

EFEITOS DA INGESTÃO DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) SOBRE O MÚSCULO GASTROCNÊMIO DE RATOS WISTAR OBESOS

Josué Alves Conceição Júnior (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Carla Nazaré Magalhães Parra (Doutoranda/PBC/UEM), Suellen Cristina dos Passos (Mestranda/PBC/UEM), Maria Raquel Marçal Natali (DCM/UEM), Samara Cristina Dossena (Coorientador), Fernanda Losi Alves de Almeida (Orientadora).
E-mail: flaalmeida@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/ Morfologia

Palavras-chave: Obesidade; Compostos Naturais; Músculo Gastrocnêmio.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da ingestão de erva-mate (EM) sobre o músculo gastrocnêmio de ratos *Wistar* obesos. Os animais foram divididos nos grupos: CN: alimentação com ração padrão e água *ad libitum* dos 25 aos 125 dias de idade; CN-EM: alimentação com ração padrão (25 aos 125 dias) e extrato aquoso de EM *ad libitum* dos 75 aos 125 dias; DRCS: alimentação com dieta rica em carboidratos simples (DRCS) (25 aos 125 dias) e água *ad libitum*; DRCS-EM: alimentação com DRCS (25 aos 125 dias) e EM *ad libitum* dos 75 aos 125 dias; DRCS-OR: alimentação com DRCS (25 aos 125 dias) e Orlistat (10 mg/kg) dos 75 aos 125 dias; DRCS-RC: alimentação com DRCS (25 aos 125 dias) e ração padrão com restrição calórica (RC) de 20% dos 75 aos 125 dias. Após 125 dias, os animais foram eutanasiados por sobrecarga anestésica. Cortes histológicos transversais do músculo gastrocnêmio foram corados em HE para avaliar a morfologia e morfometria das fibras. Alterações histológicas no músculo gastrocnêmio foram observadas apenas nos grupos DRCS, DRCS-EM e DRCS-OR. Nos grupos DRCS+EM, DRCS+OR e DRCS+RC, o diâmetro das fibras foi menor em comparação ao grupo DRCS. A EM e o OR atenuaram o aumento do diâmetro das fibras, mas não as alterações morfológicas, no músculo gastrocnêmio, promovidas pela obesidade. Já a RC reverteu tanto as alterações morfológicas e quanto morfométricas promovidas pela obesidade.

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada a desordem nutricional mais grave da atualidade e sua incidência vem aumentando anualmente. Muitas pesquisas têm sido realizadas para a identificação de compostos naturais que promovam prevenção e tratamento para essa condição. Entre eles, está a erva-mate (EM) (*Ilex paraguariensis*), que apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória, digestiva, diurética,

hipocolesterolêmica, hepatoprotetora, quimiopreventiva, com reconhecido potencial para redução do peso e do percentual de gordura (Mesquita *et al.*, 2021).

A obesidade apresenta impacto negativo sobre os músculos esqueléticos, promovendo inflamação, discreta necrose das fibras, além de atrofia, redução na capacidade regenerativa e na força muscular (Wu; Ballantyne, 2017).

Considerando os potenciais efeitos benéficos da EM sobre a obesidade, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos desse composto natural sobre as possíveis alterações musculares decorrentes da obesidade em ratos *Wistar* alimentados com dieta hipercalórica rica em carboidratos simples (DRCS). Os resultados obtidos foram comparados aos observados em animais que receberam Orlistat ou que foram submetidos à RC, medidas bem estabelecidas contra os efeitos da obesidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA-UEM), sob parecer nº 1316051022. Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade, que foram mantidos em condições padrões de biotério. Os animais foram divididos nos grupos (n=10 por grupo): CN: alimentação com ração padrão dos 25 aos 125 dias de idade e água *ad libitum*; CN-EM: alimentação com ração padrão dos 25 aos 125 dias e extrato aquoso de EM *ad libitum* dos 75 aos 125 dias; DRCS: alimentação com DRCS dos 25 aos 125 dias e água *ad libitum*; DRCS-EM: alimentação com DRCS dos 25 aos 125 dias e extrato aquoso de EM *ad libitum* dos 75 aos 125 dias; DRCS-OR: alimentação com DRCS dos 25 aos 125 dias e Orlistat (10 mg/kg por gavagem) dos 75 aos 125 dias; DRCS-RC: alimentação com DRCS dos 25 aos 125 dias e ração padrão com restrição calórica de 20% dos 75 aos 125 dias. O extrato aquoso de EM foi preparado por meio da infusão de 70 g das folhas verdes em 1 L de água a 80°C. Após filtração da mistura, o extrato foi administrado diariamente aos grupos CN-EM e DRCS-EM entre 17 e 18 horas. Após 100 dias de experimento, os animais foram eutanasiados por sobrecarga anestésica. Os músculos gastrocnêmio foram dissecados e fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80 °C. Cortes histológicos transversais das amostras (10 µm de espessura) foram obtidos em criostato e submetidos à coloração Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação da morfologia e morfometria das fibras musculares. Os cortes histológicos foram analisados em microscopia óptica e a análise morfométrica foi realizada pela determinação do menor diâmetro de 200 fibras musculares por animal por grupo experimental. A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prisma v.8. A distribuição normal dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA *one-way*), seguida pelo pós-teste de Tukey para comparação de médias. O valor de *p* menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados biométricos referentes ao ganho de peso, porcentagem de gordura visceral e índice de massa corporal (IMC) mostraram que a DRCS foi efetiva para indução da obesidade nos animais dos grupos DRCS, DRCS-EM, DRCS-OR e DRCS-RA quando comparados ao controle (CN) ou controle erva-mate (CN-EM) (dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa).

