hepático normal. Presença de hepatócitos em formato poliédricos com núcleo fortemente corado, orientados radialmente e separados por tecido conjuntivo (seta preta). B) Grupo Controle + ZO: Áreas compatíveis de tecido hepático normal, mantendo a histoarquitetura e células hepáticas de morfologia normal, incluindo áreas separadas por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (seta preta). C) DIO: Imagens apresentando grande presença de infiltrados de células com morfologia de adipócitos, entrelaçados ao tecido hepático (seta preta), sugerindo acúmulo de células de gordura no fígado, compatíveis com quadro de esteatose hepática de forma generalizada. D) DIO+ ZO: Imagens apresentando diminuição de adipócitos infiltrados no tecido hepático (seta preta), e áreas com células hepáticas de aspecto normal. Todas as imagens foram adquiridas em microscópio óptico em objetivas de 20X (n= 3 por grupo).

#### 4.7 PRODUÇÃO DE OXIDANTES, SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO NO TECIDO HEPÁTICO

Os animais DIO + veículo aumentaram tanto a oxidação do DCFH quanto a concentração de nitrito quando comparado ao grupo Controle + veículo. Por outro lado, a suplementação com *Zingiber officinale* foi capaz de diminuir os níveis de DCFH e de Nitrito nos grupos Controle + ZO e DIO + ZO em relação ao Controle + veículo e DIO + veículo, respectivamente (Figura 11A e 11B). Resultados similares foram encontrados para os níveis de malondialdeído, em que o grupo DIO + veículo apresentou aumento nos seus níveis em relação ao grupo Controle + veículo e a suplementação nos animais DIO + ZO foi eficaz em reverter esses níveis (Figura 11C). O grupo DIO + veículo apresentou maior conteúdo de carbonil em relação ao Controle + veículo. Por outro lado, o grupo DIO + ZO apresentou redução dos níveis de carbonil em relação ao grupo DIO + veículo (Figura 11D).

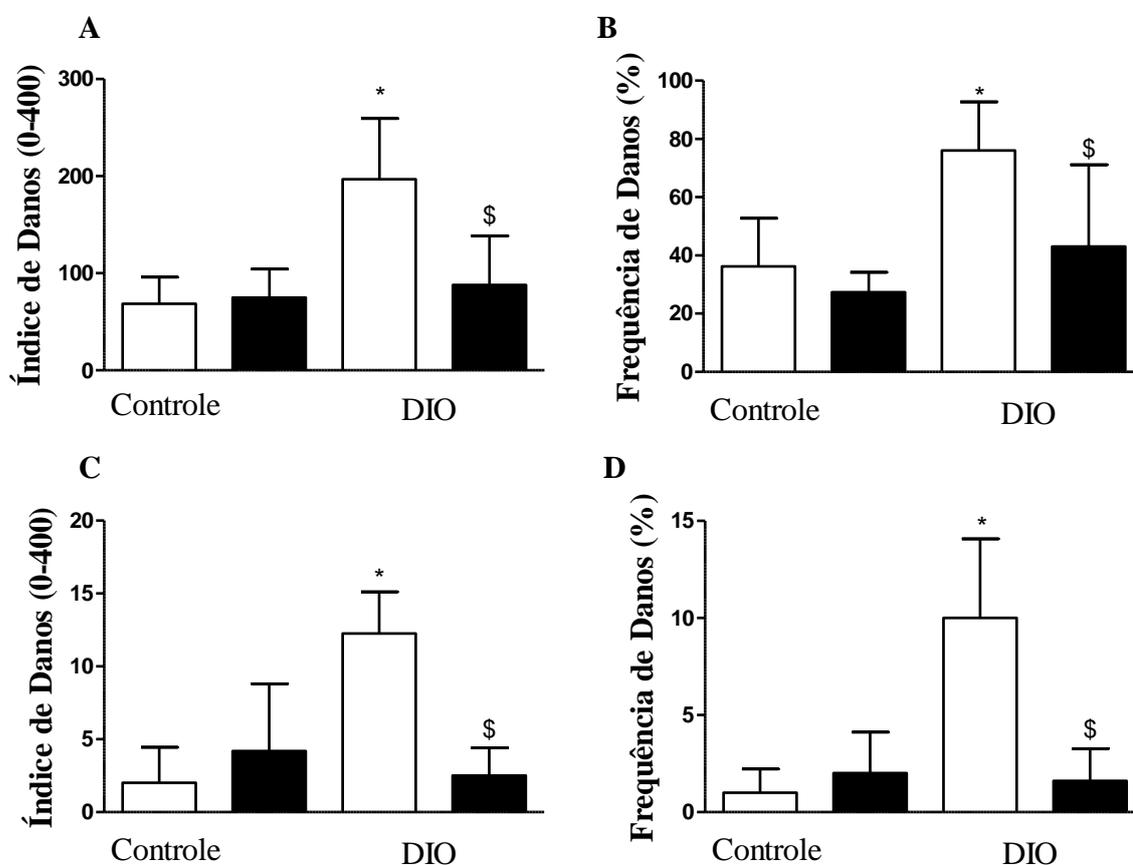
Quando analisado o sistema de defesa antioxidante, SOD, no grupo DIO + veículo foi observado aumento significativo em relação ao grupo Controle + veículo; o que não foi revertido por meio da suplementação (Figura 11E). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na atividade da catalase (Figura 11F). Com relação à razão GSH/GSSG (Figura 11G) não foram encontradas diferenças entre os grupos Controle + veículo ou Controle + ZO, bem como entre o grupo DIO + veículo e Controle + veículo. Porém, a suplementação por 35 dias aumentou significativamente a relação GSH/GSSG nos animais DIO + ZO quando comparados ao grupo DIO + veículo.



**Figura 11:** Efeitos sobre a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo no fígado de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) DCFH B) Nitrito C) MDA D) Carbonil E) SOD F) Catalase G) GSH/GSSG. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n=6-9 animais por grupo). \* p<0,05 vs Controle + veículo; \$ p<0,05 vs DIO + veículo.

#### 4.8 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE OS DANOS AO DNA AVALIADOS PELO ENSAIO COMETA

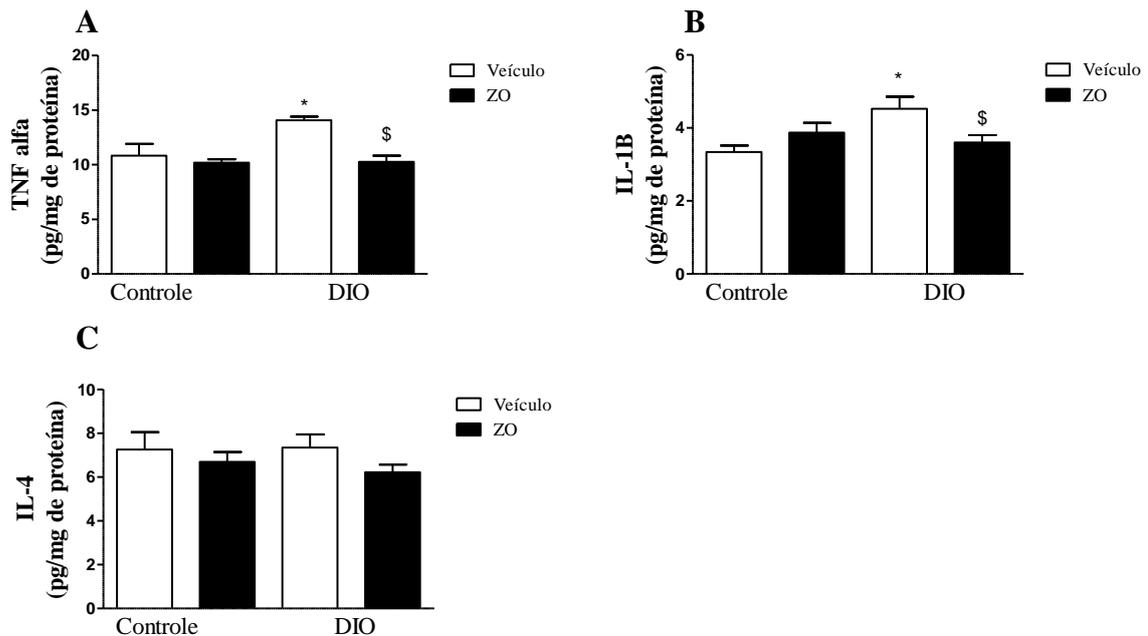
Observou-se aumento do índice (12A e 12C) e frequência (12B e 12D) do dano ao DNA do tecido hepático e sangue nos animais DIO + veículo em relação aos Controle + veículo. A suplementação com *Zingiber officinale* foi acompanhada de uma redução significativa do índice e frequência de danos ao DNA tanto no fígado (Figura 12A e 12B) quanto no sangue (Figura 12C e 12D) de animais DIO + ZO em relação ao DIO + veículo. Estes valores foram avaliados por meio do percentual de DNA deslocado a partir do nucleóide, formando uma cauda. Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram o potencial antigenotóxico do *Zingiber officinale* após 35 dias de suplementação.



**Figura 12:** Efeitos da suplementação com *Zingiber officinale* sobre os danos ao DNA avaliados pelo ensaio cometa. A) Índice de danos no fígado B) Frequência de danos no fígado C) Índice de danos no sangue D) Frequência de danos no sangue. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5-8 animais por grupo). \*  $p < 0,05$  vs Controle + veículo; \$  $p < 0,05$  vs DIO + veículo.

#### 4.9 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS NO MÚSCULO QUADRÍCEPS

Ao avaliar as citocinas pró-inflamatórias no quadríceps, foi observada maiores concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no grupo DIO + veículo em relação ao grupo Controle + veículo. Por outro lado, os animais DIO + ZO apresentaram diminuição do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Figura 13A e 13B) em relação ao grupo DIO + veículo. Já os níveis de IL-4 não foram alterados por ambos tratamentos (Figura 13C).



**Figura 13:** Efeitos sobre a concentração de citocinas no quadríceps de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) TNF- $\alpha$  B) IL-1 $\beta$  C) IL-4. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=4-6 animais por grupo). \*  $p < 0,05$  vs Controle + veículo; \$  $p < 0,05$  vs DIO + veículo.

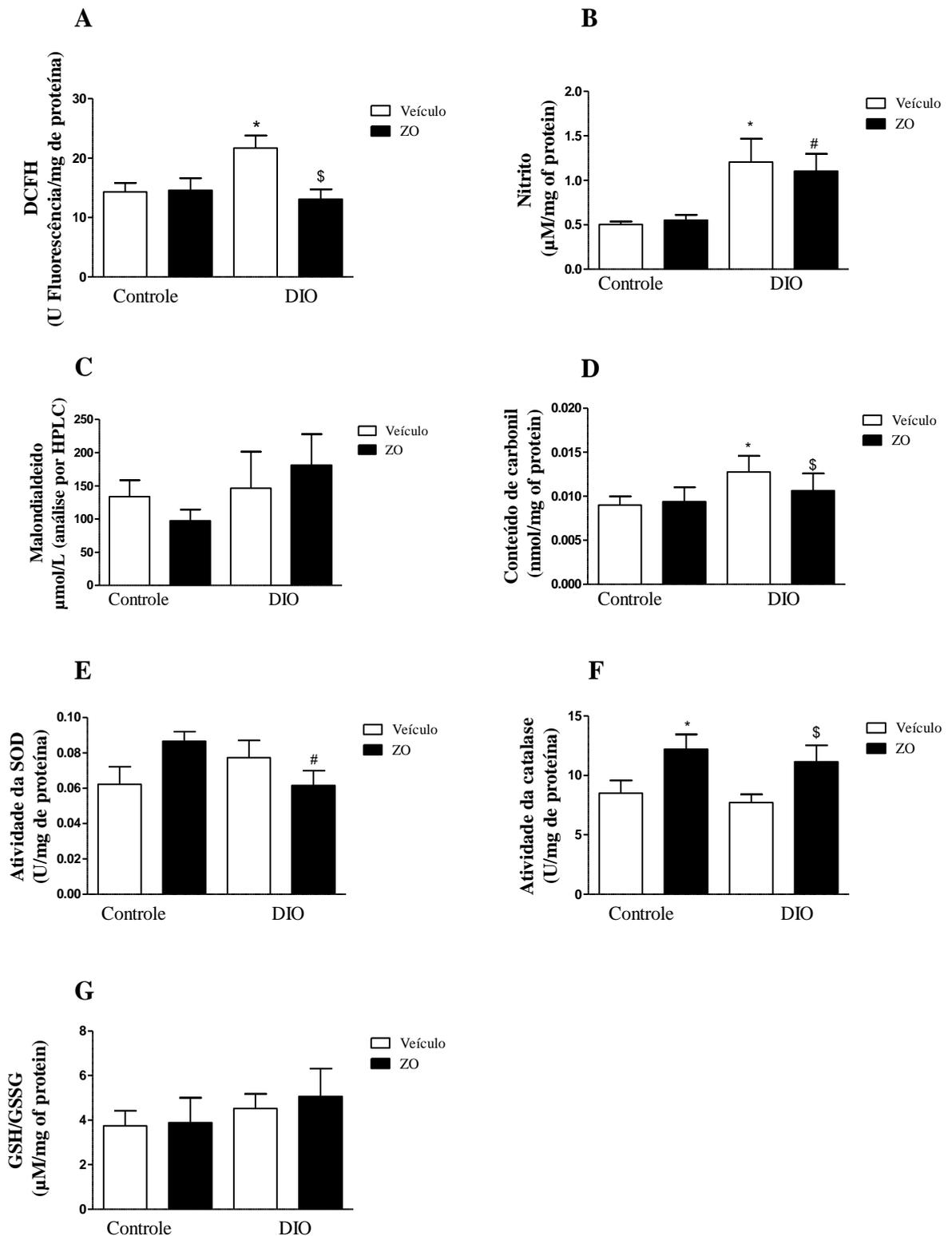
#### 4.10 PRODUÇÃO DE OXIDANTES, SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO NO QUADRÍCEPS

Foram avaliados parâmetros oxidativos e defesas antioxidantes no quadríceps. Ao analisar os níveis de DCF, os dados revelaram um aumento significativo da oxidação do DCFH nos animais DIO + veículo em relação ao Controle + veículo (Figura 14A). Em adição, foi observada uma diminuição da oxidação do DCFH no grupo DIO + ZO, quando comparado ao grupo DIO + veículo. Em associação a estes achados, o conteúdo de nitrito (Figura 14B),

foi maior no grupo DIO + veículo, em relação ao grupo Controle + veículo e no grupo DIO + ZO em relação ao grupo Controle + ZO. A suplementação com *Zingiber officinale* não foi eficaz em reduzir a produção de NO.

