

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO GUARANÁ NOS DISTÚRBIOS
METABÓLICOS E NOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS
ASSOCIADOS À LIPOTOXICIDADE**

TESE DE DOUTORADO

Cristina da Costa Krewer

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO GUARANÁ NOS DISTÚRBIOS
METABÓLICOS E NOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS
ASSOCIADOS À LIPOTOXICIDADE**

por

Cristina da Costa Krewer

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em
Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria,
como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica Toxicológica.**

Orientadora: Ivana Beatrice Manica da Cruz

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**Universidade Federal De Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de

Doutorado

**EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO GUARANÁ NOS DISTÚRBIOS
METABÓLICOS E NOS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS
ASSOCIADOS À LIPOTOXICIDADE**

elaborada por
Cristina da Costa Krewer

**como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Ivana Beatrice Manica da Cruz (Orientadora, UFSM)

Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares (UFSM)

Profa. Dra. Patricia Gomes (UNIFRA)

Prof. Dr. Ricardo Brandão (UFSM)

Prof. Dr. Roberto Christ Vianna dos Santos (UNIFRA)

Santa Maria, 15 de março de 2012.

*A Deus
Pelo Seu amor infinito*

*Aos meus queridos pais Eunice e Pedro
Pelo exemplo de vida e doação*

*À minha irmã Carina
Pelo companheirismo em todos os momentos*

AGRADECIMENTOS

A Deus que, com Sua suprema bondade e Sua infinita misericórdia, guia meus caminhos, tornando-me a cada dia disposta a mostrar que a verdadeira alegria só provém Dele. A Ele que me protege em todos os momentos, me concede discernimento e persistência, iluminando meus pensamentos e me capacitando para a realização desse trabalho. Obrigada Senhor.

Aos meus pais Eunice e Pedro por oportunizarem meus estudos, por todos os valores que me ensinaram, pelo amor incondicional e pelo suporte e incentivo em todos os momentos. Porque por mim fazem tudo, muitas vezes abrindo mão das próprias vontades. À minha irmã Carina pelo apoio, amor e momentos de alegria proporcionados durante a concretização desse trabalho. A vocês, meus amores, muito obrigada!

À querida e doce Prof^a. Ivana, que tem uma mente brilhante e um coração gigante. Minha eterna gratidão pela oportunidade, orientação, confiança, disposição, atenção e ensinamentos recebidos em todos os momentos da execução desse trabalho.

À minha grande amiga Prof^a. Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, a quem tenho muito a agradecer. Pelo apoio, carinho, cuidado, conselhos, ensinamentos... Por ser uma pessoa extraordinária, e não medir esforços para me auxiliar. Pelas risadas e momentos sempre agradáveis que passamos juntas.

Ao meu querido tio e Prof. Mateus Matiuzzi da Costa, que me incentivou desde sempre... Pelo carinho, cuidados e atenção. Por todo o conhecimento que com amor, generosidade e paciência, divide comigo em todos os momentos.

À minha avó Anita e à memória dos avós Nestor, Olmiro e Olinda, aos tios, primos e demais familiares e amigos pelas orações, pelo exemplo de vida e incentivo, sem os quais esse trabalho não seria possível.

À Prof^a. Agueda Castagna de Vargas, por ter sido minha primeira orientadora, pela amizade, carinho, auxílio e incentivo que prontamente concede sempre que necessito.

Aos meus queridos amigos Profs. Sônia de Avila Botton, Arthur dos Santos Mascioli e Marcelo Leite da Veiga, que gentilmente contribuíram com sugestões nos manuscritos, pelo carinho, estímulo e amizade.

Ao Prof. Dr. Euler Esteves Ribeiro e sua equipe da Universidade Aberta da Terceira Idade e da Universidade do Estado do Amazonas, por todo apoio recebido na coleta dos materiais e dados dessa pesquisa.

A todos os colegas do Laboratório de Biogenômica pela amizade e suporte na execução do trabalho.

Aos colegas Professores do Departamento de Morfologia, pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da UFSM, em especial à Angélica, Marcia e Elvadir pela disposição e dedicação com que realizam seu trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica e seus professores pela oportunidade de desempenhar este trabalho e pela contribuição na minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação e Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro.

“A melhor maneira que o homem dispõe para
se aperfeiçoar é aproximar-se de Deus.”
(Pitágoras)

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Efeito *in vivo* e *in vitro* do guaraná nos distúrbios metabólicos e nos biomarcadores inflamatórios associados à lipotoxicidade

AUTORA: Cristina da Costa Krewer

ORIENTADORA: Ivana Beatrice Manica da Cruz

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, março de 2012

A prevalência mundial da obesidade tem aumentado consideravelmente, nas últimas décadas. Os indivíduos obesos apresentam riscos de desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica (SM) e câncer. Além disso, a obesidade tem sido relacionada a alterações oxidativas e a uma inflamação crônica de baixo grau que atinge inicialmente o tecido adiposo e posteriormente o organismo de forma sistêmica. O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta nativa da Amazônia, que possui compostos bioativos que parecem atuar no metabolismo energético, oxidativo e inflamatório. Entretanto, estudos epidemiológicos sobre as consequências do seu consumo na saúde humana são ainda incipientes. Sendo assim, este trabalho avaliou o efeito *in vivo* da ingestão habitual de guaraná pelos indivíduos testados, observando a ocorrência de obesidade, diabetes tipo 2 e SM, bem como o comportamento *in vitro* dos marcadores bioquímicos e inflamatórios associados a essas doenças. Em um primeiro estudo caso-controle foram incluídos 637 idosos divididos no grupo dos que ingeriam guaraná habitualmente (GI: n = 421) e dos que não ingeriam a planta (NG: n = 239). A prevalência de hipertensão, obesidade e SM foi menor no grupo GI do que no NG. Além disso, nas mulheres foram observados níveis mais baixos de colesterol total, LDL-colesterol e AOPP (produtos de oxidação proteica avançada) no grupo GI. Já os homens desse grupo mostraram menores valores de circunferência abdominal. Em um segundo estudo, foi utilizado um protocolo *in vitro* para avaliação do efeito do guaraná nos níveis de marcadores inflamatórios. Células mononucleares periféricas (PBMCs) foram tratadas com e sem guaraná (5 µg/ml), além de glicose (15 mM) e insulina (1 mU/mL). Foram avaliados ainda, *in vivo*, os níveis plasmáticos de citocinas em indivíduos saudáveis suplementados com guaraná (90 mg/dia) durante 14 dias. Tanto no ensaio *in vitro*, como no *in vivo* foi observada uma diminuição nos níveis das citocinas pró-inflamatórias: IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ e aumento da anti-inflamatória IL-10. Os resultados deste trabalho demonstram o efeito protetor do guaraná contra a obesidade, hipertensão e SM, bem como sua atuação nas rotas oxidativas e inflamatórias associadas a esses processos.