Nos cortes histológicos de amostras do músculo gastrocnêmio dos animais controles (grupos CN e CN-EM) observou-se morfologia preservada das fibras musculares que se mostraram poligonais, acidófilas, multinucleadas, com núcleos periféricos, não sendo observados sinais de inflamação. Observou-se o perimísio, constituído por tecido conjuntivo denso não-modelado, envolvendo feixes de fibras musculares, e o endomísio ao redor de fibras musculares individuais.

Nos animais obesos dos grupos DRCS, DRCS-EM e DRCS-OR foram observados focos de inflamação no músculo gastrocnêmio, caracterizados por perimísio e endomísio aparentemente aumentados, sugerindo edema. Adicionalmente, foi observada uma maior celularidade no endomísio. Fibras necróticas ocasionais foram evidenciadas próximas às fibras musculares de morfologia normal. Corroborando com nossos achados, já é bem estabelecido que o tecido muscular estriado esquelético desenvolve inflamação de baixo grau na obesidade. Este tipo de inflamação depende do aumento da infiltração de células do sistema imune e do fenótipo pró-inflamatório do tecido adiposo localizado nos músculos esqueléticos (Wu; Ballantyne, 2017).

No grupo DRCS-RC, a morfologia do músculo gastrocnêmio foi semelhante à dos animais controles (CN e CN-EM). No nosso estudo, a restrição calórica de 20% nos animais obesos pode ter atenuado a resposta inflamatória no músculo gastrocnêmio. Corroborando com os nossos achados, Hernández-Saavedra *et al.* (2021) demonstraram que a restrição calórica de 25%, após um período de três meses com dieta rica em gordura, foi capaz de reduzir a inflamação do músculo esquelético em ratos machos pela repressão da expressão da miocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral (TNF).

Já o diâmetro das fibras musculares no grupo CN+EM foi maior em comparação ao controle (CN). Nossos resultados sugerem que as funções anti-inflamatória e antioxidante da EM (Mesquita *et al.*, 2021) contribuíram para um melhor *turnover* proteico no músculo gastrocnêmio, promovendo a manutenção da massa muscular no grupo CN-EM em comparação aos animais controles que não receberam esse composto (CN).

Nos animais obesos do grupo DRCS, o diâmetro das fibras musculares foi maior em relação ao do grupo controle (CN). O aumento no diâmetro das fibras é um processo relevante para quadros patológicos, ou seja, é um mecanismo de defesa para a musculatura que contém alguma disfunção (Schiaffino *et al.*, 2021). Além disso, o impacto da obesidade na massa e função muscular ainda é contraditório, uma vez que os resultados são divergentes.

Nos grupos DRCS+EM e DRCS+OR, o diâmetro das fibras do músculo gastrocnêmio foi menor em comparação ao observado no grupo DRCS. Esses dados sugerem que o consumo de EM e de OR parece ter atenuado o aumento do

diâmetro das fibras observado no grupo DRCS. No entanto, a EM e o OR não reverteram as alterações morfológicas (focos de inflamação e de necrose) do músculo gastrocnêmio que foram promovidas pela obesidade induzida por DRCS. Por outro lado, a RC parece ter atenuado as alterações morfométricas e morfológicas promovidas pela obesidade, uma vez que o diâmetro das fibras musculares nesse grupo (DRCS+RC) foi menor em comparação ao grupo DRCS e a morfologia muscular foi semelhante à dos animais controles.

CONCLUSÕES

A EM e o OR reverteram o aumento no diâmetro das fibras, mas não as alterações histológicas no músculo gastrocnêmio causados pela obesidade (grupo DRCS). Já a RC de 20% foi eficiente em reverter tanto as alterações morfológicas como o aumento no diâmetro das fibras musculares observados no grupo DRCS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa PIBIC/CNPq-FA-UEM por ter concedido a bolsa para esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, D.; MOODY, L.; TANG, X.; GOLDBERG, Z.J.; WANG, A.P.; CHEN, H.; PAN, Y.X. Caloric restriction following early-life high fat-diet feeding represses skeletal muscle TNF in male rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 91, e.108598, 2021. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108598.

MESQUITA, M.; SANTOS, E.; KASSUYA, C.A.; SALVADOR, M.J. Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 279, e.114401, 2021. doi: 10.1016/j.jep.2021.114401.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C.; AKIMOTO, T.; BLAAUW, B. Molecular mechanisms of skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 8, p. 169–183, 2021. doi:10.3233/JND-200568.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, p. 43-54, 2017. doi: 10.1172/JCI88880.