Buscando avaliar danos lipídicos, os níveis de malondialdeído (Figura 14C) foram determinados, porém, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Além do dano em lipídeos, os danos em proteínas também foram avaliados, e, para tal, utilizou-se a quantificação de grupamentos carbonil (Figura 14D). O grupo DIO + veículo apresentou aumento significativo em relação ao grupo Controle + veículo. O grupo DIO + ZO reduziu os níveis de carbonil em relação ao grupo Controle + ZO.

Para analisar a atividade antioxidante muscular, avaliou-se a atividade da SOD e catalase (Figura 14E e 14F, respectivamente). Os animais DIO + ZO apresentaram diminuição da atividade da SOD, quando comparado ao grupo Controle + ZO. A atividade da catalase (Figura 14F) foi aumentada no grupo Controle + ZO quando comparado ao Controle + veículo. Além disso, a atividade da catalase também aumentou no grupo DIO + ZO em comparação ao grupo DIO + veículo. Por fim, a razão GSH/GSSG não demonstrou diferença significativa entre os grupos.

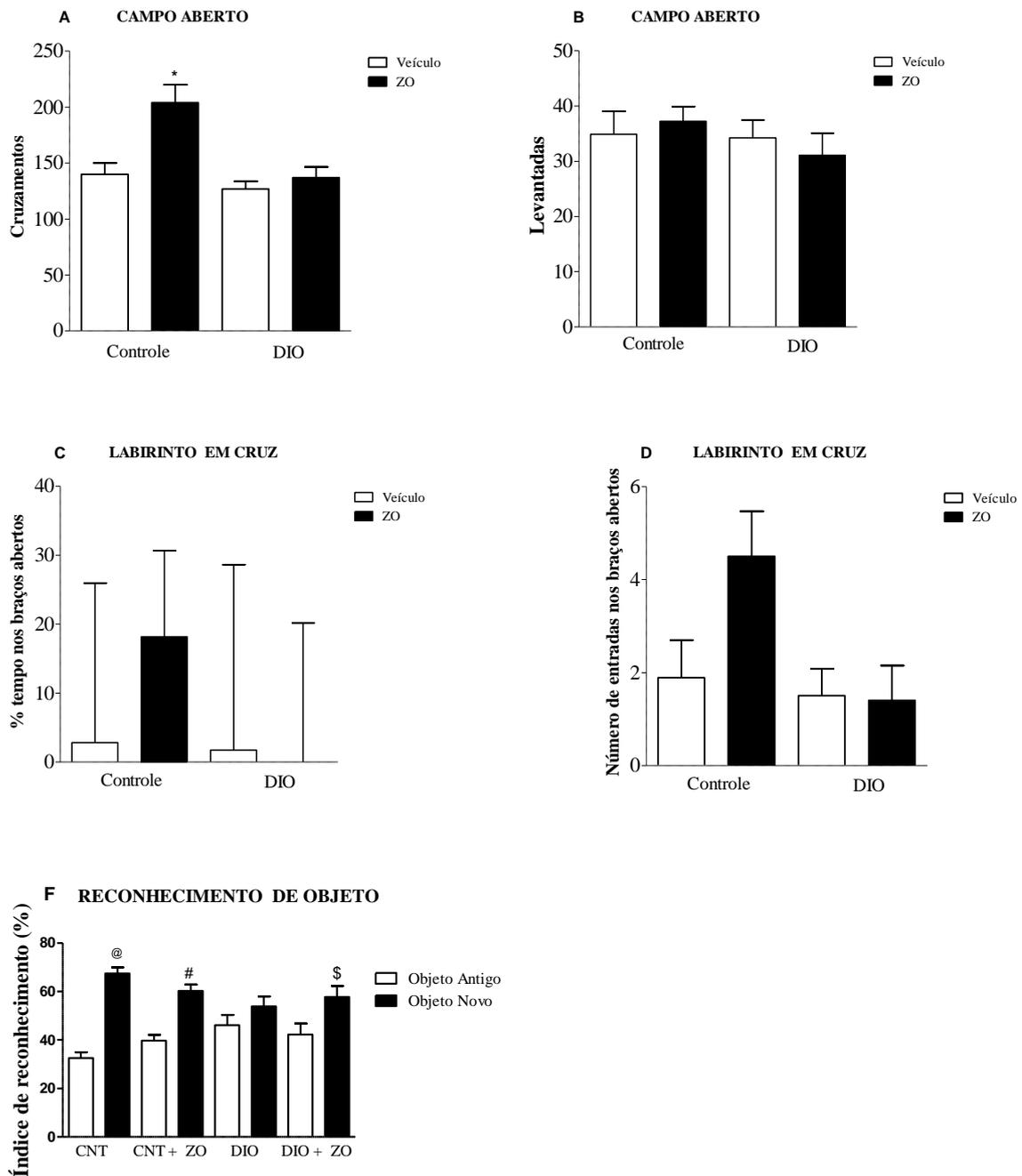


**Figura 14:** Efeitos sobre a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo no quadríceps de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) DCFH B) Nitrito C) MDA D) Carbonil E) SOD F) Catalase G) GSH/GSSG. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n=6-9 animais por grupo). \* p<0,05 vs Controle + veículo; # p<0,05 vs Controle + ZO; \$ p<0,05 vs DIO + veículo.

#### 4.11 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE A COGNIÇÃO

O teste de campo aberto demonstrou que o grupo Controle + ZO apresentou maior números de cruzamentos em relação ao grupo Controle + veículo (Figura 15A). Ainda no teste de campo aberto foram contabilizados os número de levantamentos, porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 15B). Os resultados demonstram que a dieta hiperlipídica não foi capaz de modificar a locomoção dos animais.

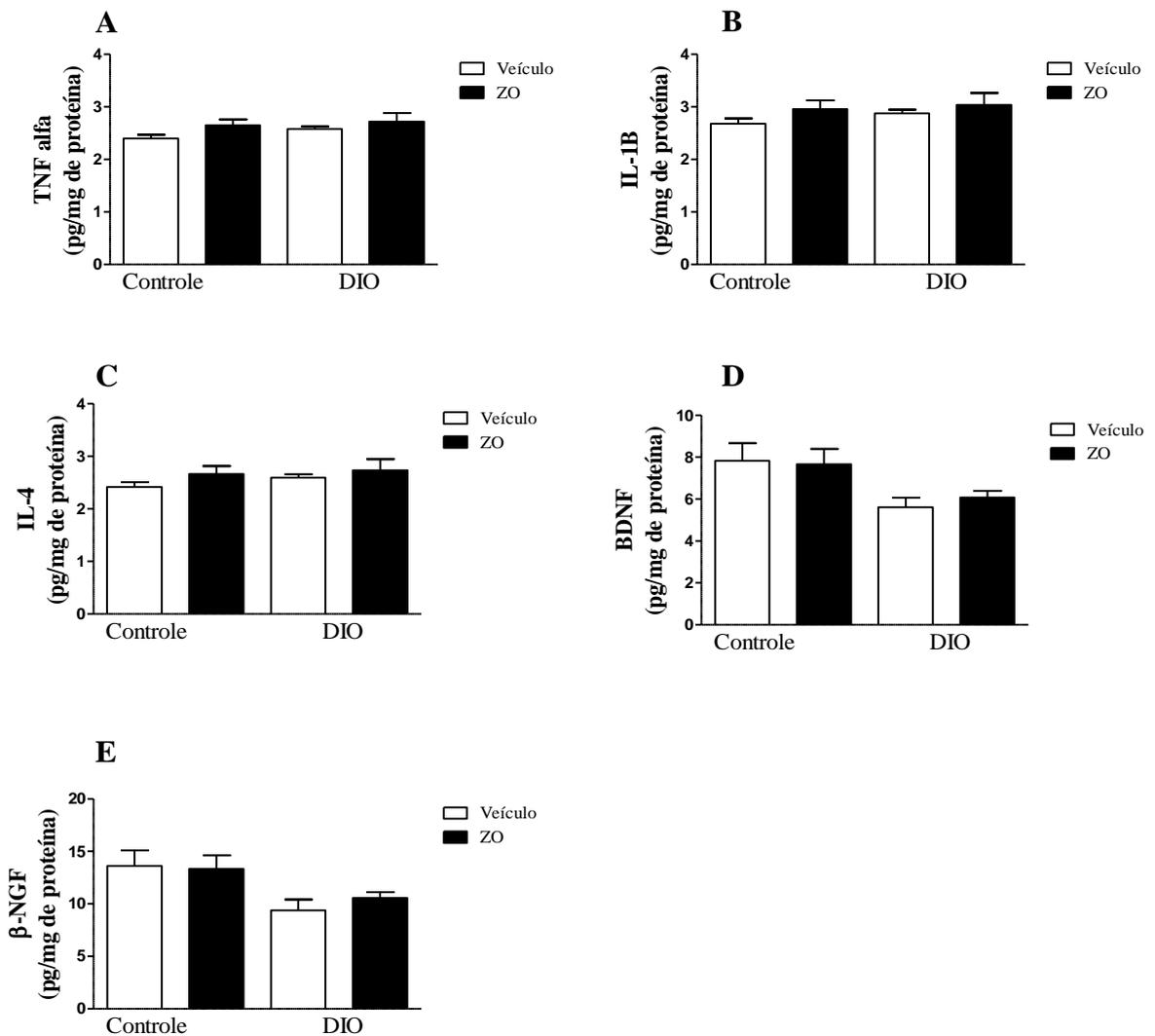
Para avaliar o comportamento tipo-ansioso foi realizado o teste de labirinto em cruz elevado. Neste teste avaliou-se o percentual de tempo que os animais permanenciam nos braços abertos (Figura 15C) e o número de entrada nos braços abertos (Figura 15D). Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos. Já a memória, foi avaliada no teste de reconhecimento de objeto (Figura 15E). Os animais dos grupo Controle + veículo, Controle + ZO e DIO + ZO apresentaram um índice de reconhecimento maior do objeto novo em relação ao objeto antigo, o que não aconteceu no grupo DIO + veículo.



**Figura 15:** Efeitos sobre as alterações cognitivas de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) Teste de campo aberto B) Levantamentos C) % tempo de entradas nos braços abertos D) Entrada nos braços abertos E) Reconhecimento de objeto. Devido à distribuição não-normal do % tempo de entradas nos braços abertos, no teste labirinto em cruz, essa variável foi descrita como mediana e intervalo interquartil. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=10 animais por grupo). \*p<0,05 vs Controle + veículo; @p<0,05 vs Controle + veículo (objeto antigo); # p<0,05 vs Controle + ZO (objeto antigo); \$p<0,05 vs DIO + ZO (objeto antigo).

#### 4.12 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE *ZINGIBER OFFICINALE* SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS E NEUROTROFINAS NO CÓRTEX CEREBRAL

No córtex também foram avaliados as citocinas (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-4). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação a dieta e a suplementação com *Zingiber officinale* (Figura 16A, 16B e 16C). Foi analisado ainda os níveis das neurotrofinas BDNF e  $\beta$ -NGF, como demonstrado na figura 16D e 16E. Não foram demonstradas diferenças significativas em nenhum dos grupos, em nenhuma das moléculas avaliadas.

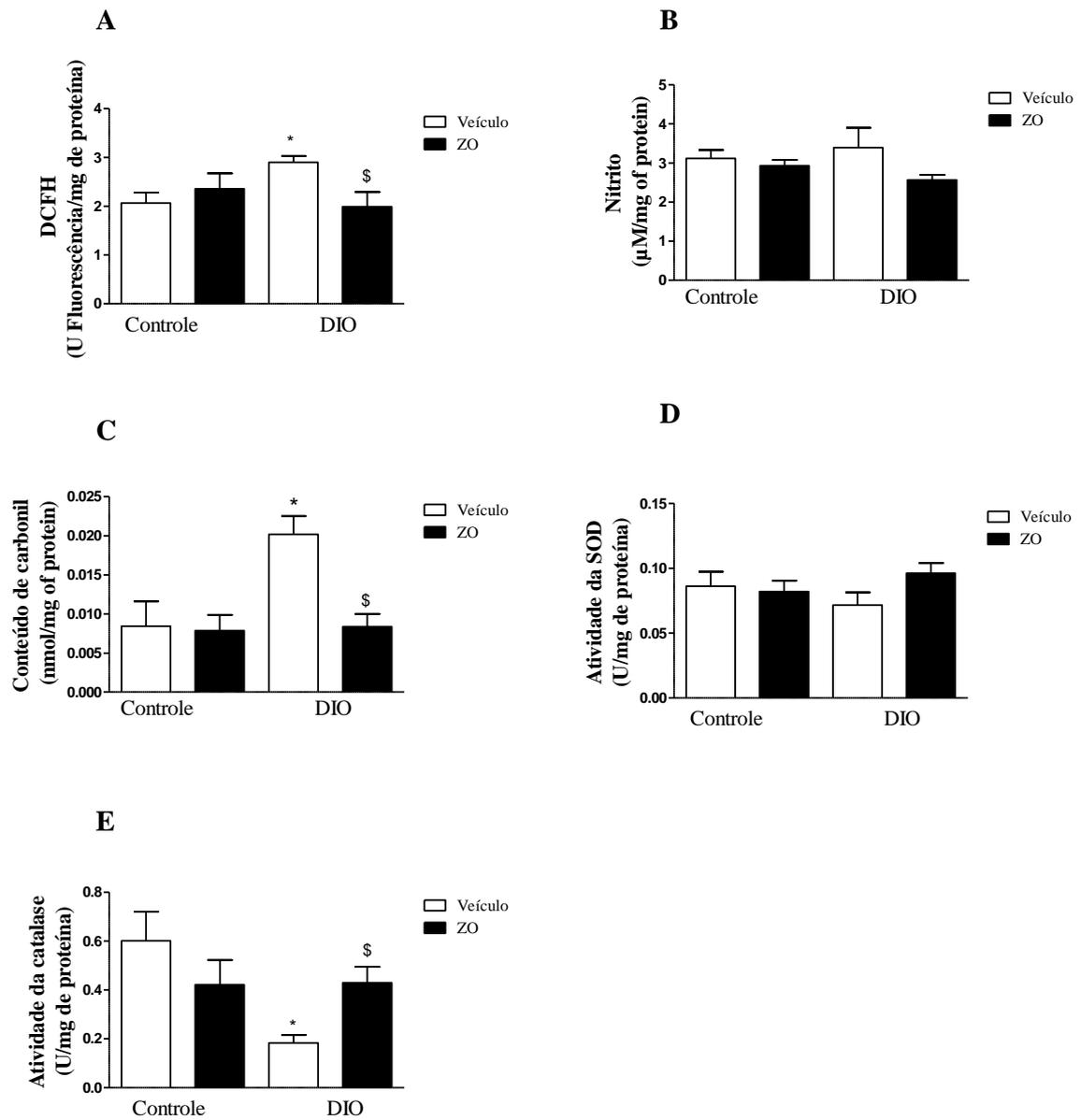


**Figura 16:** Efeitos sobre a concentração de citocinas e neurotrofinas no córtex de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) TNF- $\alpha$  no córtex B) IL-1 $\beta$  no córtex C) IL-4 no córtex D) BDNF no córtex E)  $\beta$ -NGF no córtex. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=4-6 animais por grupo).