Palavras-chave: Anti-inflamatório, Citocinas, Diabetes tipo 2, Distúrbios metabólicos, Obesidade, *Paullinia cupana*.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

The *In vivo* and *in vitro* effect of guaraná on metabolic diseases and inflammatory markers associated to lipotoxicity

AUTHOR: Cristina da Costa Krewer

ADVISOR: Ivana Beatrice Manica da Cruz

DATE AND PLACE OF DEFENSE: Santa Maria, march, 2012

The worldwide prevalence of obesity has increased severely in recent decades. Obese people have risk of developing insulin resistance, type 2 diabetes, dyslipidemia, cardiovascular disease, metabolic syndrome (MS) and cancer. In addition, obesity has been related to oxidative changes and a low-grade chronic inflammation that initially affects adipose tissue and later the others organs and systems. Guarana (*Paullinia cupana*) is a native plant from the Amazon, Brazil which has bioactive compounds that appear to act in energy metabolism, oxidative and inflammatory processes. However, epidemiological studies about guaraná consumption effect are still incipient. Thus, this study investigated the *in vivo* effect of habitual intake of guarana on the individuals health, observing the occurrence of obesity, type 2 diabetes and MS, as well as the markers associated with these diseases, as well as their behavior in experiments *in vitro*. In a first case-control study included 637 elderly were divided among those who habitually drank guaraná (GI: n = 421) and those who did not ingest the plant (NG, n = 239). The prevalence of hypertension, obesity and MS was lower in GI, than in the NG. In addition, in GI women were observed lower levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and AOPP (products of advanced protein oxidation). The men in this group showed lower values of waist circumference. In a second study, we used an *in vivo* protocol for evaluation the guaraná effect on inflammatory markers levels. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were treated with and without guaraná (5 µg/ml), besides glucose (15 mM) and insulin (1 mU/ml). Were also evaluates the cytokine plasma levels in subjects supplemented with guaraná (90 mg/day) for 14 days. Both the *in vitro* and *in vivo* analyses demonstrated a decrease in the proinflammatory cytokines: IL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ and an increase in antiinflammatory IL-10. The results demonstrate the protective guaraná effect against obesity, hypertension and MS, as well as his performance on the oxidative and inflammatory processes associated with these.

Key-Words: Anti-inflammatory, Cytokines, Metabolic disease, Obesity, Type 2 diabetes, *Paullinia cupana*.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	DESENVOLVIMENTO	13
2.1	Doenças metabólicas e a inflamação	13
2.1.1	Epidemiologia das doenças metabólicas	15
2.1.2	O tecido adiposo	18
2.1.3	Fisiopatologia da obesidade associada à SM e inflamação	19
2.1.3.1	Sinais pró-inflamatórios locais no tecido adiposo	22
2.1.3.2	Efeitos sistêmicos da inflamação associada às doenças metabólicas	27
2.1.3.3	Sinais inflamatórios da resistência à insulina	29
2.2	Atividade biológica do guaraná (<i>Paullinia cupana</i>)	31
2.2.1	Composição química do guaraná	32
2.2.2	Propriedades funcionais do guaraná	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	36
4.1	Artigo 1	37
4.1.1	Ingestão Habitual de Guaraná e Doenças Metabólicas: um estudo epidemiológico de uma população idosa da Amazônia	38
4.2	Artigo 2	46
4.2.1	Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do Guaraná (<i>Paullinia cupana</i> Mart.) nos níveis de citocinas em humanos	47
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

Devido às modificações no estilo de vida da população, a ocorrência mundial da obesidade tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, de forma que esta enfermidade tem sido considerada pandêmica (HOTAMISLIGIL, 2006). Conseqüentemente, as várias comorbidades associadas a ela têm constituído um relevante problema de saúde pública, que implica em alta carga de morbimortalidade nos indivíduos afetados (GOTTLIEB et al., 2008).

Os indivíduos obesos apresentam maiores riscos de desenvolvimento de resistência à insulina, diabetes tipo 2, dislipidemia, doenças cardiovasculares e câncer. Muitas dessas doenças quando presentes em um mesmo indivíduo constituem a síndrome metabólica (SM) (NIH, 2001).

Vários estudos têm demonstrado o importante papel da inflamação no desenvolvimento da obesidade, diabetes tipo 2 e aterosclerose, uma vez que várias citocinas e outros mediadores inflamatórios são expressos de modo contínuo nestas enfermidades (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005; HOTAMISLIGIL, 2006; CHUDEK; WIECEK, 2006; ROCHA; FOLCO, 2011). Entretanto, essa inflamação é considerada de baixo grau ou crônica, sendo desencadeada basicamente pela desorganização na homeostase do tecido adiposo oriunda do excesso calórico ingerido que induz ao aumento no número e no tamanho dos adipócitos (WELLEN; HOTAMISLIGIL et al., 2005). Assim, estudos atuais buscam investigar a etiologia e aspectos da patogenia da obesidade, bem como potenciais fatores de proteção incluindo a ação de alimentos e compostos fitoterápicos (BASTOS et al., 2009; ROSA et al., 2012).

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta que apresenta várias propriedades biológicas já descritas, como a atividade antioxidante (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005; JIMOH et al., 2007), antimicrobiana (FONSECA et al., 1994), antialérgica (JIPPO et al., 2009), antiplaquetária (HALLER et al., 2005; RAVI et al., 2008), antitumoral (FUKUMASU et al., 2008), antifatigante (KENNEDY et al., 2004; HASKELL et al., 2007; COSTA et al., 2009) e anti-obesogênica (LIMA et al., 2005). A variedade *sorbillis* da espécie *P. cupana* é nativa da Amazônia e extensamente utilizada em bebidas pela população local.

Uma vez que o guaraná possui compostos bioativos que parecem atuar no metabolismo energético, oxidativo e inflamatório, investigações sobre o seu potencial efeito na obesidade e na lipotoxicidade associada a esta morbidade tornam-se pertinentes. Estas pesquisas devem incluir estudos em indivíduos que ingerem habitualmente guaraná, visando à verificação das suas atividades biológicas traduzidas em benefícios à saúde da comunidade, por meio da identificação da ocorrência de obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão arterial e SM nessas pessoas (CORREIA, 1984). Da mesma forma, são importantes as investigações que avaliem o efeito do guaraná em marcadores bioquímicos associados a estas enfermidades, os quais podem ser úteis para posteriores pesquisas sobre os mecanismos de ação dos compostos bioativos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Doenças metabólicas e a inflamação

Atualmente as doenças metabólicas têm sido consideradas particularmente importantes, devido ao grau de comprometimento sistêmico e ao risco cardiometabólico que representam para os indivíduos acometidos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os distúrbios cardiovasculares são a principal causa de morte em todo o mundo (WHO, 2011).

A origem das doenças metabólicas pode ser explicada pelas constantes transformações no estilo de vida da humanidade, uma vez que seus hábitos e costumes vêm se modificando consideravelmente, enquanto o seu genoma permanece praticamente inalterado (FUTUYMA, 2003). Atualmente, as pessoas ingerem alimentos hipercalóricos em quantidades excessivas e apresentam níveis de estresse cotidiano elevados, aliados à baixa atividade física. Essas alterações de hábitos, bem como o aumento da expectativa de vida, não acompanhadas de mudanças genéticas e fisiológicas, provavelmente estão entre os principais fatores promotores das doenças crônicas (GOTTLIEB et al., 2008).