#### 4.13 PRODUÇÃO DE OXIDANTES, SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO NO CÓRTEX

Ao avaliar os níveis de DCFH no córtex dos animais (Figura 17A), observou-se aumento no grupo DIO + veículo, em relação ao grupo Controle + veículo. Notavelmente, foi encontrada redução significativa da oxidação do DCFH no grupo DIO + ZO, quando comparado ao grupo DIO + veículo. Já ao avaliar a produção de nitrito (Figura 17B), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. A carbonilação de proteínas foi aumentada no grupo DIO + veículo em comparação ao grupo Controle + veículo. Interessantemente, no grupo DIO + ZO houve redução da carbonilação proteica, quando comparado ao grupo DIO + veículo (figura 17C).

Diante desses resultados, foram avaliados as defesas antioxidantes endógenas no córtex. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de atividade da SOD (Figura 17D) entre os grupos. Ademais, o grupo DIO + veículo apresentou redução significativa da atividade da catalase nesta estrutura cerebral quando comparado ao grupo Controle + veículo. Por fim, no córtex os animais DIO + ZO aumentaram significativamente a atividade da catalase em comparação ao grupo DIO + veículo (Figura 17E).



**Figura 17:** Efeitos sobre a produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e dano oxidativo no córtex de camundongos obesos induzidos por dieta tratados com *Zingiber officinale*. A) DCFH B) SOD C) Catalase D) Carbonil E) Nitrito. Utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6-9 animais por grupo). \*  $p < 0,05$  vs Controle + veículo; #  $p < 0,05$  vs Controle + ZO; \$  $p < 0,05$  vs DIO + veículo.

## 5 DISCUSSÃO

A obesidade se tornou um problema de saúde pública devido à sua prevalência epidêmica e sua associação a outras comorbidades. É considerada um distúrbio metabólico devido ao desequilíbrio energético entre a alta ingestão de energia (consumo de alimentos) e o baixo gasto energético (taxa metabólica, atividade física e termogênese adaptativa) (Abdali et al., 2015; Hassan e El-Gharib, 2015), no qual resulta em acúmulo de gordura visceral.

Mais da metade de todas as mortes do mundo em 2010 foram relacionadas a doenças não transmissíveis, incluindo obesidade, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. Sugere-se que o aumento alarmante na incidência de obesidade, é o resultado epidemiológico de uma transição nutricional caracterizada por padrões alimentares que apresentam um baixo consumo de ácidos graxos poliinsaturados e fibras, concomitante ao excesso de carboidratos refinados e gorduras (Ríos-Hoyo et al., 2014). Por outro lado, compostos medicinais naturais surgem como uma alternativa não farmacológica eficaz para alterações metabólicas associadas à obesidade. Estudos apontam que o extrato de chá verde, laranja amarga, feijão, cereja, curcumina e gengibre podem auxiliar no tratamento da obesidade e suas complicações (Kazemipoor et al., 2012; Bradford, 2013; Huang et al., 2014; Ríos-Hoyo e Gutiérrez-Salmeán, 2016).

Conforme elucida White (2007), o gengibre (*Zingiber officinale*) é uma especiaria amplamente consumida no mundo. Desde a sua origem no sudeste da Ásia e sua propagação para a Europa, o gengibre teve um longo histórico de uso medicinal para o tratamento de diversas patologias. É amplamente comercializado devido ao emprego alimentar e industrial, especialmente como matéria-prima para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geleias (Elpo, 2006). O gengibre contém mais de 200 compostos voláteis, principalmente hidrocarbonetos sesquiterpênicos, predominantemente zingibereno (35%), ar-curcumeno (18%) e farneseno (10%). Além dos compostos voláteis, o gengibre apresenta potentes compostos bioativos não-voláteis como o 6-gingerol, 6-shogaol e zingerone (Evans, 2002; Van e Wink, 2004). O 6-gingerol e o 6-shogaol, demonstram propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias significantes, já o zingerone é o responsável pela sensação de calor e ardência apresentadas pelo gengibre (Adams, 1995; Shukla, 2007; Shati e Elsaid, 2009). Dessa forma, o uso do gengibre é considerado seguro e o extrato pode conter altas concentrações de gingeróis e shogaios (Mahmoud et al., 2013).

Recentemente, Matsuzawa-Nagata e colaboradores (2008) encontraram aumento do peso corporal e acúmulo significativo de gordura retroperitoneal nos animais alimentados por

24 semanas com dieta hiperlipídica. Similar a essas alterações, o presente estudo encontrou aumento do peso corporal total, bem como aumento específico do tecido adiposo epididimal, mesentérico, retroperitoneal e peri-renal (dados não mostrados, utilizados para o cálculo do índice de adiposidade) em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas.

Várias propriedades do gengibre já foram demonstradas, dentre elas as atividades anti-inflamatória, antiemética, antimutagênica, hipoglicêmica, antibacteriana e anti-obesogênica (Habsah et al., 2000; Attari et al., 2018; Wang et al., 2017). Em indivíduos obesos, a expansão do tecido adiposo é resultante de dois processos, o aumento dos depósitos de triglicerídeos nos adipócitos (hipertrofia), bem como a maior diferenciação de novos adipócitos (hiperplasia). A adipogênese constitui um processo complexo de diferenciação celular pela qual os pré-adipócitos se tornam adipócitos maduros (Sarjeant e Stephens, 2012). Li e Zhou (2015) demonstram que 50 $\mu$ M de 6-gingerol inibe a diferenciação adipogênica em células 3T3-L1, por meio da ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, prevenindo a deposição de triglicerídeos nos adipócitos; em outro estudo, Tzeng e Liu (2013), observaram que o tratamento *in vitro* com 6-gingerol isolado, reduz o tamanho das gotículas de gordura e a diferenciação dos adipócitos. Além das evidências *in vitro*, a literatura animal também apoia o uso do gengibre como um agente dietético funcional para o controle do peso e prevenção de distúrbios metabólicos (Chrubasik et al., 2005; Al-Amin et al., 2006; Goyal e Kadnur, 2006; York et al., 2007; Matsuda et al., 2009; Nammi et al., 2009; Okamoto et al., 2011). No entanto, o presente estudo não encontrou alterações do peso e do índice de adiposidade após suplementação com *Zingiber officinale* por 35 dias, mesmo após os animais obesos suplementados apresentarem menor consumo alimentar. Uma explicação para tal efeito não ter sido encontrado no presente estudo, é a baixa concentração de gíngerois totais presente no extrato seco utilizado. Segundo o laudo técnico disponibilizado pelo fornecedor, o extrato utilizado contém 5,2% de gíngerois totais, o que corresponde a 20,8 mg/kg por animal, sendo que os estudos que encontraram redução do peso, suplementaram com 75mg/kg/dia de 6-gingerol isolado (Saravanan et al., 2014; Naidu et al., 2016).

Corroborando a isso, Kaur e Kulkarni (2001), também observaram redução da ingestão alimentar após suplementação com 0.5g/kg/dia de *Zingiber officinale*, sugerindo que o gengibre pode ser utilizado no controle de peso corporal a longo prazo. O gengibre pode modular a serotonina controlando o apetite, bem como se ligar aos receptores 5-HT<sub>2c</sub> e regular a saciedade (Goyal e Kadnur, 2006; Mansour et al., 2012; Palatty et al., 2013). Interessantemente, um estudo realizado em homens com excesso de peso mostrou que o

consumo de gengibre aumenta o efeito térmico dos alimentos e promove a saciedade sem afetar os parâmetros metabólicos e hormonais (Mansour et al., 2012).

Sabe-se que o excesso de peso é um dos principais fatores para o desenvolvimento da resistência à insulina, conforme comprovado por esse estudo e por outros (Boden, 2011; Ye, 2013; Jia et al., 2014; Lee e Lee, 2014). O prejuízo no metabolismo da glicose e níveis inflamatórios elevados são características comuns em indivíduos obesos e diabéticos. Em um teste oral de tolerância à glicose realizado por Akhani e colaboradores (2004) mostrou que o tratamento com *Zingiber officinale* diminuiu significativamente a área sob a curva de glicose em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). A abordagem experimental do presente estudo utilizou dieta como indutora da resistência à insulina e houve melhora na sensibilidade à insulina após o uso de *Zingiber officinale*. Os dados encontrados nesse e em outros estudos, sugerem uma potencial atividade de sensibilizador à insulina do gengibre.

Está bem estabelecido que a resistência à insulina nos tecidos periféricos está estreitamente associada com elevados níveis de lipídeos circulantes e acúmulo de lipídeos teciduais (McGarry, 2002). Matsuzawa-Nagata e colaboradores observaram em 2008, níveis de colesterol total maiores em animais alimentados com dieta hiperlipídica em relação aos animais alimentados com dieta padrão. Nesse sentido, diversos estudos demonstram que o gengibre possui efeitos proeminentes na redução de lipídeos sanguíneos e, subsequentemente, melhora na sensibilidade à insulina (Saravanan et al., 2004; Nammi et al., 2009; Akhani, et al., 2014). Quando comparado com atorvastatina, um medicamento hipocolesterolêmico padrão, o estudo realizado por Elrokh e colaboradores em 2010, demonstrou que 400 mg/kg de *Zingiber officinale* reduziu o colesterol total e aumentou o HDL de maneira tão eficaz quanto o uso do fármaco. Nammi e colaboradores (2009), também constataram reversão dos níveis aumentados de colesterol induzidos por dieta hiperlipídica por meio da suplementação com 400mg/kg/dia de *Zingiber officinale* por 6 semanas.

Com base nesses resultados, concluiu-se que o extrato de gengibre pode ter efeito terapêutico não farmacológico sobre lipídeos plasmáticos, devido à ação do gengibre em elevar a atividade hepática da enzima colesterol 7 $\alpha$ -hidroxilase, responsável pela biossíntese de ácidos biliares estimulando a conversão do colesterol em ácidos biliares, facilitando a excreção do colesterol (Srinivasan e Sambaiiah, 1991). Por outro lado, outro estudo realizado com pacientes não diabéticos com doença arterial coronariana não evidenciou diminuição nos níveis de lipídeos quando tratados com uma dose de 4g de gengibre em pó por um período de 3 meses (Bordia et al., 1997). Tal discrepância de resultados pode ser atribuída à variação na composição química dos extratos de gengibre administrados, dependendo do método de

preparação, origem do produto e tempo de armazenamento (Jolad et al., 2004; Jolad et al., 2005). Em relação aos níveis de triglicerídeos, neste estudo, ocorreu uma redução destes níveis nos animais obesos após suplementação, da mesma forma encontrada por Nammi e colaboradores (2009) e Al-Amin e colaboradores (2006). O efeito sobre a redução de triglicerídeos do gengibre pode ser devido à presença de niacina neste composto. Elrokh e colaboradores em 2010 relataram que a niacina causa inibição da secreção da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), por sua vez, reduz os níveis de triglicerídeos e aumenta a captação hepática da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Ness et al., 1996; Mary e John 2000; Durrington, 2003).

O excesso do ácido graxo saturado palmitato, leva ao aumento da fosforilação de proteínas e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, Lancaster e colaboradores (2018) demonstraram que o palmitato ativa, indiretamente os receptores TLR-4, os quais desempenham uma conexão importante entre o sistema imune inato e o sistema metabólico, regulando a inflamação induzida pela obesidade. O TNF- $\alpha$  foi uma das primeiras citocinas identificadas e está envolvida na resposta inflamatória sistêmica. Além disso, também tem sido associada ao desenvolvimento de resistência à insulina, obesidade e diabetes (Dulloo et al., 2010). É produzido principalmente por monócitos, linfócitos, tecido adiposo e músculo (Ouchi et al., 2011), e sua produção exacerbada participa da patogênese da síndrome metabólica associada à obesidade. O aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias desempenha importante função nas complicações metabólicas induzidas pela obesidade. No músculo esquelético, Salles e colaboradores (2012), mostraram aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em animais obesos, o qual, contribui para lipotoxicidade induzida por DAG e PKC. No entanto, no fígado e tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica o nível de TNF- $\alpha$  foi semelhante ao dos animais controles no estudo realizado por Matsuzawa-Nagata e colaboradores (2008), o que corrobora os achados desse estudo. Matsuzawa-Nagata e colaboradores (2008) sugerem que inicialmente há superregulação de genes para produção de ERO, em vez da elevação do TNF- $\alpha$ , sendo o estresse oxidativo o evento precoce que desencadeia a resistência à insulina em animais obesos. Em contraste, outros estudos demonstraram em roedores e humanos que na obesidade ocorre superexpressão do TNF- $\alpha$  e esse, induz a expressão de várias outras citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Hotamisligil et al., 1993; Tateya et al., 2013).

Resultados encontrados por Nammi e colaboradores (2009) e Naidu e colaboradores (2016) sugerem que o extrato de gengibre e o composto bioativo do gengibre, 6-gingerol podem significativamente regular de maneira negativa os níveis de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo

de animais alimentados com dieta hiperlipídica. No entanto, os níveis de TNF- $\alpha$  no presente estudo, foram reduzidos apenas no fígado e quadríceps de animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica suplementados com *Zingiber officinale*. O TNF- $\alpha$  favorece a resposta inflamatória sistêmica da fase aguda, por meio da liberação da IL-6 e IL-1 $\beta$ , moléculas pró-inflamatórias (Spoto et al., 2014; Marseglia et al., 2014). A IL-1 $\beta$ , é liberada principalmente por monócitos em resposta a dano tecidual, infecção ou alterações imunológicas. Recentemente, foi avaliado que a IL-1 $\beta$  favorece a resposta pró-inflamatória na obesidade via produção de outras citocinas, como a IL-6 (Stienstra et al., 2012). Assim como os níveis de TNF- $\alpha$ , os níveis de IL-1 $\beta$  se apresentaram menores no fígado e no quadríceps de animais obesos suplementados (Tzeng et al., 2015).

A IL-6, produzida em animais expostos a dieta hiperlipídica, induz diretamente a expressão do receptor de IL-4, uma tentativa inicial dos macrófagos presentes no tecido adiposo via arginase para conter a inflamação. No entanto, a indução de IL-4 induzida por IL-6 pode acarretar em aumento de fibrose (Mauer et al., 2014). Além disso, o desenvolvimento da obesidade em camundongos induz uma mudança no perfil de citocinas apresentando diminuição da IL-2 e aumento do interferon gama e IL-4, o que sustenta a hipótese que a obesidade é um fator de risco para doenças alérgicas, bem como para doenças infecciosas (Mito et al., 2000; Lu et al., 2015). Corroborando a isso, os níveis de IL-4 estavam reduzidos em animais após reduzirem os depósitos de gordura visceral (Borst et al., 2005). Diante disso e sabendo que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula os genes da IL-4 e IL-6 dependente da via APE/Ref-1 (Frossi et al., 2003) e que a obesidade aumenta a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o presente estudo buscou avaliar os níveis de IL-4 em animais obesos e suplementados com *Zingiber officinale*. Os níveis de IL-4 apresentaram alterações somente no tecido hepático, corroborando com os únicos dois trabalhos encontrados que avaliaram os níveis de IL-4 após a suplementação com *Zingiber officinale* (Shin et al., 2015; Khan et al., 2015).

A obesidade, por si só, pode induzir estresse oxidativo sistêmico por meio de vários mecanismos bioquímicos, como a geração de superóxido a partir da NADPH oxidase, fosforilação oxidativa, auto-oxidação do gliceraldeído, ativação de PKC e aumento da via do poliol e hexosamina (Manna e Jain, 2015). Estudo realizado em humanos e modelos experimentais de obesidade mostrou forte correlação entre adiposidade, níveis inflamatórios e marcadores do estresse oxidativo sistêmico (Pausova, 2006). A produção de ERO é um evento fisiológico do metabolismo. Entretanto, a hiperglicemia, característica comum dos pacientes com excesso de peso, pode levar a auto-oxidação da glicose, maior entrada de NADH e FADH<sub>2</sub>, vazamento de elétrons na cadeia transportadora e glicosilação de proteínas

conforme demonstrado por vários autores (Lodovici et al., 2008; Shen, 2010; Nowotny et al., 2015).

Em adição, Furukawa e colaboradores (2004) correlacionam fortemente o estresse oxidativo no tecido adiposo com aumento de marcadores inflamatórios e resistência à insulina. Altos níveis da expressão de NOX4 no tecido adiposo epididimal foram encontrados em ratos, sugerindo que essa enzima contribui para a formação de ERO na obesidade induzida por dieta (Furukawa et al., 2004; Matsuzawa-nagata et al., 2008). Os resultados desse estudo, corroboram com o estudo de Furukawa e colaboradores (2004) e Matsuzawa-nagata e colaboradores (2008) onde a produção de ERO aumentou seletivamente no tecido adiposo e fígado de camundongos obesos induzidos por dieta. No presente estudo houve maior produção de ERO no tecido adiposo de animais obesos. Além da produção de ERO, o presente estudo encontrou aumento na carbonilação de proteínas no tecido adiposo, fígado, quadríceps e córtex de animais obesos. Matsuzawa-nagata e colaboradores (2008) observaram altos níveis de proteínas carboniladas no tecido hepático de animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica. A carbonilação de proteínas é uma modificação pós-traducional oxidativa não enzimática, considerada um biomarcador do estresse oxidativo (Mukherjee et al., 2015). As ERO e ERN possuem efeitos deletérios sobre as proteínas e podem contribuir para inflamação tecidual e morte celular. A oxidação de aminoácidos no sítio ativo ou no local regulador podem afetar a atividade e induzir mudanças conformacionais, que podem induzir o aumento da hidrofobicidade e subsequente desnaturação, agregação e precipitação proteica (Stadtman, 1990). De fato, com o aumento do estresse oxidativo, diversas proteínas ficam susceptíveis a carbonilação como demonstrado por Bollineni e colaboradores (2014). Foram detectadas 36 proteínas carboniladas em pacientes obesos com diabetes *mellitus* do tipo 2 (Bollineni et al., 2014).

Em 2008, El-Abhar e colaboradores observaram que a suplementação por 10 dias com 100, 200 e 400 mg/kg de extrato de gengibre reduziu a carbonilação proteica induzida pelo ácido acético no cólon de animais, reduzindo a lesão da mucosa colônica. Interessantemente, em animais diabéticos, o extrato de gengibre reduziu as proteínas carboniladas, modulando positivamente a atividade da enzima aldolase redutase 2 (ALR2), normalizando a via do poliol e prevenindo o estresse oxidativo em condições hiperglicêmicas (Saraswat et al., 2010). O aumento do fluxo pela via dos polióis determina maior conversão de glicose a sorbitol, depletando NADPH e glutatona, aumentando o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia. O NADPH é o substrato da glutatona redutase, e sua depleção pela via do poliol em diabéticos resulta em menor neutralização do  $H_2O_2$ , realizado pela GPx (Bravi et

al., 1997). Similar a esse resultado, ao verificar a razão GSH/GSSG no tecido hepático, o presente estudo encontrou níveis significativamente maiores nos animais obesos suplementados com *Zingiber officinale* em relação aos animais obesos não suplementado, corroborando com o estudo de Sani e colaboradores (2014), onde a suplementação de 40mg/kg de gengibre foi eficiente em aumentar a razão GSH/GSSG em ratos. Apesar de não ter sido avaliado a via do poliol, sugere-se que os animais obesos suplementados com *Zingiber officinale* apresentem uma redução da carbonilação proteica, consequentemente diminuição da via dos poliois e depleção do NADPH.

Outro estudo, utilizando os compostos isolados 6-gingerol e 6-shogaol, mostraram os efeitos do *Zingiber officinale* na prevenção da glicação de proteínas, sugerindo que o consumo regular de extrato da raiz de gengibre pode atenuar a progressão das complicações diabéticas (Zhu et al., 2015). Assim, o consumo de alimentos, bebidas ou suplementos contendo gengibre, como estratégias dietéticas eficazes e seguras, possui grande potencial para prevenir o desenvolvimento de complicações da obesidade e, consequentemente, melhorar a qualidade de vida e diminuir a morbimortalidade nesses indivíduos.

Para confirmar as alterações induzidas pela dieta, além dos danos nas proteínas, foram analisadas os danos em lipídeos. Em 2007, Amirkhizi e colaboradores observaram que a concentração plasmática de MDA foi significativamente maior em mulheres obesas quando comparadas com mulheres de IMC eutrófico e não foram observadas diferenças significativas na atividade da catalase nos eritrócitos entre mulheres obesas e não obesas. Os resultados do estudo de Amirkhizi e colaboradores (2007) corroboram com os resultados do presente estudo, onde no tecido hepático, os animais obesos não suplementados apresentaram maiores níveis de MDA concomitante a não alteração significativa da atividade da enzima antioxidante catalase. Apesar da atividade da SOD estar elevada nos animais DIO, a não alteração da atividade da catalase impede a neutralização do peróxido de hidrogênio, que apresentou-se elevado nos animais DIO, resultando em maiores níveis de danos oxidativos a lipídeos e proteínas. O tecido adiposo dos animais DIO apresentou maior produção de ERO, maior atividade da SOD sem concomitante aumento da atividade da catalase, resultando em maior carbonilação de proteínas. Interessantemente, no quadríceps, a atividade da catalase apresentou-se elevada tanto nos animais controles quanto nos DIO após suplementação com *Zingiber officinale*, corroborando com o estudo de Ansari e colaboradores (2006), onde no músculo cardíaco a suplementação com *Zingiber officinale* resultou em aumento da atividade da catalase, resultando em menor dano oxidativo induzido por isoproterenol em ratos.

Avaliamos o metabólito nitrito que pode indicar excesso de formação de ERN (Valerio e Nisoli, 2015).

Os níveis de NO intracelular podem reagir com o ânion superóxido, resultando na formação da potente molécula oxidante e nitrante: peroxinitrito (Engin, 2017). Com exceção do tecido hepático e quadríceps, não foram encontradas reduções nos níveis de NO nos animais DIO suplementados com *Zingiber officinale*. Similar ao estudo de Vijaya Padma e colaboradores (2007), onde em células HEp-2, o extrato de gengibre reduziu a formação de nitrito.

Além da periferia, como demonstrado pelo presente estudo, o extrato de *Zingiber officinale* melhorou a atividade antioxidante no córtex de animais obesos induzidos por dieta, por meio do aumento da atividade da catalase, redução da produção de DCF e redução dos níveis de carbonilação de proteínas. Sabe-se que a obesidade está associada com declínio cognitivo e doenças neurodegenerativas (Pasinetti e Eberstein et al., 2008). A crescente evidência epidemiológica também mostra que a obesidade está intimamente relacionada à disfunção cerebral e início precoce da doença de Alzheimer (Bruce-Keller et al., 2009). Corroborando a isso, Denver e colaboradores (2018) demonstraram que a memória de reconhecimento e a aprendizagem espacial foram prejudicadas em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. O desempenho cognitivo no teste de reconhecimento de um novo objeto mostrou que a dieta hiperlipídica reduziu a exploração dos animais para novos objetos. Esta relação é fortemente apoiada por distúrbios metabólicos acentuados, associado a estados depressivos, ansiedade e déficits cognitivos (Gancheva e Zhelyazkova-Savova, 2016). Estudos recentes sugerem que dietas com alto teor de gorduras e açúcares não apenas prejudicam condições fisiológicas, como também alteram regiões cerebrais que controlam comportamentos cognitivos e alimentares (Pedroso et al., 2016; Poon et al., 2016). A incapacidades cognitiva decorrentes de eventos neurodegenerativos pode ser devido ao aumento de estresse oxidativo (Sah et al., 2017).

Em animais alimentados por 8 semanas com dieta hiperlipídica, o conteúdo de MDA em tecidos periféricos e centrais foram aumentados, agravando a peroxidação lipídica cerebral (Park et al., 2010). Os neurônios são sensíveis a lesões oxidativas. A obesidade aumenta o metabolismo dos ácidos graxos neuronais e a produção de ERO, o que leva à peroxidação da membrana neuronal e à apoptose dos neurônios. Estudos clínicos também mostraram que a obesidade está negativamente relacionada à capacidade cognitiva e função cerebral em obesos mórbidos (Sargénius et al., 2017). Estudo recente, realizado por Shi e colaboradores (2018), demonstram que o efeito antioxidante da via SIRT3-MnSOD é essencial para a sobrevivência

dos neurônios. A SIRT3 é uma importante desacetilase mitocondrial que aumenta a função antioxidante pela desacetilação da SOD mitocondrial dependente de manganês (mnSOD) (Tao et al., 2010; Hirschev et al., 2011). Esses mesmos autores sugerem que a dieta hiperlipídica reduz a via SIRT3-MnSOD e a função cognitiva em camundongos (Shi et al., 2018). Corroborando a isso, o nível de atividade de SIRT3 e a expressão de MnSOD foram diminuídos em pessoas diabéticas e obesas (Boyle et al., 2013). Interessantemente, os resultados de Li e colaboradores (2017) sugerem que a dieta materna rica em gorduras durante a gravidez ou lactação sensibiliza a prole aos efeitos adversos de uma dieta rica em gordura, resultando em um fenótipo de síndrome metabólica e levando a déficits cognitivos.

Wattanathorn e colaboradores (2011), a fim de avaliar a atividade antioxidante do *Zingiber officinale*, mostraram que a função cognitiva melhorou em ratos que receberam extrato de gengibre, bem como a área de infarto cerebral foi reduzida. O efeito do aumento cognitivo e o efeito neuroprotetor encontrados por esses autores, ocorreram principalmente por meio da atividade antioxidante do extrato, já que este aumentou a atividade da catalase, no hipocampo e no córtex (Wattanathorn et al., 2011), corroborando com o presente estudo. Lim e colaboradores (2014) observaram que a administração de extrato de gengibre melhorou significativamente a capacidade dos ratos reconhecerem novos objetos por meio do teste de reconhecimento de objetos, via ativação de ERK/CREB, resultando em maior aprendizado e memória.

Mehdizadeh e colaboradores (2012) mostraram que a administração de 100mg/kg/dia *Zingiber officinale* em animais tratados com metilendioximetanfetamina (MDMA), conhecido como ecstacy, atenuou a morte celular apoptótica e melhorou a memória de aprendizado. Em um estudo recente, as funções de memória de curto prazo dos ratos tratados com gengibre foram mais aprimoradas do que as funções de memória de longo prazo (Khaliq et al., 2017), sugerindo e corroborando com o presente estudo, onde a suplementação com *Zingiber officinale* pode levar a uma melhora na memória de reconhecimento.

Similarmente aos resultados encontrados no presente estudo, Hryhorczuk e colaboradores (2017) observaram que nos animais alimentados com dieta hiperlipídica por 8 semanas não apresentaram sinais de ansiedade, o que foi analisado no teste de labirinto em cruz elevado. Interessantemente, um estudo comparou os efeitos do Zingicomb uma preparação combinada de extratos padronizados de Ginkgo biloba e *Zingiber officinale* contra o diazepam, ansiolítico já estabelecido. Após testados várias doses de Zingicomb, o tratamento com 0,5 mg/kg aumentou o tempo gasto nos braços abertos, fornecendo evidências de que o Zingicomb, na dose de 0,5mg/kg possui efeitos ansiolíticos no labirinto em cruz

elevado comparáveis aos do diazepam, mas que, em altas doses, o Zingicomb pode ter propriedades ansiogênicas (Hasenöhr et al., 1996). Corroborando a isso, Vishwakarma e colaboradores (2002), observaram que os animais controles tratados com extrato de *Zingiber officinale* apresentaram diminuição da permanência nos braços fechados do labirinto em cruz elevado, sugerindo a presença de princípios ansiolíticos nesse composto.

Assim como Matsuzawa-nagata e colaboradores (2008), os resultados do presente estudo levantam a possibilidade de que o desenvolvimento das alterações induzidas pela obesidade, são desencadeadas inicialmente pelo aumento de ERO e ERN e portanto antioxidantes podem ser alvos terapêuticos eficazes. Como diversos outros alimentos com capacidade de neutralizar radicais livres, a atividade antioxidante do gengibre deriva, principalmente, de seu alto teor de polifenóis (Mukherjee et al., 2014; Adekunle et al., 2018). Coletivamente, os resultados sugerem que o aumento do estresse oxidativo nos tecidos adiposo, hepático, quadríceps e córtex podem ser efeito promotor precoce da síndrome metabólica e que o estado redox nesses tecidos podem ser um alvo terapêutico potencialmente útil para a síndrome metabólica associada à obesidade.

O estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese de várias doenças incluindo a esteatose hepática não alcóolica (Sumida et al., 2013). O catabolismo elevado de ácidos graxos nos hepatócitos causa excessivo fluxo de elétrons na cadeia transportadora, prejudicando a capacidade oxidativa das mitocôndrias. A consequente superprodução de ERO e consequente estresse oxidativo reduz os níveis celulares de ATP e glutathione causando danos no DNA (Rolo et al., 2012). A hiperglicemia é também um importante contribuinte para o acúmulo hepático de lipídeos, além da produção de ERO, a hiperglicemia também ativa a proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidrato (ChREBP) e genes lipogênicos (Rahimi e Landaverde, 2013). Por outro lado, estudos demonstram que o uso de gengibre reduz ou evita o acúmulo de gordura no fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica (Sahebkar, 2011; Lai et al., 2016; Rahimlou et al., 2016). A diminuição da progressão da esteatose induzida pelo *Zingiber officinale* é justificada por vários mecanismos, tais como, melhora na sensibilidade à insulina, ativação do PPAR $\gamma$ , diminuição da acetil CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS) e regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias. Tomados em conjunto o *Zingiber officinale* promove efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios consideráveis, reduzindo o conteúdo hepático de triglicérides e prevenindo a esteatose (Okamoto et al., 2011; Rahimlou et al., 2016).

Considerando que o presente estudo observou redução do acúmulo de gordura no fígado, bem como melhora nos parâmetros oxidativos e inflamatórios após a suplementação,

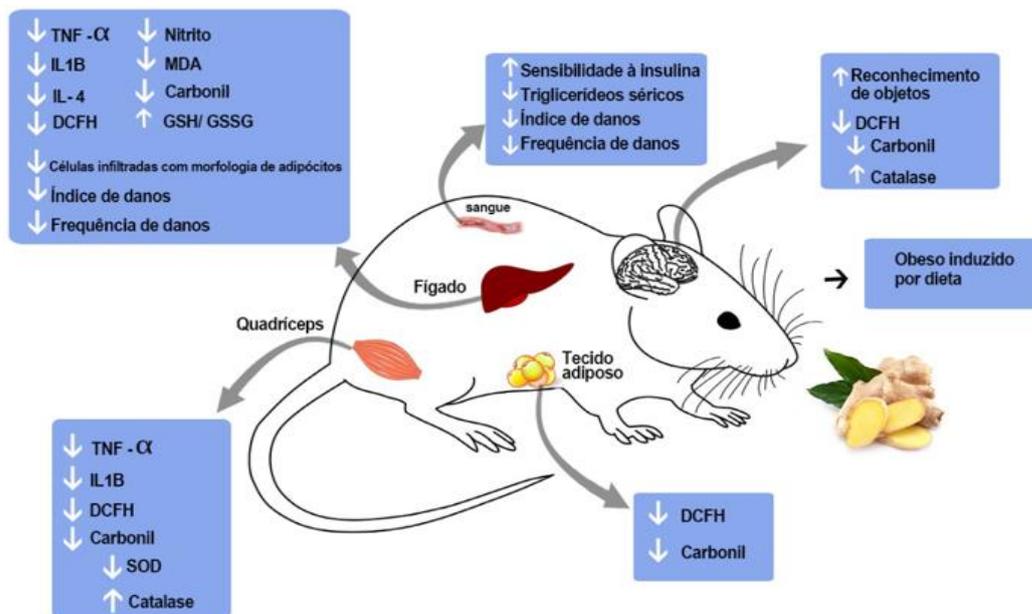
buscou-se avaliar a possível eficácia hepatoprotetora sobre as alterações no DNA induzidas pelo *Zingiber officinale*. Já está bem definido que a oxidação mitocondrial e peroxissômica de ácidos graxos em uma dieta hiperlipídica é capaz de produzir radicais livres no fígado e, portanto, estresse oxidativo, o qual poderia resultar em alterações do DNA (Fernández-Sánchez et al., 2011).

As ERO e ERN aumentadas, podem danificar as células resultando em peroxidação lipídica, alteração de estruturas proteicas e de ácido nucleico (Ajith, 2010). Especificamente as espécies reativas de nitrogênio, como óxido nítrico e seus derivados como o peroxinitrito, têm sido identificadas como possíveis causadores de danos ao DNA, contribuindo para processos carcinogênicos (Payne et al., 1999). Assim como o NO, o MDA, produto final da peroxidação de lipídeos, também foi demonstrado ser um agente genotóxico e mutagênico, contribuindo para o desenvolvimento de câncer em humanos (Feron et al., 1991). A fim de monitorar o efeito anti-genotóxico do *Zingiber officinale*, o teste cometa foi aplicado. O ensaio cometa é utilizado para analisar lesões genômicas, tais como quebras de fita simples e dupla do DNA, sítios álcali-lábeis e lesões oxidativas específicas, as quais são passíveis de reparo (Tice et al., 2000). O resultado do presente estudo avaliado por meio do ensaio cometa demonstraram que a suplementação com 400mg/kg/dia pode ter um grande potencial antigenotóxico. Jeena e colaboradores (2016), observaram que o óleo essencial de gengibre diminuiu significativamente a formação de micronúcleos, inibiu a formação de aberrações cromossômicas e protegeu contra danos no DNA de células da medula óssea. Interessantemente, o 6-gingerol reduziu significativamente o dano no DNA e a formação de micronúcleos causados pela micotoxina patulina (Yang et al., 2011). Corroborando a isso, Ippoushi e colaboradores (2003), observaram que o 6-gingerol inibiu a produção de NO e a quebra oxidativa de fita simples do DNA em macrófagos J774.1 estimulados com LPS.

Mais de um bilhão de adultos em todo o mundo estão acima do peso, e pelo menos 300 milhões deles são clinicamente obesos (Hassan e El-Gharib, 2015). Estudos epidemiológicos têm apresentado uma correlação inversa entre a incidência da obesidade e níveis de antioxidantes e anti-inflamatórios presentes na alimentação (Abdali et al., 2015; Hassan e El-Gharib, 2015). A preocupação com os efeitos deletérios da obesidade é naturalmente seguida pelo interesse em compostos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-genotóxica para uso populacional. Desta forma, supõe-se que a suplementação com *Zingiber officinale* reverte parcialmente as alterações metabólicas apresentadas pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica reduziu a sensibilidade à insulina periférica, aumentou a produção de oxidantes derivados do oxigênio e nitrogênio, bem como redução das defesas antioxidantes no tecido hepático, epididimal, muscular e no córtex. Além do estresse oxidativo, observou-se nesses animais, maiores danos no DNA no fígado e no sangue. Essas alterações bioquímicas teciduais nos animais obesos foram associadas a prejuízos na memória, mas não na ansiedade. Por outro lado, a suplementação com 400mg/kg/dia por 35 dias de *Zingiber officinale* reverteu parcialmente esses parâmetros: i) aumentando a sensibilidade à insulina ii) reduzindo os níveis séricos de triglicerídeos iii) reduzindo a produção de oxidantes iiiii) aumentando o status antioxidante iiiiii) reduzindo os danos oxidativos a proteínas, lipídeos e DNA iiiiii) diminuindo o acúmulo de lipídeos no fígado e iiiiii) melhorando a memória de curto prazo (Figura 18). Entretanto, estas alterações positivas não foram acompanhadas da redução do peso corporal. Mais estudos são necessários a fim de se comprovarem os reais efeitos da suplementação de *Zingiber officinale* em modelos de animais obesos.



**Figura 18:** Desenho esquemático representando os efeitos benéficos do *Zingiber Officinale* e seus compostos ativos nas respostas metabólicas. A suplementação do *Zingiber officinale* impediu o aumento das concentrações séricas de triglicerídeos e glicose, diminuiu o estresse oxidativo no tecido adiposo epididimal, fígado, quadríceps e córtex de animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Além disso, aumentou a capacidade antioxidante principalmente no quadríceps, fígado e córtex. No quadríceps a suplementação com *Zingiber Officinale* reduziu a produção de citocinas pró inflamatórias. Em adição os danos genotóxicos induzidos por dieta hiperlipídica, reduziram no tecido hepático e sangue de animais obesos suplementados com 400mg/kg/dia por 35 dias com *Zingiber officinale*.

## REFERÊNCIAS

- Abdali D, Samson SE, Grover AK. How effective are antioxidant supplements in obesity and diabetes? *Med Princ Pract*. 2015;24(3):201-15.
- Adams RP. *Identification of Essential Oils Components Gas Chromatography and Mass Spectroscopy*. Carol Stream: Allured Publishing Co., 1995.
- Adekunle IA, Imafidon CE, Oladele AA, Ayoka AO. Ginger polyphenols attenuate cyclosporine-induced disturbances in kidney function: Potential application in adjuvant transplant therapy. *Pathophysiology*. 2018; 25(2):101-115.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
- Ahn EK, Oh JS. Inhibitory Effect of Galanolactone Isolated from *Zingiber officinale* Roscoe Extract on Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *Agric Biol Chem*; 55(1): 63-68.
- Ajith TA. Ameliorating reactive oxygen species-induced in vitro lipid peroxidation in brain, liver, mitochondria and DNA damage by *Zingiber officinale* Roscoe. *Indian J Clin Biochem*. 2010; 25(1):67-73.
- Akhani SP, Vishwakarma SL, Goyal RK. Anti-diabetic activity of *Zingiber officinale* in streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56(1):101-5.
- Al-Amin ZM, Thomson M, Al-Qattan KK, Peltonen-Shalaby R, Ali M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr*. 2006; 96(4):660-6.
- Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8(1):55-62.
- Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2):409-20.

- Alizadeh-Navaei R, Roozbeh F, Saravi M, Pouramir M, Jalali F, Moghadamnia AA. Investigation of the effect of ginger on the lipid levels. A double blind controlled clinical trial. *Saudi Med J*. 2008; 29(9):1280-4.
- Alomar SY, Zaibi MS, Kępczyńska MA, Gentili A, Alkhuriji A, Mansour L, Dar JA, Trayhurn P. PCR array and protein array studies demonstrate that IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ) stimulates the expression and secretion of multiple cytokines and chemokines in human adipocytes. *Arch Physiol Biochem*. 2015; 121(5):187-93.
- Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidación and oxidative stress in women. *ARYA Atheroscler J*. 2007; 2(4):189-92.
- Ansari MN, Bhandari U, Pillai KK. Ethanolic *Zingiber officinale* R. extract pretreatment alleviates isoproterenol-induced oxidative myocardial necrosis in rats. *Indian J Exp Biol*. 2006; 44(11):892-7.
- Anstey KJ, Low LF. Normal cognitive changes in aging. *Aust Fam Physician*. 2004;33(10):783-7.
- Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: Molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* 2002;1:1.
- Attari EV, Malek Mahdavi A, Javadivala Z, Mahluji S, Zununi Vahed S, Ostadrahimi A. A systematic review of the anti-obesity and weight lowering effect of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its mechanisms of action. *Phytother Res*. 2018; 32(4):577-585, 10.1002/ptr.5986.
- Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta*. 2006; 368(1-2):1-19.
- Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol*. 2013;87(6):949-68.

Baker J L, Olsen LW, Sorensen TIA. Childhood Body-Mass Index and the Risk of Coronary Heart Disease in Adulthood. *N Engl J Med.* 2007; 357 (23):2329-2337.

Beattie JH, Nicol F, Gordon MJ, Reid MD, Cantlay L, Horgan GW, Kwun IS, Ahn JY, Ha TY. Ginger phytochemicals mitigate the obesogenic effects of a high-fat diet in mice: a proteomic and biomarker network analysis. *Mol Nutr Food.* 2011; 55 (Suppl 2):S203-13.

Beltowski J, Wojcicka G, Gorny D, et al. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51:883-96.

Bertin E, Nguyen P, Guenounou M, Durlach V, Potron G, Leutenegger M. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha (tnf-alpha) are essentially dependent on visceral fat amount in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab.* 2000;2 6:178-182.

Boden G. Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation? *Diabetes.* 2009; 58(3):518-9.

Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011; 18(2):139-43.

Boletim mensal de comércio agrícola. Preços de cereais registram subida desde meados de 2003. Fonte: Boletim Mensal do Comércio Agrícola. 2004; (67): 4.

Bollineni RC, Fedorova M, Blüher M, Hoffmann R. Carbonylated plasma proteins as potential biomarkers of obesity induced type 2 diabetes mellitus. *J Proteome Res.* 2014; 13(11):5081-93.

Bonda DJ, Stone JG, Torres SL, Siedlak SL, Perry G, Kryscio R, Jicha G, Casadesus G, Smith MA, Zhu X, Lee HG. Dysregulation of leptin signaling in Alzheimer disease: evidence for neuronal leptin resistance. *J Neurochem.* 2014; 128(1):162-72.

Bordia A, Verma SK, Srivastava KC. Effect of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) on blood lipids, blood sugar and platelet

aggregation in patients with coronary artery disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997; 56(5):379-84.

Borst SE, Conover CF, Bagby GJ. Association of resistin with visceral fat and muscle insulin resistance. *Cytokine*. 2005; 32(1):39-44.

Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6(1).

Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, et al. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J*. 1999; 13:1231–1238

Boyle KE, Newsom SA, Janssen RC, Lappas M, Friedman JE. Skeletal muscle MnSOD, mitochondrial complex II, and SIRT3 enzyme activities are decreased in maternal obesity during human pregnancy and gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(10):E1601-9.

Bradford PG. Curcumin and obesity. *Biofactors*. 2013; 39(1):78-87.

Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O, Basili S, Cassone-Faldetta M, Ferri C, De Mattia G. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*. 1997; 46(10):1194-8.

Bruce-Keller AJ, Keller JN, Morrison CD. Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792(5):395-400.

Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK, Weller K, Ellacott KL. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain Behav Immun*. 2014; 35:33-42.

Butt MS, Sultan MT. Ginger and its health claims: molecular aspects. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011; 51(5):383-93.

Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 2015; 22(4):658-68.

Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 291(5):1082-8.

Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA, Speizer FE, Manson JE. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 1997; 145(7):614-9.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials.* 2004; 25(5):843-50.

Chen H, Lv L, Soroka D, Warin RF, Parks TA, Hu Y, Zhu Y, Chen X, Sang S. Metabolism of [6]- shogaol in mice and in cancer cells. *Drug Metab Dispos.* 2012; 40(4):742-53.

Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 2001; 276(34):31858-62.

Cherbuin N, Sachdev P, Anstey KJ. Higher normal fasting plasma glucose is associated with hippocampal atrophy: The PATH Study. *Neurology.* 2012; 79(10):1019-26.

Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ, Hannigan BM. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(7):1217-31.

Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD. *Zingiberis rhizoma*: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine.* 2005; 12(9):684-701.

Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas J, Economou M, Papadimitriou L, Stefanadis C. The association between pre-hypertension status and oxidative stress markers related to atherosclerotic disease: the ATTICA study. *Atherosclerosis.* 2007; 192(1):169-76.

Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30(2):139-46.

Collins KH, Hart DA, Seerattan RA, Reimer RA, Herzog W. High-fat/high-sucrose diet-induced obesity results in joint-specific development of osteoarthritis-like degeneration in a rat model. *Bone Joint Res*. 2018; 7(4):274-81.