O excesso calórico ingerido, associado ao sedentarismo, tende a ficar indeterminadamente acumulado no organismo sob a forma de gordura, resultando em alterações metabólicas oxidativas e inflamatórias que conduzem ao aumento acelerado da prevalência e incidência de doenças crônicas, como a obesidade, o diabetes tipo 2 e a síndrome metabólica (SM) (EATON; KONNER, 1985; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

A sobrevivência das espécies está associada a dois mecanismos fundamentais: a capacidade do organismo suportar um balanço energético negativo e a sua habilidade de se defender contra agentes patogênicos. Sendo assim, alguns estudos têm sugerido a íntima associação entre os sistemas imune e metabólico

fazendo com que respostas inflamatórias possam ser nutricional ou metabolicamente induzidas (BEUTLER, 2004; SHI et al., 2006).

Esta hipótese tem base no fato de que em organismos mais simples como os do gênero *Drosophila* (mosca-das-frutas), os processos imunes e metabólicos são controlados pelo mesmo órgão. Já no ser humano, eles estão divididos no fígado (principalmente), no sistema hematopoiético e no sistema imune (LECLERC; REICHHART, 2004). Além disso, tanto o fígado como o tecido adiposo apresentam células metabólicas (hepatócitos e adipócitos) muito próximas às células imunes (células de Kupffer e macrófagos). Assim, o ambiente se torna adequado para uma interação contínua e dinâmica entre as respostas imunes e metabólicas, as quais podem ser extrapoladas para outras regiões corporais, como as ilhotas pancreáticas, as células musculares e o organismo de forma sistêmica (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005; SHOELSON et al., 2006).

Adicionalmente, durante uma resposta imunológica há necessidade de uma reorganização na distribuição dos recursos energéticos do organismo, portanto é benéfico que a inflamação estimule rotas bioquímicas anabólicas mediadas pela insulina. Isto porque, implica no rápido crescimento das células imunes, principalmente dos macrófagos, necessitando de uma grande demanda energética oriunda da glicose e do glicogênio. Entretanto, esses sistemas não estão adaptados para o excesso de nutrientes contínuo que a população ingere atualmente, causando prejuízos tanto imunes, como metabólicos (IOZZO, 2009).

Por tudo isso, a ligação entre os sistemas metabólico e imune deve estar em constante equilíbrio. Uma exposição prolongada do organismo a patógenos promove uma disfunção metabólica. Da mesma forma, uma quebra crônica na homeostase metabólica (supernutrição ou desnutrição) origina respostas imunes alteradas que expõem o organismo a um processo constante de inflamação (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

2.1.1 Epidemiologia das doenças metabólicas

A obesidade é um distúrbio associado a altos níveis de morbimortalidade, pois afeta o organismo de modo sistêmico, favorecendo o desenvolvimento de disfunções graves e limitantes. Hipócrates já descrevia: “a obesidade não é uma doença por si só, mas um abrigo para várias” (HASLAM; JAMES, 2005). Esta enfermidade foi caracterizada no século XIX, pelo acúmulo de gordura em quantidades superiores às normais para uma determinada idade, altura e gênero (GREENWAY; SMITH, 2000), de modo que pode ser definida como o excesso de tecido adiposo (YANG et al., 2007). Atualmente, esse excesso de lipídeos tem sido associado à toxicidade do tecido, em um fenômeno chamado de lipotoxicidade (VIGOROUX et al., 2011).

Este distúrbio tem aumentado em altas proporções no mundo inteiro, sendo que no ano de 2000 cerca de um bilhão de indivíduos apresentavam sobrepeso e havia 300 milhões de obesos (WHO, 2000). No período de 10 anos, entre 2005 e 2015, a OMS estima um aumento de 75% dos casos de obesidade, o que significará a ocorrência de 2,3 bilhões de indivíduos com sobrepeso e 700 milhões de obesos. Portanto, esta enfermidade tem caráter pandêmico, estando entre as principais doenças que já acometeram a humanidade devido às suas graves consequências e ao seu tempo de persistência (já dura décadas) (WHO 2011).

A obesidade foi considerada no ano de 2000 a principal causa de morte prematura capaz de ser evitada nos Estados Unidos, ultrapassando o tabagismo (MISRA; KHURANA., 2008). Pesquisas mostram que no Brasil, 15% da população é obesa, com prevalência maior nas mulheres (15,5%) do que nos homens (14,4%). Além disso, 48% da população do país apresenta sobrepeso. O Acre, O Rio de Janeiro e o Ceará, são os estados cujas capitais mostram os maiores índices de sobrepeso (55, 53 e 52%, respectivamente). Em Porto Alegre, 51% da população apresenta sobrepeso, enquanto em Manaus este índice está em 50% (BRASIL, 2010).

Para determinação do estado nutricional da população, o índice de massa corporal (IMC) tem sido atualmente o parâmetro mais utilizado pela OMS. O IMC é calculado pela relação entre o peso corporal (em quilogramas) e o quadrado da

altura (em metros). Indivíduos normais apresentam IMC menor que $24,9 \text{ kg/m}^2$; pessoas com sobrepeso têm IMC entre 25 kg/m^2 e $29,9 \text{ kg/m}^2$ e os obesos mostram valores superiores a 30 kg/m^2 (WHO, 2000). Algumas exceções a esses valores de referência ocorrem para atletas, nos quais a massa magra (muscular) é maior do que a quantidade de tecido adiposo (BJØRNDAL et al., 2011)

Para minimizar o efeito da massa magra no cálculo do IMC a medida da circunferência abdominal pode ser utilizada adicionalmente, visando estimar os riscos de desenvolvimento de doenças associadas à obesidade, como as cardiovasculares (JANSSEN et al., 2002). Há evidências de que, se analisados conjuntamente, a medida da circunferência abdominal e do IMC mostram-se mais eficientes para estimativa da quantidade de tecido adiposo abdominal do que quando avaliados isoladamente (BJØRNDAL et al., 2011).

Até alguns anos, a obesidade era mais frequentemente observada nos países desenvolvidos, uma vez que naqueles em desenvolvimento, a principal preocupação era a desnutrição. Como o poder aquisitivo da população vem aumentando nesses locais, os indivíduos adotam estilos de vida caracterizados pela ampliação no consumo de energia e redução de gasto calórico. Sendo assim, a obesidade faz parte do que contemporaneamente é denominado “Síndrome da Civilização”, pois está diretamente relacionada à superalimentação rica em gorduras e carboidratos e ao sedentarismo do mundo industrial, panorama completamente diferenciado do contexto histórico humano (GOTTLIEB et al., 2008).

Estudos epidemiológicos, *in vitro* e em modelos experimentais sugerem que a etiologia da obesidade é multifatorial, existindo fenótipos mais fortemente relacionados com alterações genéticas e outros com interações genético-ambientais (YANG et al., 2007). Segundo o banco de dados denominado “Obesity Gene Map Database” a influência genética para a obesidade varia entre seis e 85% nas diversas populações do mundo, existindo mais de 200 genes relacionados. Uma vez que se trata de uma morbidade complexa e de alto impacto negativo na saúde, estudos sobre os fatores causais ou as consequências do aumento do tecido adiposo no organismo são de grande interesse científico e clínico (RANKINEN et al., 2006).