Connaughton RM, McMorrow AM, McGillicuddy FC, Lithander FE, Roche HM. Impact of anti-inflammatory nutrients on obesity-associated metabolic-inflammation from childhood through to adulthood. *Proc Nutr Soc*. 2016; 75(2):115-24.

Connell D, Sutherland M. A re-examination of gingerol, shogaol and zingerone, the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Aust J Chem*. 1969; 22:1033-43.

Correia ML, Haynes WG, Rahmouni K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes*. 2002; 51(2):439-42.

Cournot M, Marquié JC, Ansiau D, Martinaud C, Fonds H, Ferrières J, Ruidavets JB. Relation between body mass index and cognitive function in healthy middle-aged men and women. *Neurology*. 2006; 67(7):1208-14.

Crane PK, Walker R, Hubbard RA, Li G, Nathan DM, Zheng H, Haneuse S, Craft S, Montine TJ, Kahn SE, McCormick W, McCurry SM, Bowen JD, Larson EB. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med*. 2013; 369(6):540-8.

Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, Amil M, Casanueva FF. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res*. 2013; 47(4):243-56.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004; 25(1):4-7.

De Felice FG. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. *J Clin Invest.* 2013; 123(2):531-9.

de Las Heras N, Valero-Muñoz M, Martín-Fernández B, Ballesteros S, López-Farré A et al. Molecular factors involved in the hypolipidemic- and insulin-sensitizing effects of a ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract in rats fed a high-fat diet. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2017; 42(2):209-215.

De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology.* 2005;146(10):4192-9.

De Souza CT, Frederico MJ, da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, Velloso LA. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. *J Physiol.* 2010; 588(Pt 12):2239-53.

DeFronzo RA. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.* 1988;37:667-87.

Dehghan M, Mentz A, Zhang X, Swaminathan S, Li W, Mohan V et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet.* 2017; 390(10107):2050-2062.

Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1212:E1-E19.

Denver P, Gault VA, McClean PL. Sustained high-fat diet modulates inflammation, insulin signalling and cognition in mice and a modified xenin peptide ameliorates neuropathology in a chronic high-fat model. *Diabetes Obes Metab.* 2018; 20(5):1166-1175.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006 ; 444(7121):881-7.

Dey D, Basu D, Roy SS, Bandyopadhyay A, Bhattacharya S. Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2006; 246(1-2):60-4.

Diaz-Meco MT, Moscat J. The atypical PKCs in inflammation: NF-kappaB and beyond. *Immunol Ver.* 2012;246: 154–167.

Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FR, Almeida FQ, Galhardi CM, Filho JL, Mani F, Novelli EL. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int J Cardiol.* 2008; 124(1):92-9.

Dulloo AG, Jacquet J, Solinas G, Montani JP, Schutz Y. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond).* 2010; 34 Suppl 2:S4-17.

Durakoglugil M, Irving AJ, Harvey J. Leptin induces a novel form of NMDA receptor-dependent long-term depression. *J Neurochem.* 2005; 95(2):396-405.

Durrington P. Dyslipidaemia. *Lancet.* 2003; 362(9385):717-31.

Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell.* 1985; 40(4):747-58.

Ebrahimzadeh Attari V, Ostadrahimi A, Asghari Jafarabadi M, Mehralizadeh S, Mahluji S. Changes of serum adipocytokines and body weight following *Zingiber officinale* supplementation in obese women: a RCT. *Eur J Nutr.* 2016; 55(6):2129-36.

Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 2007; 43(10):1351-71.

Egea J, Fabregat I, Frapart YM, Ghezzi P, Görlach A et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol.* 2017;13:94-162.

El-Abhar HS, Hammad LN, Gawad HS. Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. *J Ethnopharmacol.* 2008; 118(3):367-72.

Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. *Neurobiol Aging.* 2005; 26 Suppl 1:11-6.

Elias PK, Elias MF, Robbins MA, Budge MM. Blood pressure-related cognitive decline: does age make a difference? *Hypertension.* 2004; 44(5):631-6.

Elrokh el-SM, Yassin NA, El-Shenawy SM, Ibrahim BM. Antihypercholesterolaemic effect of ginger rhizome (*Zingiber officinale*) in rats. *Inflammopharmacology.* 2010; 18(6):309-15.

Elpo ERSE, Negrelle RRB. Cadeia produtiva do Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade. *Sci Agrária.* 2006; 7(1-2): 121-2.

Elshater AE, Salman MA, Moussa MA. Effect of ginger extract consumption on levels of blood glucose, lipid profile and kidney functions in alloxan induced-diabetic rats. *EAJBS.* 2009; 2(1): 153-62.

Engin A. Endothelial Dysfunction in Obesity. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:345-379.

Enzinger C, Fazekas F, Matthews PM, Ropele S, Schmidt H, Smith S, Schmidt R. Risk factors for progression of brain atrophy in aging: six-year follow-up of normal subjects. *Neurology.* 2005; 64(10):1704-11.

Esposito K, Ciotola M, Schisano B, Misso L, Giannetti G, Ceriello A, Giugliano D. Oxidative stress in the metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2006; 29(9):791-5.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002; 23:599-622.

Evans WC. Pharmacopoeial and related drugs of biological origin. In Trease and Evans Pharmacognosy, 2002; 15th ed. 277–280.

Ezzati, M. 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 milion participants. *Lancet*. 2016; 387:1377-96.

Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC Jr, Woodgett JR, Mills GB. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(22):11960-5.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(5):3117-32.

Feron VJ1, Til HP, de Vrijer F, Woutersen RA, Cassee FR, van Bladeren PJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat Res*. 1991; 259(3-4):363-85.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)*. 2007; 83(5 Suppl):S192-203.

Fontana L, Klein S, Holloszy JO. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)*. 2010; 32(1):97-108.

Frossi B, De Carli M, Daniel KC, Rivera J, Pucillo C. Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway. *Eur J Immunol*. 2003; 33(8):2168-77.

Friedman JM. Leptin and the regulation of body weight. *Harvey Lect*. 2011; 95:107-36.

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. *J Clin Invest.* 2004; 114(12):1752-61.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316(2):129-39.

Gancheva SM, Zhelyazkova-Savova MD. Vitamin K2 Improves Anxiety and Depression but not Cognition in Rats with Metabolic Syndrome: a Role of Blood Glucose? *Folia Med (Plovdiv).* 2016; 58(4):264-272.

Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, García-Cáceres C, de la Fuente E et al. Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia.* 2014; 62(1):17-25.

Ghasemzadeh A, Jaafar HZE. Effect of salicylic acid application on biochemical changes in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Med. Plants Res.* 2012; 6(5): 790–795.

Gholampour F, Behzadi Ghasabadi F, Owji SM, Vatanparast J. The protective effect of hydroalcoholic extract of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) against iron-induced functional and histological damages in rat liver and kidney. *Avicenna J Phytomed.* 2017; 7(6):542-553.

Giordano F. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Inv.* 2005; 115(3):500-8.

Greenfield JR, Samaras K, Jenkins AB, Kelly PJ, Spector TD, Gallimore JR, Pepys MB, Campbell LV. Obesity is an important determinant of baseline serum C-reactive protein concentration in monozygotic twins, independent of genetic influences. *Circulation.* 2004; 109(24):3022-8.

Govindarajan VS. Ginger--chemistry, technology, and quality evaluation: part 1. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1982; 17(1):1-96.

Goyal RK, Kadnur SV. Beneficial effects of *Zingiber officinale* on goldthioglucose induced obesity. *Fitoterapia*. 2006; 77(3):160-3.

Grzanna R, Lindmark L, Frondoza CG. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J Med Food*. 2005; 8(2):125-32.

Haase J, Weyer U, Immig K, Klötting N, Blüher M, Eilers J, Bechmann I, Gericke M. Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetologia*. 2014; 57(3):562-71.

Habsah M, Amran M, Mackeen MM, Lajis NH, Kikuzaki H, Nakatani N, Rahman AA, Ghafar, Ali AM. Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *J Ethnopharmacol*. 2000; 72(3):403-10.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology Medicine*. University Press. Oxford – NY, 1999.

Hansen D, Dendale P, Beelen M, Jonkers RA, Mullens A, Corluy L, Meeusen R, van Loon LJ. Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *Eur J Appl Physiol* 2010; 109: 397-404.

Haque R, Nazir A. Insulin-degrading enzyme: a link between Alzheimer's and type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014; 13(2):259-64.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956; 11(3):298-300.

Hasenöhrl RU, Nichau CH, Frisch CH, De Souza Silva MA, Huston JP, Mattern CM, Häcker R. Anxiolytic-like effect of combined extracts of *Zingiber officinale* and *Ginkgo biloba* in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1996; 53(2):271-5.

Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005; 366(9492):1197-209.

Hassan HA, El-Gharib NE. Obesity and Clinical Riskiness Relationship: Therapeutic Management by Dietary Antioxidant Supplementation--a Review. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015; 176(3):647-69.

Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27:146-159.

Heydemann A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2016.

Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, Grueter CA, Collins AM, Auizerat B et al. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol Cell*. 2011; 44(2):177-90.

Hissin Pj, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976 Jul;74:214-26.

Hoang Do O, Thorn P. Insulin secretion from beta cells within intact islets: location matters. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015; 42(4):406-14.

Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010; 20(1):72-7.

Horakova D, Stejskal D, Pastucha D, Muchova L, Janout V. Potential markers of insulin resistance in healthy vs obese and overweight subjects. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010;154(3):245-9.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444(7121):860-7.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259(5091):87-91.

Hryhorczuk C, Décarie-Spain L, Sharma S, Daneault C, Rosiers CD, Alquier T, Fulton S. Saturated high-fat feeding independent of obesity alters hypothalamus-pituitary-adrenal axis function but not anxiety-like behaviour. *Psychoneuroendocrinology*. 2017; 83:142-149.

Huang J, Wang Y, Xie Z, Zhou Y, Zhang Y, Wan X. The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies. *Eur J Clin Nutr*. 2014; 68(10):1075-87.

Huang TH, Kota BP, Razmovski V, Roufogalis BD. Herbal or natural medicines as modulators of peroxisome proliferator-activated receptors and related nuclear receptors for therapy of metabolic syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005; 96(1):3-14.

IBGE Brasil. POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional.

International Obesity Task Force (IOTF). *Obesity e Research: The Global Epidemic*. International Association for the Study of Obesity; 2010.

Ippoushi K, Azuma K, Ito H, Horie H, Higashio H. [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. *Life Sci*. 2003; 73(26):3427-37.

Isa Y, Miyakawa Y, Yanagisawa M, Goto T, Kang MS, Kawada T, Morimitsu Y, Kubota K, Tsuda T. 6-Shogaol and 6-gingerol, the pungent of ginger, inhibit TNF-alpha mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 373(3):429-34.

Gorospe EC, Dave JK. The risk of dementia with increased body mass index. *Age Ageing*. 2007; 36(1):23-9.

Greco SJ, Sarkar S, Casadesus G, Zhu X, Smith MA, Ashford JW, Johnston JM, Tezapsidis N. Leptin inhibits glycogen synthase kinase-3beta to prevent tau phosphorylation in neuronal cells. *Neurosci Lett*. 2010; 455(3):191-4.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charao MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high

performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(2):619-24.

Jansson PA, Larsson A, Smith U, Lönnroth P. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. *J Clin Invest.* 1994; 93(1):240-6.

Jeena K, Liju VB, Ramanath V, Kuttan R. Protection against Whole Body  $\gamma$ -Irradiation Induced Oxidative Stress and Clastogenic Damage in Mice by Ginger Essential Oil. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016; 17(3):1325-32.

Jia L, Vianna CR, Fukuda M, Berglund ED, Liu C, Tao C, Sun K, Liu T, Harper MJ, Lee CE, Lee S, Scherer PE, Elmquist JK. Hepatocyte Toll-like receptor 4 regulates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun.* 2014; 5:3878.

Jolad SD, Lantz RC, Chen GJ, Bates RB, Timmermann BN. Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-stimulated PGE2 production. *Phytochemistry.* 2005; 66(13):1614-35.

Jolad SD, Lantz RC, Solyom AM, Chen GJ, Bates RB, Timmermann BN. Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE2 production. *Phytochemistry.* 2004; 65(13):1937-54.

Jung UJ, Choi MS. 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.* 2014; 15(4):6184-223.

Kadnur SV, Goyal RK. Beneficial effects of *Zingiber officinale* Roscoe on fructose induced hyperlipidemia and hyperinsulinemia in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 2005; 43:1161-64.

Kälin S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi CX. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2015; 11(6):339-51.

Kashyap S, Belfort R, Berria R, et al. Discordant effects of a chronic physiological increase in plasma FFA on insulin signaling in healthy subjects with or without a family history of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E537-46.

Kaur G, Kulkarni SK Investigations on possible serotonergic involvement in effects of OB-200G (polyherbal preparation) on food intake in female mice. *Eur J Nutr.* 2001; 40(3):127-33.

Kawada T, Watanabe T, Takaishi T, Tanaka T, Iwai K. Capsaicin-induced beta-adrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1986; 183(2):250-6.

Kazemipoor M, Radzi JWM, Cordell GA, Yaze I. Potential of traditional medicinal plants for treating obesity: a review. *International Conference on Nutrition and Food Sciences.* 2012; 39, 1-6.

Khaliq S, Haider S, Siddiqui M, Sherwani SK, Sajid I, Mustafa S, Ejaz T. Enhancement in spatial and recognition memory functions following long term oral administration of ginger extract in rats. *Pak J Pharm Sci.* 2017; 30(6):2061-2066.

Khan AM, Shahzad M, Raza Asim MB, Imran M, Shabbir A. *Zingiber officinale* ameliorates allergic asthma via suppression of Th2-mediated immune response. *Pharm Biol.* 2015; 53(3):359-67.

Khan NI, Naz L, Yasmeen G. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pak J Pharm Sci.* 2006; 19(1):62-5.

Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem.* 2002; 277(29):25863-6.

Kurauti MA, Costa-Júnior JM, Ferreira SM, Santos GJ, Sponton CHG, Carneiro EM et al. Interleukin-6 increases the expression and activity of insulin-degrading enzyme. *Sci Rep;* 7:46750.

Lai YS, Lee WC, Lin YE, Ho CT<sup>2</sup>, Lu KH, Lin SH, Panyod S, Chu YL<sup>3</sup>, Sheen LY. Ginger Essential Oil Ameliorates Hepatic Injury and Lipid Accumulation in High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Agric Food Chem*. 2016; 64(10):2062-71.

Lancaster GI, Langley KG, Berglund NA, Kammoun HL, Reibe S, Estevez E et al. Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metab*. 2018; 27(5):1096-1110.e5

Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842(3):446-62.