Um dos principais efeitos da obesidade na saúde humana está relacionado ao risco que indivíduos obesos possuem de apresentar alterações bioquímicas e fisiológicas relacionadas ao desenvolvimento do diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares, uma vez que o IMC (índice de massa corporal) está proporcionalmente associado ao desenvolvimento desses distúrbios (EZZATI et al., 2002). Muitas destas comorbidades associadas à obesidade, quando presentes no mesmo indivíduo, constituem a SM – basicamente definida pela ocorrência simultânea de pelo menos três dos cinco fatores que seguem (Quadro 1): grande circunferência abdominal; concentrações sanguíneas anormais de triglicerídeos, colesterol HDL e glicose e hipertensão arterial (NIH, 2001).

CARACTERÍSTICAS	CRITÉRIOS
Hipertensão arterial	Uso de anti-hipertensivo ou PA \geq 130/85mmHg
Dislipidemia	TG \geq 150mg/dl HDL < 40mg/dl (homens), < 50mg/dl (mulheres)
Obesidade	Condições para diagnóstico
Glicemia	Glicemia em jejum \geq 110mg/dl
Circunferência abdominal	\geq 88 cm (mulheres), \geq 102 cm (homens)
Condições para diagnóstico	Três alterações

Quadro 1 – Critérios para diagnóstico da SM, de acordo com o *Adult Treatment Panel (ATP III)* do *National Institute for Health (NIH, 2001)*

A obesidade tem sido considerada a principal causa para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. A grande associação entre essas duas enfermidades deu origem ao termo “diabesidade”, a partir da observação de que indivíduos com sobrepeso ou obesidade tendem a apresentar aumento nas concentrações de insulina, glicose e triglicerídeos, além de tolerância a glicose reduzida (SIMS et al., 1973; ZIMMET et al., 2001).

O risco de ocorrência de hipertensão arterial é cerca de cinco vezes maior em indivíduos obesos do que naqueles que apresentam peso normal (WOLF et al., 1997) e cerca de 67% dos casos de hipertensão são ligados ao excesso de peso

(CASSANO et al., 1990). O aumento da pressão arterial em obesos ocorre devido à liberação de angiotensinogênio nos adipócitos e ao aumento no volume sanguíneo, proporcional à massa corporal (HASLAM; JAMES, 2005), além de alguns fatores relacionados ao estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) endotelial (ROBERTS et al., 2006). A obesidade é ainda relatada como um dos principais fatores de risco de neoplasias que pode ser prevenido (HASLAM; JAMES, 2005).

A ocorrência SM varia de acordo com a etnia, com as características próprias da população avaliada e com os critérios para diagnóstico utilizados nos estudos. É uma condição de prevalência elevada e crescente em algumas populações, destacando-se as afro-descendentes, mexicanas, americanas e hispânicas. Além disso, os estudos têm mostrado que a prevalência e incidência da SM aumentam com a idade, principalmente depois dos 60 anos, tanto em homens como em mulheres (HWANG et al., 2006)

No Brasil, os dados epidemiológicos sobre a SM ainda são pontuais e escassos. Um estudo envolvendo mulheres entre 60 e 84 anos, realizado na cidade de Londrina, PR mostrou a ocorrência de SM em 39,9% das mulheres (CABRERA et al., 2007). Outro estudo realizado em Vitória, ES mostrou uma prevalência de SM de 29,8% em uma população entre 25 e 64 anos, a qual aumentou com a idade, sendo 15,8% no grupo mais jovem (26-34 anos) e 48,3% no grupo mais velho (55-64 anos) (SALAROLI et al., 2007).

2.1.2 O tecido adiposo

Para o estudo das bases fisiopatológicas da obesidade, é necessário o entendimento da estrutura funcional do tecido adiposo, o qual está distribuído em várias regiões do organismo, formando múltiplos depósitos de lipídeos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Este tecido é importante para a manutenção da homeostase energética e nutricional, além de apresentar função hormonal importante, sendo considerado o

maior órgão endócrino do organismo (SHOELSON et al., 2006). Está ainda relacionado com a resposta imune, função reprodutiva, homeostasia, termogênese, secreção hormonal e crescimento ósseo (IOZZO, 2009).

Trata-se de um sistema heterogêneo, tanto na sua origem embriológica, como na distribuição corporal e na função. As células mais abundantes do tecido adiposo são chamadas de adipócitos e tem a capacidade de armazenar triglicerídeos, os quais podem ser utilizados como fonte de energia (BJØRNDAL et al., 2011). Além disso, também são encontradas células imunes (leucócitos e macrófagos, principalmente) e endoteliais, devido à vasta vascularização deste tecido (HALBERG, 2008). Entre os adipócitos localizam-se septos de tecido conjuntivo, dos quais partem fibras reticulares que dão sustentação a estas células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido adiposo pode ser do tipo pardo, especialmente associado com a regulação da temperatura corporal, ou branco onde fica armazenada a energia a ser utilizada nos processos metabólicos (KLAUS, 2004). Quando em excesso, a quantidade de tecido adiposo presente no organismo, altera o IMC e conseqüentemente está diretamente associada à obesidade. Além disso, a sua distribuição em algumas regiões do organismo está mais fortemente associada ao risco de desenvolvimento da SM do que a quantidade total de gordura corporal (BJØRNDAL et al., 2011). A expansão visceral ou abdominal do tecido adiposo está mais intimamente relacionada com a ocorrência de resistência à insulina e doença cardiovascular do que a expansão subcutânea (HAFFNER, 2007).

2.1.3 Fisiopatologia da obesidade associada à SM e inflamação

Nas últimas duas décadas, um número consistente de pesquisas foi realizado com a perspectiva de esclarecer os aspectos comuns relacionados à patogênese da obesidade e das doenças a ela associadas. Nesse sentido, vários conceitos sobre a sua fisiopatologia vêm sendo modificados (EMILSSON et al., 2008), de modo que tem sido demonstrada a associação entre a ingestão calórica

excessiva e a desorganização do metabolismo celular e das moléculas mediadoras da inflamação (HOTAMISLIGIL, 2006; EMILSSON et al., 2008; CHEN et al., 2008).

Antes do descobrimento da leptina, em 1994, o tecido adiposo era considerado apenas como uma massa inerte para armazenamento de lipídeos resultantes do excesso de calorias ingeridas (BOGUSZEWSKI et al., 2010). Atualmente são reconhecidos muitos hormônios e substâncias produzidas pelos adipócitos, que atuam na regulação do apetite, saciedade e deposição de gordura, os quais são conhecidos como adipocinas (CHUDEK; WIECEK, 2006). Essas substâncias podem ser divididas em anorexígenas e orexígenas, as quais serão descritas a seguir (KATHLEEN, 2011).

A leptina é um dos hormônios que atua na modulação do apetite através da indução da saciedade, do aumento da taxa metabólica e da termogênese. Em indivíduos obesos ocorre um incremento na quantidade de tecido adiposo, e por consequência, na quantidade de leptina circulante, o que causa resistência à leptina, contribuindo para a manutenção da obesidade e desenvolvimento da resistência à insulina (EMILSSON et al., 2008). Além disso, esse hormônio aumenta a oxidação de ácidos graxos, causando lipotoxicidade (UNGER et al., 2010).