Lee EB, Kim JH, An CW, Kim YJ, Noh YJ, Kim SJ, Kim JE, Shrestha AC, Ham HN, Leem JY, Jo HK, Kim DS, Moon KH, Lee JH, Jeong KO, Kim DK. Longevity and Stress Resistant Property of 6-Gingerol from *Zingiber officinale* Roscoe in *Caenorhabditis elegans*. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018.

Lee JO, Kim N, Lee HJ, Moon JW, Lee SK, Kim SJ, Kim JK, Park SH, Kim HS. [6]-Gingerol Affects Glucose Metabolism by Dual Regulation via the AMPK $\alpha$ 2-Mediated AS160-Rab5 Pathway and AMPK-Mediated Insulin Sensitizing Effects. *J Cell Biochem*. 2015; 116(7):1401-10.

Leite LD, Rocha EDM, Brandão-Neto J. Obesidade: uma doença inflamatória. *Revista Ciência & Saúde*. 2009; 2(2): 85-95.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186:464-78.

Li C, Xu MM, Wang K, Adler AJ, Vella AT, Zhou B. Macrophage polarization and meta-inflammation. *Transl Res*. 2018; 191:29-44.

Li C, Zhou L. Inhibitory effect 6-gingerol on adipogenesis through activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Toxicol In Vitro*. 2015;30(1 Pt B):394-401.

Li L, Chen J, Wang J, Cai D. Prevalence and risk factors of diabetic peripheral neuropathy in Type 2 diabetes mellitus patients with overweight/obese in Guangdong province, China. *Prim Care Diabetes*. 2015; 9(3):191-5.

Li SW, Yu HR, Sheen JM, Tiao MM, Tain YL, Lin IC et al. A maternal high-fat diet during pregnancy and lactation, in addition to a postnatal high-fat diet, leads to metabolic syndrome with spatial learning and memory deficits: beneficial effects of resveratrol. *Oncotarget*. 2017; 8(67):111998-112013.

Li XH, McGrath KC, Nammi S, Heather AK, Roufogalis BD. Attenuation of liver pro-inflammatory responses by *Zingiber officinale* via inhibition of NF-kappa B activation in high-fat diet-fed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012; 110(3):238-44.

Lim S, Moon M, Oh H, Kim HG, Kim SY, Oh MS. Ginger improves cognitive function via NGF-induced ERK/CREB activation in the hippocampus of the mouse. *J Nutr Biochem*. 2014; 25(10):1058-65.

Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res*. 2008; 638(1-2):98-102.

Lois K, Valsamakis G, Mastorakos G, Kumar S. The impact of insulin resistance on woman's health and potential treatment options. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1205:156-65.

Lopes JB, de Oliveira J, Engel DF, de Paula GC, Moreira EL, de Bem AF. Efficacy of Donepezil for Cognitive Impairments in Familial Hypercholesterolemia: Preclinical Proof of Concept. *CNS Neurosci Ther*. 2015; 21(12):964-6.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.

Lu Y, Van Bever HP, Lim TK, Kuan WS, Goh DY, Mahadevan M, Sim TB, Ho R, Larbi A, Ng TP. Obesity, asthma prevalence and IL-4: Roles of inflammatory cytokines, adiponectin and neuropeptide Y. *Pediatr Allergy Immunol.* 2015; 26(6):530-6.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007; 117(1):175-84.

Madamanchi N, Hakim Z, Runge M. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(2):254-67.

Mahmoud, RH, Elnour, WA. Comparative evaluation of the efficacy of ginger and orlistat on obesity management, pancreatic lipase and liver peroxisomal catalase enzyme in male albino rats. *Medical and Pharmacological Science.* 2013; 17, 75-83.

Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2013; 9(1):13-27

Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015; 13(10):423-44.

Mansour MS, Ni YM, Roberts AL, Kelleman M, Roychoudhury A, St-Onge MP. Ginger consumption enhances the thermic effect of food and promotes feelings of satiety without affecting metabolic and hormonal parameters in overweight men: a pilot study. *Metabolism.* 2012; 61(10):1347-52.

Maioli TU, Gonçalves JL, Miranda MC, Martins VD, Horta LS, Moreira TG, Godard AL, Santiago AF, Faria AM. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. *Inflamm Res.* 2016; 65(2):169-78.

Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med*. 2014; 46(6):372-83.

Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2014; 16(1):378-400.

Mary JM, John PK. Agents used in hyperlipidaemia. In: Katzung BG (ed) *Basic and clinical pharmacology*, 8th edn. McGraw Hill Comp, 2000. New York, 581-95.

Mashhadi NS, Ghiasvand R, Askari G, Hariri M, Darvishi L, Mofid MR. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of ginger in health and physical activity: review of current evidence. *Int J Prev Med*. 2013; 4(Suppl 1):S36-42.

Matsuda A, Wang Z, Takahashi S, Tokuda T, Miura N, Hasegawa J. Upregulation of mRNA of retinoid binding protein and fatty acid binding protein by cholesterol enriched-diet and effect of ginger on lipid metabolism. *Life Sci*. 2009; 84(25-26):903-7

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 2008; 57(8):1071-7.

Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*. 2014; 15(5):423-30.

Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 314(1):1-16.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1990;239(1):29-80.

McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature*. 1968; 220(5170):911-2.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969; 244(22):6049-55.

McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51(1):7-18.

Mehdizadeh M, Dabaghian F, Nejehadi A, Fallah-Huseini H, Choopani S, Shekarriz N, Molavi N, Basirat A, Mohammadzadeh Kazorgah F, Samzadeh-Kermani A, Soleimani Asl S. Zingiber Officinale Alters 3,4-methylenedioxymethamphetamine-Induced Neurotoxicity in Rat Brain. *Cell J*. 2012;14(3):177-84.

Mendonça MRT, Silva MAM, Rivera IR, Moura AA . Prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes da cidade de Maceió. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56(2): 192-6.

Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun*. 2014; 42:10-21.

Miller E, Walczak A, Majsterek I, Kędziora J. Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. *J Neuroimmunol*. 2013; 257(1-2):97-101.

Ministério da Saúde. VIGITEL Brasil 2016: Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. Brasil, 2016. [Online]. <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel.pdf>>. Acesso em 27 de jun/2018.

Misawa K, Hashizume K Yamamoto M, Minegishi Y, Hase T, Shimotoyodome A. Ginger extract prevents high-fat diet-induced obesity in mice via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  pathway. *J Nutr Biochem*. 2015; 26(10):1058-67.

Mitterberger MC, Mattesich M, Klaver E, Lechner S, Engelhardt T, Larcher L, Pierer G, Piza-Katzer H, Zwerschke W. Adipokine profile and insulin sensitivity in formerly obese women subjected to bariatric surgery or diet-induced long-term caloric restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010; 65(9):915-23.

Mito N, Hosoda T, Kato C, Sato K. Change of cytokine balance in diet-induced obese mice. *Metabolism*. 2000; 49(10):1295-300.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*. 2003; 289:76-9.

Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gómez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*. 2002;112(4):803-14.

Moraes AL, Almeida EC, Souza LB. Percepções de obesos deprimidos sobre os fatores envolvidos na manutenção da sua obesidade: investigação numa unidade do programa saúde da família no município do Rio de Janeiro. *Revista de Saúde Coletiva*, 2013; 2(1):553-72.

Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5045.

Morrow JD. Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Mar 1;23(3):368-70.

Mukherjee S, Mandal N, Dey A, Mondal B An approach towards optimization of the extraction of polyphenolic antioxidants from ginger (*Zingiber officinale*). *J Food Sci Technol*. 2014; 51(11):3301-8.

Mukherjee K, Chio TI, Sackett DL, Bane SL. Detection of oxidative stress-induced carbonylation in live mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 2015; 84:11-21.

Muoio DM. Revisiting the connection between intramyocellular lipids and insulin resistance: a long and winding road. *Diabetologia*. 2012;55(10):2551-4.

Muoio DM, Newgard CB Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(3):193-205.

Na JY, Song K, Lee JW, Kim S, Kwon J. Pretreatment of 6-shogaol attenuates oxidative stress and inflammation in middle cerebral artery occlusion-induced mice. *Eur J Pharmacol*. 2016; 788:241-247.

Naidu BP, Uddandrao VV, Ravindar Naik R, Suresh P, Meriga B, Begum MS, Pandiyan R, Saravanan G. Ameliorative potential of gingerol: Promising modulation of inflammatory factors and lipid marker enzymes expressions in HFD induced obesity in rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2016; 419:139-47.

Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol*. 2014; 63:250-259.

Nammi S, Sreemantula S, Roufogalis BD. Protective effects of ethanolic extract of *Zingiber officinale* rhizome on the development of metabolic syndrome in high-fat diet-fed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009; 104(5):366-73.

Nascimento H, Rocha S, Rego C, Mansilha HF, Quintanilha A, Santos-Silva A, Belo L. Leukocyte Count versus C-Reactive Protein Levels in Obese Portuguese Patients Aged 6-12 Years Old. *Open Biochem J*. 2010; 4:72-6.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). 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. *Lancet*. 2016; 387(10026):1377-96.

Ness GC, Zhao Z, Lopez D. Inhibitor of cholesterol biosynthesis increase hepatic low density lipoprotein receptor protein degradation. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 325:242-8.

Nitta CF, Orlando RA. Crosstalk between immune cells and adipocytes requires both paracrine factors and cell contact to modify cytokine secretion. *PLoS One*. 2013; 8(10):e77306.

Nowotny K, Jung T, Hohn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015; 5(1):194-222.

Odegaard JI, Chawla A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. *Science*. 2013; 339:172-177.

Okamoto M, Irii H, Tahara Y, Ishii H, Hirao A, Udagawa H, Hiramoto M, Yasuda K, Takanishi A, Shibata S, Shimizu I. Synthesis of a new [6]-gingerol analogue and its protective effect with respect to the development of metabolic syndrome in mice fed a high-fat diet. *J Med Chem* 2011; 54(18):6295-304.

Ortega RM, Rodriguez-Rodriguez E, Aparicio A. Young children with excess of weight show an impaired selenium status. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012;82:121-29.

Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. The evolution of the adipose tissue: A neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;174:1-4.

Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med*. 2012; 18(3):363-74.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11(2):85-97.

Ouyang S, Hsueh H, Kastin AJ, Wang Y, Yu C, Pan W. Diet-induced obesity suppresses expression of many proteins at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014; 34(1):43-51.

Palatty PL, Haniadka R, Valder B, Arora R, Baliga MS. Ginger in the prevention of nausea and vomiting: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013; 53(7):659-69.

Panee J. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine*. 2012; 60:1-12.

Panizza S. *Plantas que curam: cheiro de mato*. São Paulo: IBRASA. 2001; 24:112.

Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*. 2010;b482(3):235-9.

Park G, Oh DS, Lee MG, Lee CE, Kim YU. 6-Shogaol, an active compound of ginger, alleviates allergic dermatitis-like skin lesions via cytokine inhibition by activating the Nrf2 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016; 310:51-59.

Pasinetti GM, Eberstein JA. Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2008;106(4):1503-14.

Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006; 15(2):173-8.

Payne CM, Bernstein C, Bernstein H, Gerner EW, Garewal H. Reactive nitrogen species in colon carcinogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling*. 1999;1(4), 449-67.

Pedroso JA, Silveira MA, Lima LB, Furigo IC, Zampieri TT, Ramos-Lobo AM et al. Changes in Leptin Signaling by SOCS3 Modulate Fasting-Induced Hyperphagia and Weight Regain in Mice. *Endocrinology*. 2016; 157(10):3901-3914.

Pennathur S, Heinecke JW. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(7):955-69.

Pennathur S, Heinecke JW. Mechanisms of oxidative stress in diabetes: Implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Front Biosci* 2004; 9:565-74.

Pereira MM, Haniadka R, Chacko PP, Palatty PL, Baliga MS. *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) as an adjuvant in cancer treatment: a review. *J BUON*. 2011; 16(3):414-24.

Pérez CM, Sánchez H, Ortiz AP. Prevalence of overweight and obesity and their cardiometabolic comorbidities in Hispanic adults living in Puerto Rico. *J Comm Health*, 2013; 38:1140-6.

Perseghin G, Petersen K, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27 Suppl 3:S6-11.

Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, et al. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: Emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:2231-42.

Poon K, Barson JR, Ho HT, Leibowitz SF. Relationship of the Chemokine, CXCL12, to Effects of Dietary Fat on Feeding-Related Behaviors and Hypothalamic Neuropeptide Systems. *Front Behav Neurosci*. 2016; 10:51.

Pulbutr P, Thunchomnang K, Lawa K, Mangkhalathon A, Saenubol P. Lipolytic effects of Zingerone in adipocytes isolated from normal diet fed rats and high fat diet fed rats. *Int J Pharmacol*. 2011; 7:629-34

Raber J. Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. From obesity to memory deficits. *Mol Neurobiol*. 1998; 18(1):1-22.

Rachek LI. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014; 121:267-92.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006; 1(6):3159-65.

Rahimi RS, Landaverde C. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: clinical implications and treatment. *Nutr Clin Pract*. 2013 ;28(1):40-51.

Rahimlou M, Yari Z, Hekmatdoost A, Alavian SM, Keshavarz S5. Ginger Supplementation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. *Hepat Mon.* 2016; 16(1):e34897.

Ríos-Hoyo A, Cortés MJ, Ríos-Ontiveros H, Meaney E, Ceballos G, Gutiérrez-Salmeán G. Obesity, Metabolic Syndrome, and Dietary Therapeutical Approaches with a Special Focus on Nutraceuticals (Polyphenols): A Mini-Review. *Int J Vitam Nutr Res.* 2014; 84(3-4):113-23.

Ríos-Hoyo A, Gutiérrez-Salmeán G. New Dietary Supplements for Obesity: What We Currently Know. *Curr Obes Rep.* 2016; 5(2):262-70.

Rivera P, Pérez-Martín M, Pavón FJ, Serrano A, Crespillo A, Cifuentes M, López-Ávalos MD, Grondona JM, Vida M, Fernández-Llebrez P, de Fonseca FR, Suárez J. Pharmacological administration of the isoflavone daidzein enhances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus. *PLoS One.* 2013; 8(5):e64750.

Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(1):59-69

Ruan H, Hacoheh N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  is obligatory. *Diabetes.* 2002; 51:1319–36.

Rudich A, Kanety H, Bashan N. Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18(8):291-9.

Rebuffé-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C, Rodin J. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1993; 42(11):1405-9.

Reeds DN. Nutrition support in the obese, diabetic patient: the role of hypocaloric feeding. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2009; 25:151-154.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009; 84(21-22):705-12.

Sabia S, Kivimaki M, Shipley MJ, Marmot MG, Singh-Manoux A. Body mass index over the adult life course and cognition in late midlife: the Whitehall II Cohort Study. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(2):601-7.