A adiponectina é também um hormônio anorexígeno com ação semelhante a da leptina, além de efeito anti-inflamatório e estimulante da lipólise. Os adipócitos produzem ainda um peptídeo chamado resistina, associado com a diminuição do apetite e resistência à insulina (CHUDEK; WIECEK, 2006).

A grelina é o único hormônio orexígeno periféricamente circulante. Essa substância não é produzida pelo tecido adiposo, mas pelo estômago e pelo duodeno e tem função antagonista à leptina (EMILSSON et al., 2008). Outros hormônios têm sido associados com a regulação da homeostase de energia, incluindo o RBP4 (proteína de ligação do retinol 4) e a visfatina, ambos secretados pelo tecido adiposo. Entretanto, seus efeitos ainda não são completamente entendidos. Alguns estudos têm demonstrado relação do RBP4 com a resistência à insulina. Já a visfatina é uma citocina pró-inflamatória, cujos efeitos na homeostase energética ainda permanecem controversos (CHUDEK; WIECEK, 2006).

Os adipócitos juntamente com as células do sistema imune presentes no tecido adiposo produzem ainda, outros peptídeos importantes chamados de citocinas ou adipocitocinas. Estas moléculas estão relacionadas principalmente com processos inflamatórios, atuando também na regulação do metabolismo energético e corporal de forma geral. O fator de necrose tumoral (TNF- α) estimula a lipólise no tecido adiposo, promove a produção de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), interfere no efeito da insulina e na produção das adiponectinas e aumenta a expressão das interleucinas (IL) (GRUNFELD; FEINGOLD, 1992; HOTAMISLIGIL et al., 1995). Além disso, está aumentado na obesidade e na resistência à insulina. A IL-6, também produzida no tecido adiposo, está associada com resistência à insulina, aumento da quantidade de tecido adiposo e da lipólise, bem como com a inibição da produção de adiponectina (RIEUSSET et al., 2004).

As citocinas também são sintetizadas por células do sistema imunológico e realizam a comunicação intercelular no organismo, sendo particularmente importantes no processo inflamatório (TRAYHURN; WOOD, 2004). Essas moléculas apresentam-se em maiores quantidades em indivíduos obesos, nos quais se observa aumento no número e no tamanho dos adipócitos (AGUILAR-SALINAS et al., 2008). Sendo assim, a obesidade desencadeia um estado inflamatório crônico nos indivíduos afetados (MONTEIRO; AZEVEDO, 2010).

Os primeiros achados que relacionam a obesidade com a inflamação foram associados aos elevados níveis de fibrinogênio encontrados em pacientes obesos (OGSTON; MCANDREW, 1964). Posteriormente, a relação entre a obesidade e a inflamação foi confirmada pela superexpressão do TNF- α no tecido adiposo de ratos obesos (HOTAMISLIGIL et al., 1993). Em animais experimentais a inibição da ação do TNF- α resulta em aumento da sensibilidade à insulina (UYSAL et al., 1997; VENTRE et al., 2009).

Na literatura clássica, a inflamação é descrita como o principal mecanismo de defesa contra as lesões teciduais, sendo marcada por reações como rubor, dor, edema e calor (LARSEN; HENSON, 1983). Em curto prazo, essa resposta inflamatória é um componente crucial para a reparação tecidual. No entanto, como tem sido observado nas doenças metabólicas, em longo prazo suas consequências não são benéficas (IOZZO, 2009).

Muitos mediadores inflamatórios estão envolvidos com a obesidade e o diabetes, entretanto poucas características da inflamação clássica são observadas nessas doenças. Por isso, há necessidade de estabelecimento de uma subclasse de inflamação, a qual tem sido denominada de baixo grau ou crônica ou ainda “metainflamação” (inflamação desencadeada metabolicamente). Esta condição é principalmente provocada por excesso de nutrientes, entretanto estimula a liberação do mesmo conjunto de moléculas mediadoras envolvidas na inflamação clássica (IOZZO, 2009)

O processo inflamatório tem início após uma injúria tecidual, podendo restringir-se ao local atingido ou assumir um caráter sistêmico. Após a injúria, ocorre vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos para os sítios inflamados. A partir daí, vários mediadores moleculares são liberados, principalmente as citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) que desencadeiam várias cascatas inflamatórias especialmente relacionadas com a síntese de proteínas de fase aguda, com destaque para a proteína C reativa (PCR) (BILATE, 2007).

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento das disfunções metabólicas, incluindo o aumento nos níveis de citocinas circulantes, diminuição das moléculas protetoras (como a adiponectina) e comunicação entre as células inflamatórias e metabólicas (GRUNFELD; FEINGOLD, 1992; HOTTA et al., 2000). Os hormônios produzidos pelo tecido adiposo, estão associados com os processos inflamatórios na obesidade e doenças correlacionadas (ROCHA; FOLCO, 2011).

Sendo assim, obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 estão intimamente associados com a inflamação crônica, caracterizada pela produção anormal de citocinas, aumento de proteínas de fase aguda e ativação de várias rotas inflamatórias (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

2.1.3.1 Sinais pró-inflamatórios locais no tecido adiposo

A obesidade gera um estado conhecido como lipotoxicidade. Sobre este estado, sinteticamente, pode ser dito que no processo obesogênico, em que ocorre

estímulo para o armazenamento de gorduras nos adipócitos, inicialmente tais gorduras irão se acumular nas células disponíveis no tecido. No entanto, quando o volume máximo de armazenamento é atingido esta condição estimula a proliferação dos adipócitos em um processo chamado adipogênese. Nesta fase, também ocorre estímulo angiogênico para aumento da irrigação sanguínea do tecido. Entretanto, o aumento na quantidade de adipócitos e no seu volume começa a pressionar os vasos sanguíneos, levando à indução massiva de apoptose dos adipócitos. A morte celular programada destas células libera uma grande quantidade de triglicerídeos para o tecido adiposo e conjuntivo e também para a corrente sanguínea. Grande parte destes, são depositados no fígado e também nos músculos e o restante leva a um estado conhecido como lipotoxicidade, que induz uma resposta inflamatória corporal via liberação de citocinas inflamatórias (VIGOUROUX et al., 2011).

Quando não ocorre reversão do quadro de desbalanço em que há maior aporte de energia do que gasto energético, este processo de geração de ácidos graxos livres relacionados à apoptose dos adipócitos gera um quadro inflamatório crônico que induz a um estado de estresse oxidativo também crônico, já que a inflamação está associada ao aumento na produção de radicais livres. Deste modo, diversas rotas metabólicas são alteradas, induzindo a SM, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (BASTOS et al., 2009). Por este motivo, são de grande interesse clínico e epidemiológico, os fatores que auxiliam a interromper o circuito que origina e retroalimenta a obesidade e a inflamação crônica por ela gerada (JACOBS et al., 2007).

A resposta inflamatória decorrente da obesidade aparentemente ocorre no próprio tecido adiposo, mas outros sítios metabolicamente críticos, como o fígado também podem ser envolvidos durante o curso da doença (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento da inflamação é a infiltração do tecido por células de defesa como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, os quais já foram descritos em grande quantidade no tecido adiposo de ratos obesos, bem como de humanos (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003). Há relatos de que os adipócitos em expansão produzem sinais quimiostáticos que levam ao recrutamento de macrófagos (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). Essas células realizam a remoção dos adipócitos que sofrem

apoptose ocasionada pela obesidade, ou pelas reações inflamatórias (HAN et al., 2006).

Dentre essas moléculas envolvidas com o recrutamento dos macrófagos para o tecido adiposo, estão a MCP-1 (proteína quimioatrativa do monócito-1) e seu receptor CCR2 (receptor 2 de quimiocina). Ratos que tem os genes dessas proteínas inativados demonstram menor acumulação de macrófagos no tecido adiposo e menor resistência à insulina (KANDA et al., 2006; WEISBERG et al., 2006). Entretanto, há estudos demonstrando que a deficiência de MCP-1 não é tão relevante para o recrutamento de macrófagos no tecido adiposo (INOUE et al., 2007; KIRK et al., 2008).

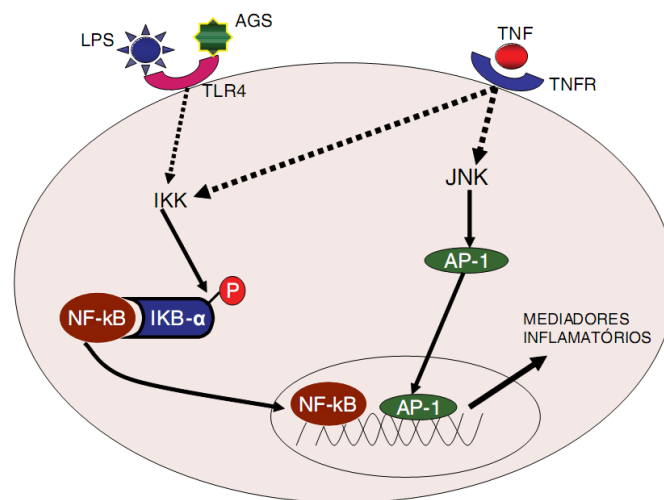
Dois tipos de macrófagos podem ser encontrados no tecido adiposo inflamado: M1 (chamados de infiltrativos) e M2 (considerados residentes). Os M1 são associados ao aumento na expressão de TNF- α e NO sintase (iNOS) e estão presentes em maior quantidade no tecido adiposo de ratos obesos, comparados aos saudáveis. Além disso, ratos obesos CCR2 deficientes apresentam menor quantidade de M1 (LUMENG et al., 2007).

Outras células inflamatórias têm sido envolvidas na fisiopatologia da obesidade. Apesar de estarem em menor quantidade que os macrófagos, os linfócitos T (tanto CD4⁺, como CD8⁺) também são encontrados no tecido adiposo de ratos obesos (LARSEN; HENSON, 1983). Ratos alimentados com alta quantidade de gorduras, apresentam um aumento no número de células CD8⁺ no tecido adiposo, bem como diminuição na infiltração de macrófagos neste tecido e aumento da resistência à insulina (NISHIMURA et al., 2009). O papel dos mastócitos e células *natural killer* (NK) também está demonstrado na inflamação do tecido adiposo (LIU et al., 2009; OHMURA et al., 2010). Além disso, os eosinófilos que são os principais secretores de IL-4, têm sido associados à ativação dos macrófagos neste tecido (WU et al., 2011).

Entre os mecanismos moleculares que desencadeiam a resposta inflamatória induzida pela obesidade, destaca-se a via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), o qual aumenta a expressão de diversos genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória. A estimulação da via de sinalização do NF- κ B pode ocorrer pela união de um ligante num receptor de

superfície dos adipócitos como o receptor para o TNF- α (TNF-R) e os TLR4 (*tool like receptor 4*), que podem ser ativados tanto por lipopolissacarídeos (LPS), quanto por ácidos graxos saturados (POULAIN-GODEFROY et al., 2010; HIMES; SMITH, 2010).

Quando o TLR-4 é estimulado, ele ativa a via de sinalização do NF- κ B, enquanto a estimulação do TNF-R ativa tanto o NF- κ B quanto a proteína-1 ativadora (AP-1). Esses dois fatores de transcrição são fosforilados por enzimas serina quinases IKK (IKB quinase) e JNK (c-Jun N-terminal quinase), respectivamente e desta forma aumentam a expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória (Figura 1) (BASTOS et al., 2009).



IKB α : inibidor do κ B; IKK: I κ B quinase; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; AGS: ácidos graxos saturados; JNK: Jun N-terminal quinase; TNFR: receptor do TNF- α ; TLR-4: receptor do tipo Toll-4.

Figura 1: Vias celulares de sinalização para transcrição de mediadores inflamatórios (Fonte: modificada de BASTOS et al., 2009).

Dessa forma, o aumento de triglicerídeos no tecido adiposo, tanto pelo excesso na sua ingestão, como pela sua liberação devido à apoptose dos adipócitos, favorece a ativação da resposta inflamatória. Adicionalmente, quando esses ácidos graxos são capturados no fígado ou no músculo, eles podem ser transformados em triglicerídeos ou oxidados nas mitocôndrias. No entanto, em pessoas obesas, essas organelas são disfuncionais, levando à produção de moléculas incompletamente oxidadas pelo ciclo de Krebs e ativando JNK e IKK (SOLINAS et al., 2007; SCHENK, 2008). Além disso, há acúmulo de espécies

reativas de oxigênio (EROs), especialmente o superóxido. Estes são eventos pró-inflamatórios que podem apresentar efeitos sistêmicos de resistência à insulina, ou intracelulares, contribuindo para o estresse do retículo endoplasmático (RE) (LOWELL; SHULMAN, 2005).

O RE é a organela celular envolvida com a síntese de proteínas, lipídeos e esteróides. Para manter o equilíbrio entre a síntese e a utilização dessas moléculas, o RE sofre processos agressores, caracterizados pela acumulação de lipídeos intracelulares. Alguns trabalhos têm demonstrado que, em obesos, o estresse do RE está aumentado tanto no tecido adiposo, como no fígado. Esse estresse ocasiona resposta inflamatória por ativação de JNK e IKK, por indução da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e transcrição de fatores que induzem a produção de proteínas de fase aguda como a PCR (OZCAN et al., 2004).

Além disso, a produção de EROs no RE também aumenta em situações de estresse. Atualmente o estresse oxidativo está sendo amplamente envolvido com o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina, bem como com a indução de cascatas inflamatórias (KEZHONG; RANDAL, 2008; BODEN, 2010). Tanto a JNK como a IKK são ativadas em condições de estresse oxidativo o que, aliado ao excesso de EROs, aumenta a resistência à insulina, podendo ocasionar diabetes tipo 2 (HIMES; SMITH, 2010).