Sah N, Peterson BD, Lubejko ST, Vivar C, van Praag H. Running reorganizes the circuitry of one-week-old adult-born hippocampal neurons. *Sci Rep.* 2017; 7(1):10903.

Sahebkar A. Potential efficacy of ginger as a natural supplement for nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(2):271-2.

Salles J, Tardif N, Landrier JF, Mothe-Satney I, Guillet C, Boue-Vaysse C, Combaret L, Giraudet C, Patrac V, Bertrand-Michel J, Denis P, Chardigny JM, Boirie Y, Walrand S. TNF $\alpha$  gene knockout differentially affects lipid deposition in liver and skeletal muscle of high-fat-diet mice. *J Nutr Biochem.* 2012; 23(12):1685-93.

Sang S, Hong J, Wu H, Liu J, Yang CS, Pan MH, Badmaev V, Ho CT. Increased growth inhibitory effects on human cancer cells and anti-inflammatory potency of shogaols from *Zingiber officinale* relative to gingerols. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(22):10645-50.

Sani NF, Belani LK, Sin CP, Rahman SN, Das S, Chi TZ, Makpol S, Yusof YA. Effect of the combination of gelam honey and ginger on oxidative stress and metabolic profile in streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:160695.

Santos LRC, Rabinovich EP. Situações Familiares na Obesidade Exógena Infantil do Filho Único. *Saúde Soc.* 2011; 20(2): 507-521.

Saraswat M, Suryanarayana P, Reddy PY, Patil MA, Balakrishna N, Reddy GB. Antiglycating potential of *Zingiber officinalis* and delay of diabetic cataract in rats. *Mol Vis.* 2010; 16: 1525-37.

Saravanan G, Ponmurugan P, Deepa MA, Senthilkumar B. Anti-obesity action of gingerol: effect on lipid profile, insulin, leptin, amylase and lipase in male obese rats induced by a high-fat diet. *J Sci Food Agric*. 2014; 94(14):2972-7.

Sargénius HL, Lydersen S, Hestad K. Neuropsychological function in individuals with morbid obesity: a cross-sectional study. *BMC Obes*. 2017;4:6.

Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 4(9):a008417.

Sartorelli DS, Franco LJ. Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition. *Cad. Saúde Pública*. 2003; 19(1).

Sasson M, Lee M, Jan C, Fontes F, Motta J. Prevalence and associated factors of obesity among Panamanian adults 1982–2010. *PLoS ONE*, 2014; 3:e91689.

Savini I, Catani MV, Evangelista D, et al. Obesity-associated oxidative stress: Strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci*, 2013;14:10497--538.

Saxton JM, Claxton D, Winter E, Pockley AG. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. *Clin Sci (Lond)*. 2003; 104(1):69-77.

Schönfeld P, Wojtczak L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45(3):231-41.

Sekiya K, Ohtani A, Kusano S. Enhancement of insulin sensitivity in adipocytes by ginger. *Biofactors*. 2004; 22:153-56.

Serra D, Mera P, Malandrino MI, Mir JF, Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19(3):269-84.

Shalaby MA, Saifan HY. Some pharmacological effects of cinnamon and ginger herbs in obese diabetic rats. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2014; 3(4):144-9.

Shati AA, Elsaid FG. Effects of water extracts of thyme (*Thymus vulgaris*) and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on alcohol abuse. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(8):1945-9.

Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88(3):241-8.

Shi Z, Li C, Yin Y, Yang Z, Xue H, Mu N. Aerobic Interval Training Regulated SIRT3 Attenuates High-Fat-Diet-Associated Cognitive Dysfunction. *Biomed Res Int.* 2018; 2018:2708491.

Shin NR, Shin IS, Jeon CM, Hong JM, Kwon OK, Kim HS, Oh SR, Hahn KW, Ahn KS. *Zingiber mioga* (Thunb.) Roscoe attenuates allergic asthma induced by ovalbumin challenge. *Mol Med Rep.* 2015; 12(3):4538-4545.

Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007; 132(6):2169-80.

Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27 Suppl 3:S49-52.

Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(5):683-90.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-91.

Smith U. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26:897-904.

Son MJ, Miura Y, Yagasaki K. Mechanisms for antidiabetic effect of gingerol in cultured cells and obese diabetic model mice. *Cytotechnology*. 2015; 67(4):641-52. .

Sonnenburg JL, and Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*. 2016; 535, 56-64.

Spencer SJ, Tilbrook A. The glucocorticoid contribution to obesity. *Stress*. 2011; 14(3):233-46.

Spoto B, Di Betta E, Mattace-Raso F, Sijbrands E, Vilardi A, Parlongo RM, Pizzini P1, Pisano A, Vermi W, Testa A, Cutrupi S, D'Arrigo G, Lonardi S, Tripepi G, Cancarini G, Zoccali C. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in subcutaneous and visceral fat in severe obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014; 24(10):1137-43.

Srinivasan K, Sambaiah K. The effect of spices on cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rat. *Int J Vitam Nutr Res*. 1991; 61(4):364-9.

Srinivasan S, Spear J, Chandran K, Joseph J, Kalyanaraman B, Avadhani NG. Oxidative stress induced mitochondrial protein kinase A mediates cytochrome c oxidase dysfunction. *PLoS One*. 2013; 8(10):e77129.

Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med*. 1990; 9(4):315-25.

Stienstra R, Tack CJ, Kanneganti TD, Joosten LA, Netea MG. The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell Metab*. 2012; 15(1):10-8.

Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*. 2008; 18(11):1085-8.

Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, et al. Role of the Toll-like

receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27:84-91.

Sumida Y, Niki E, Naito Y, Yoshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic Res.* 2013; 47(11):869-80.

Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, Liu X, Zweier JL. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300(1):H388-96.

Tateya S, Kim F, Tamori Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol.* 2013; 4:1-14.

Taveira Magalhães M. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) Brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. Parte 1 – Aspectos gerais, óleo essencial. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos.* 1997; 17(1): 64-9.

Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell.* 2010; 40(6):893-904.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21.

Tzeng TF, Liu IM. 6-gingerol prevents adipogenesis and the accumulation of cytoplasmic lipid droplets in 3T3-L1 cells. *Phytomedicine.* 2013; 20(6):481-7.

Tzeng TF, Liou SS, Chang CJ, Liu IM. 6-gingerol protects against nutritional steatohepatitis by regulating key genes related to inflammation and lipid metabolism. *Nutrients.* 2015; 7(2):999-1020.

Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am.* 2018; 102(1):13-33.

Urbanavičius V, Abalikšta T, Brimas G, Abraitienė A, Gogelienė L, Strupas K. Comparison of changes in blood glucose, insulin resistance indices, and adipokine levels in diabetic and non-diabetic subjects with morbid obesity after laparoscopic adjustable gastric banding. *Medicina (Kaunas).* 2013; 49: 9-14.

Valerio A, Nisoli E. Nitric oxide, interorganelle communication, and energy flow: a novel route to slow aging. *Front Cell Dev Biol.* 2015; 3:6.

Van Wyk BE & Wink M. *Medicinal Plants of the World.* 1st ed.2004. Briza: Pretoria.

Varady KA, Hellerstein MK. Do calorie restriction or alternate-day fasting regimens modulate adipose tissue physiology in a way that reduces chronic disease risk? *Nutr. Rev.* 2008; 66:333–342.

Vijaya Padma V, Arul Diana Christie S, Ramkuma KM. Induction of apoptosis by ginger in HEp-2 cell line is mediated by reactive oxygen species. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007; 100(5):302-7.

Villarroya F; Cereijo R; Gavaldà-Navarro A; Villarroya J; Giralt. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J Intern Med.* 2018; 20.

Vischer TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health.* 2001; 22:355-75.

Vishwakarma SL, Pal SC, Kasture VS, Kasture SB. Anxiolytic and antiemetic activity of *Zingiber officinale*. *Phytother Res.* 2002;16(7):621-6.

Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC; Bressan J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52(3).

Wang J, Ke W, Bao R, Hu X, Chen F. Beneficial effects of ginger *Zingiber officinale* Roscoe on obesity and metabolic syndrome: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2017; 1398(1):83-98.

Wang Q, Huang Y, Qin C, Liang M, Mao X, Li S, Zou Y, Jia W, Li H, Ma CW, Huang Z. Bioactive Peptides from *Angelica sinensis* Protein Hydrolyzate Delay Senescence in *Caenorhabditis elegans* through Antioxidant Activities. *Oxid Med Cell Longev*; 2016:8956981.

Ward MA, Carlsson CM, Trivedi MA, Sager MA, Johnson SC. The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC Neurol.* 2005; 5:23.

Wattanathorn J, Jittiwat J, Tongun T, Muchimapura S, Ingkaninan K. *Zingiber officinale* Mitigates Brain Damage and Improves Memory Impairment in Focal Cerebral Ischemic Rat. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011:429505.

Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19:142–149.

White B. Ginger: an overview. *Am Fam Physician.* 2007; 75(11):1689-91.

White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res.* 1998; 53:119-38.

Wu A, Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. A saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience.* 2003;119(2):365-75.

Wu H, Hsieh MC, Lo CY, Liu CB, Sang S, Ho CT, Pan MH. 6-Shogaol is more effective than 6-gingerol and curcumin in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion in mice. *Mol Nutr Food Res.* 2010; 54(9):1296-306.

Yang G, Zhong L, Jiang L, Geng C, Cao J, Sun X, Liu X, Chen M, Ma Y. 6-gingerol prevents patulin-induced genotoxicity in HepG2 cells. *Phytother Res.* 2011; 25(10):1480-5.

Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med.* 2013;7(1):14-24.

York DA, Thomas S, Greenway FL, Liu Z, Rood JC. Effect of an herbal extract Number Ten (NT) on body weight in rats. *Chin Med.* 2007; 2:10.

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 2002; 277(52):50230-6.

Zeve, J. L. M., Tomaz, C. A. B. Cirurgia metabólica - cura para diabete tipo 2. *Arq Bras Cir Dig.* Artigo de Revisão 2011;24(4):312-317.

Zhu Y, Zhao Y, Wang P, Ahmedna M, Sang S. Bioactive ginger constituents alleviate protein glycation by trapping methylglyoxal. *Chem Res Toxicol.* 2015; 28(9):1842-9.

Zick SM, Djuric Z, Ruffin MT, Litzinger AJ, Normolle DP, Alrawi S, Feng MR, Brenner DE. Pharmacokinetics of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(8):1930-6.

Zilberstein B, Ferreira JA, Carvalho MH, Bussons C, Silveira-Filho AS, Joaquim H, Ramos F. Operação de Scopinaro modificado na falha da banda gástrica, ABCD. *Arq Bras Cir Dig.* 2011;24(2):136-9.

## ANEXO A- Carta de aprovação da CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 30/05/2017.

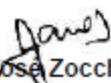
<b>Título do projeto</b>	EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO DE ZINGIBER OFFICINALE SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E DE RESISTÊNCIA À INSULINA EM CAMUNDONGOS SWISS OBESOS
<b>Project title</b>	EFFECTS OF SUPPLEMENTATION WITH ZINGIBER OFFICINALE EXTRACT ON INFLAMMATORY AND INSULIN RESISTANCE PARAMETERS IN SWISS OBESE MICE
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	059/2017-1
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Ricardo Aurino Pinho
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Vanessa Moraes de Andrade, Thaís Fernandes Luciano, Helen Rebelo Sorato, Paulo Roberto Lino da Silva, Gabriel Paulino Luiz, Gabriela Soares de Farias, Ângela Caroline da Luz Beretta, Alana Schraiber Colato

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	12/06/2017 a 05/04/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	48
Idade/Peso	30 dias /20-25g
Gênero	Masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/ceua](http://www.unesc.net/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 30 de maio de 2017.

  
Jairo José Zocche  
Coordenador da CEUA

ANEXO B- Laudo analítico do extrato de *Zingiber officinale*

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Report Date : 26-Oct-16  
 Expiry Date : 19-Oct-18  
 Manufacture Date : 20-Oct-16

Product Name	Ginger Extract 35867	Batch Number	GRE-161020
Botanical Source	<i>Zingiber Officinale</i>	Batch Quantity	800kgs
Plant Part Used	Rhizoma, 100% Natural	Country of Origin	China
Type of Products	Standardized Extract	Active Ingredient Markers	Gingerols
Analysis Items	Specifications	Results	Methods used
Identification	Positive	Conforms	TLC
Appearance	Fine Light Brown Yellow Powder	Conforms	Visual test
Odor & Taste	Characteristic	Conforms	Organoleptic test
Bulk Density	45-55g/100ml	Conforms	ASTM D1895B
Particle Size	95% through 80 Mesh	Conforms	AOAC 973.03
Solubility	Partially Soluble in Water	Conforms	Visual
Assay	NLT 5% Total of Gingerols( 6-gingerdiol, 6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol, 10-gingerol, etc.)	5.2%	HPLC
Loss on Drying	NMT 5.0%	3.39%	5g /105 °C /2hrs
Ash Content	NMT 5.0%	2.15%	2g /525 °C /3hrs
Extract Solvents	Ethanol & Water	Conforms	\
Heavy Metals	NMT 20ppm	Conforms	Atomic Absorption
Arsenic (As)	NMT 2ppm	Conforms	Atomic Absorption
Lead (Pb)	NMT 2ppm	Conforms	Atomic Absorption
Cadmium (Cd)	NMT 1ppm	Conforms	Atomic Absorption
Mercury(Hg)	NMT 0.1ppm	Conforms	Atomic Absorption
666	NMT 0.1ppm	Conforms	USP-GC
DDT	NMT 0.5ppm	Conforms	USP-GC
Acephate	NMT 0.2ppm	Conforms	USP-GC
Methamidophos	NMT 0.2ppm	Conforms	USP-GC
Parathion-ethyl	NMT 0.2ppm	Conforms	USP-GC
PCNB	NMT 0.1ppm	Conforms	USP-GC
Aflatoxins	NMT 0.2ppb	Absent	USP-HPLC
Sterilization Method	High temperature & pressure for a short time of 5~10 seconds		
Microbiological Data	Total Plate Count <10,000cfu/g	Conforms	GB 4789.2
	Total Yeast & Mold <1,000cfu/g	Conforms	GB 4789.15
	E. Coli to be absent	Absent	GB 4789.3
	Staphylococcus to be absent	Absent	GB 4789.10
	Salmonella to be absent	Absent	GB 4789.4
Packing and Storage	Packed in fiber drum, LDPE bag inside. Net weight: 25kg/drum.		
Shelf Life	Keep away from moisture, strong heat and sunlight. 2 years if sealed and stored in the recommended conditions.		

Inspector:

杨华

Supervisor:

李新英



FC=103