Paralelamente a todos esses eventos, durante a evolução da obesidade, conforme o tecido adiposo se expande, os crescentes adipócitos se tornam hipoperfundidos, criando áreas de microhipóxia, o que também promove a ativação de JNK e IKK. Com isso, há recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo, os quais liberam citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α e IL-6) que induzem a resistência à insulina nos adipócitos vizinhos e amplificam o estado inflamatório (OHMURA et al., 2010).

2.1.3.2 Efeitos sistêmicos da inflamação associada às doenças metabólicas

Considerando que a obesidade e a SM alteram de maneira importante a homeostase corporal, várias rotas metabólicas são afetadas por estes eventos, com destaque para o metabolismo oxidativo e da glicose, a resposta inflamatória e a fisiologia vascular.

A função endócrina dos adipócitos promove a interação entre os vários tipos celulares presentes no tecido, como células endoteliais e imunes, resultando na produção de várias moléculas que amplificam a inflamação no tecido adiposo de indivíduos obesos (SHOELSON et al., 2006). Paralelamente, a dispersão de adipocinas na corrente circulatória também promove efeitos sistêmicos importantes mediados por substâncias como a adiponectina, leptina, inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e IL-6, os quais servem como marcadores de risco cardiometabólico (ROCHA ; FOLCO, 2011) e serão pormenorizados a seguir.

A adiponectina é uma das principais adipocinas produzidas pelo tecido adiposo, que está relacionada com a redução do apetite e se encontra diminuída na circulação de indivíduos obesos, em comparação aos não obesos (ARITA et al., 1999). Além disso, essa substância tem demonstrado efeito antidiabético devido a sua capacidade de combater a resistência à insulina. Sabe-se que em animais experimentais, o mau funcionamento de receptores da adiponectina (AdipoR1 e AdipoR2) causa resistência à insulina e intolerância à glicose (YAMAUCHI et al., 2007).

Essa molécula tem mostrado ainda efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos, especialmente evidenciados pela inibição de mecanismos inflamatórios em células endoteliais e macrófagos. Níveis fisiológicos de adiponectina diminuem a expressão de TNF- α e interferon- γ (IFN- γ). Apesar dos mecanismos anti-inflamatórios da adiponectina não estarem totalmente elucidados, tem sido observado que esse hormônio inibe a atividade de mediadores celulares pró-inflamatórios, especialmente JNK (FOLCO, 2009). Vários estudos epidemiológicos relatam ainda uma correlação inversa entre os níveis plasmáticos de adiponectina e a incidência de hipertensão, dislipidemia, e doença

cardiovascular, demonstrando a importância desse hormônio para a prevenção da SM (HOTTA et al., 2000; MATSUBARA et al., 2002; ADAMCZAK et al., 2003; KAZUMI et al., 2004).

A leptina é um hormônio liberado pelos adipócitos que apresenta ação central, hipotalâmica, reduzindo o apetite e aumentando a saciedade. Sua concentração plasmática é proporcional à quantidade de tecido adiposo do organismo, motivo pelo qual está frequentemente aumentada em indivíduos obesos (FLIER, 1995; FREDERICH et al., 1995). A ação imunomodulatória da leptina tem sido relatada por vários pesquisadores. Em monócitos e macrófagos, está associada ao aumento da capacidade fagocítica e da expressão de citocinas pró-inflamatórias e em neutrófilos, ocasiona o aumento de EAOs (LORD et al., 1998; CALDEFIE-CHEZET et al., 2001; MANCUSO et al., 2002).

A IL-6 é uma citocina inflamatória que induz a reações de fase aguda, estando presente em altas concentrações plasmáticas em indivíduos que apresentam estresse, doenças inflamatórias ou infecciosas (PAPANICOLAOU et al., 1998). A atividade dessa molécula no metabolismo ainda não está clara, pois sua deficiência em ratos geneticamente modificados promove obesidade (WALLENIUS et al., 2002), assim como a exposição crônica dos animais a IL-6 ocasiona a resistência à insulina (KLOVER et al., 2003). Sendo assim, essa molécula é considerada um modulador metabólico crítico.

Várias células imunes, especialmente os monócitos produzem IL-6. Ultimamente, há descrições de que o tecido adiposo também é uma fonte importante dessa molécula, sendo responsabilizado pela liberação de cerca de 25% do total da IL-6 circulante no homem (MOHAMED-ALI et al., 1998). Em obesos, há um incremento na secreção dessa molécula, estimulando a liberação de PCR pelo fígado, o que tem sido correlacionado com hiperglicemia, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (KANEMAKI et al., 1998; FESTA et al., 2000; FROHLICH et al., 2000). Além disso, a PCR é um marcador específico de lesões no miocárdio, bem como do risco de doenças cardiovasculares (RIDKER et al., 2000; BOEKHOLDT et al., 2006), embora um estudo recente sugira que deve ser avaliada em conjunto com outros fatores de risco (KAPTOGE et al., 2010).

Tanto a obesidade, como a SM promovem um estado hipertrombótico por meio de diferentes mecanismos, como hipofibrinólise, hipercoagulação e ativação plaquetária (VAN GAAL et al., 2006). Nesse contexto, está demonstrado que na obesidade e na SM, ocorre aumento na concentração de PAI-1, associado com o incremento da sua produção no fígado, tecido adiposo e endotélio disfuncional (MERTENS; VAN GAAL, 2002). Com isso, ocorre resistência à insulina e impedimento da fibrinólise, aumentando o risco de aterotrombose (RAU et al., 2007).

Além disso, em indivíduos obesos, observa-se aumento da agregação plaquetária, associada ao incremento nos níveis de fibrinogênio e fatores de coagulação dependentes de vitamina K, devido ao componente inflamatório da doença. A disfunção endotelial, comum na obesidade, também contribui para a ocorrência de trombose, devido ao aumento na expressão de componentes pró-inflamatórios e hemostáticos, como o fator de Von Willebrand (ALESSI; JUHAN-VAGUE, 2008).

2.1.3.3 Sinais inflamatórios da resistência à insulina

Vários estudos demonstram que a resistência à insulina precede o desenvolvimento de hiperglicemia e diabetes tipo 2. Fatores genéticos e condições ambientais, como a obesidade desempenham papel importante no surgimento da resistência à insulina (IOZZO, 2009).

O início da ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática, que está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, em quantidades que variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por duas subunidades α e duas subunidades β , unidas por ligações dissulfeto (KAHN, 1985). A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase (KASUGA, 1982).

A insulina induz a autofosforilação do seu receptor pela adenosina trifosfato (ATP), aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos proteicos intracelulares, o que dá início a uma série de eventos, incluindo a cascata de reações de fosforilação e defosforilação que regula os seus efeitos metabólicos e de crescimento (SUN et al., 1991; WHITE; KAHN, 1994). Dois substratos proteicos denominados substratos 1 e 2 do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), com localização citoplasmática são sequencialmente fosforilados em resíduos tirosina como resposta à ligação da insulina no receptor. A fosforilação das proteínas IRS cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3q), promovendo sua ativação (BACKER et al., 1992). A PI3q é importante na regulação da mitogênese, na diferenciação celular e no transporte de glicose estimulada pela insulina. A ativação da PI3q aumenta a fosforilação em serina da proteína quinase B (Akt). A partir daí, ocorre a translocação do transportador de glicose dependente de insulina (GLUT 4) em direção a membrana celular, efetuando assim a captação intracelular da glicose (PESSIN; SALTIEL, 2000).

Na maior parte dos casos de resistência à insulina a fosforilação dos IRS está deficiente, o que muitas vezes é devido à fosforilação de resíduos de serina ao invés de tirosina (GUAL et al., 2005). Com isso a ação da insulina e consequentemente a captação intracelular da glicose ficam comprometidas. Mediadores inflamatórios como TNF- α , ou níveis elevados de ácidos graxos podem ativar serina quinases como JNK e IKK, prejudicando a ação da insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1996; AGUIRRE et al., 2000; HIROSUMI et al., 2002). Uma vez que essas enzimas são as principais moléculas das cascatas pró-inflamatórias, elas se constituem em um provável elo entre a inflamação e a resistência à insulina (YUAN et al., 2001). Estudos com ratos experimentais deficientes em JNK mostraram redução na fosforilação de serina em IRS-1 e diminuição da resistência à insulina (SHOELSON et al., 2003).

Com base no conhecimento dos prejuízos à saúde associados à obesidade e aos distúrbios metabólicos associados, investigações sobre alimentos ou fitoterápicos com propriedades de interromper ou minimizar a obesogênese e também auxiliar na perda e manutenção do peso corporal são de grande relevância

contemporânea. Muitos estudos têm sido conduzidos a este respeito incluindo plantas brasileiras (BERUBÉ-PARENT et al., 2005; ROSA et al., 2012).

2.2 Atividade biológica do guaraná (*Paullinia cupana*)

O gênero *Paullinia* possui aproximadamente 195 espécies distribuídas em regiões americanas tropicais e subtropicais, sendo que pelo menos nove delas já foram descritas no Brasil. A espécie *Paullinia cupana* (Kunth) é uma planta arbustiva que apresenta duas variedades: a *Paullinia cupana*, variedade *typica*, que ocorre principalmente na Venezuela e na Colômbia e a *Paullinia cupana* variedade *sorbillis* [(Mart.) Ducke], que ocorre na flora amazônica e é popularmente denominada guaraná. A semente é a parte utilizável da planta, a qual é torrada e moída para a obtenção de um pó (HENMAN, 1982; CORREIA, 1984).

O guaraná tem sido utilizado desde os tempos pré-colombianos em bebidas medicinais que lhe atribuem propriedades energéticas, afrodisíacas, tônicas e protetoras de problemas gastrointestinais. Evidências históricas e antropológicas sugerem que a domesticação do guaraná foi feita pelos povos indígenas Satere-Maués, Andirás e Marabitanas. Os Satere-Maués que vivem na região do baixo Amazonas ao longo do Rio Maués e seus afluentes, além de cultivar e consumir o guaraná, incorporaram esta planta na sua mitologia (HENMAN, 1982).

Atualmente, o guaraná é empregado em muitos tipos de bebidas energéticas, preparadas a partir do pó e consumidas no mundo todo. Além disso, cápsulas de guaraná são vendidas em estabelecimentos comerciais (SMITH; ATROCH, 2007). Segundo a concepção popular, esta planta tem propriedades energéticas, antifatigantes, contribui na perda de peso, melhora a função e desempenho sexual e aumenta a capacidade cognitiva, principalmente a memória (ANGELO et al., 2008).

2.2.1 Composição química do guaraná

Os primeiros estudos acerca da composição química do guaraná revelaram a presença de vários compostos tais como: celulose (47,12%), amido (9,35%), resina vermelha (7,80%), pectina (7,40%), ácido guaraná-tânico (5,90%), materiais albuminóides (1,75%), saponina (0,66%), glicose (0,77%) e água (7,65%) (PECKOLT, 1866 apud BASILE et al, 2005). Outras substâncias em concentrações baixas também foram descritas como: o ácido málico e a dextrina (CORREIA, 1984).

A continuidade das investigações levou a identificação e quantificação da cafeína como um dos principais compostos bioativos do guaraná. Foi descrita uma quantidade de 2,7% a 3,5% de cafeína na amêndoa do guaraná e de 2,7% a 3,0% na casca do fruto, além de outros dois compostos, a teobromina e a teofilina (MARAVALHA, et al., 1965). Posteriormente, Belliardo e colaboradores (1985), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) confirmaram e quantificaram as concentrações de cafeína, teofilina e teobromina (alcalóides púricos) em amostras comerciais de guaraná.

Além destas metilxantinas, outros compostos com atividade antioxidante foram identificados no guaraná a exemplo das saponinas, catequinas, epicatequinas, proantocianóides. Taninos também foram identificados estando em concentrações relativamente altas, uma vez que representam 16% do peso seco (SOUSA et al., 2010).

Uma investigação mais recente avaliou o transcriptoma do guaraná, detectando mais de 15 mil transcritos a partir que relacionados com diversas rotas metabólicas. O estudo apontou grande similaridade entre o conteúdo de transcritos de metabólicos secundários observados no guaraná com o do café, chá (verde e preto) e chocolate, indicando compartilhamento de propriedades funcionais do guaraná com estes alimentos (ANGELO et al., 2008).

A identificação dos compostos bioativos do guaraná e a evidência de que a cafeína presente no guaraná é absorvida no intestino de modo similar a cafeína livre (BEMPONG; HOUGHTON, 1992) abriram caminho para estudos sobre suas propriedades funcionais.

2.2.2 Propriedades funcionais do guaraná

Várias propriedades funcionais relacionadas ao guaraná foram testadas em modelos experimentais celulares (*in vitro*) e em animais. Neste contexto, foram descritas suas propriedades antioxidantes, (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005; JIMOH et al., 2007) sua ação antimicrobiana, (FONSECA et al., 1994) incluindo efeito inibitório na evolução da placa bacteriana dental (PINHEIRO et al., 1987; YAMAGUTI et al., 2007), assim como seu efeito antialérgico (JIPPO et al., 2009). Resultados também sugeriram ação antiplaquetária do guaraná (HALLER et al., 2005; RAVI et al., 2008).

Estudos sobre o potencial efeito no câncer também têm sido realizados, sendo que já foram relatados efeitos protetores do guaraná contra dano no DNA efeitos quimiopreventivos na hepatocarcinogênese (FUKUMASU et al., 2006) e efeitos anticarcinogênicos na inibição do crescimento de células tumorais de melanoma de pulmão (FUKUMASU et al., 2008). Adicionalmente, o estudo feito por Campos e colaboradores (2003) sugere seu efeito gastroprotetor.

Na cultura popular o guaraná é associado a propriedades afrodisíacas. Apesar dos poucos estudos desenvolvidos até o momento, foi demonstrado que um composto de ervas denominado Catuama, o qual contém guaraná, atua nos corpos cavernosos de coelhos, promovendo um vasorelaxamento diretamente relacionado ao guaraná (ANTUNES et al., 2001). Esse estudo reforça a crença popular de esta planta atuar sobre a função reprodutiva masculina.

Em relação às propriedades neurofuncionais do guaraná, o número de estudos ainda está aquém do esperado. Espinola e colegas (1997), avaliando o seu efeito na memória constataram uma reversão parcial de amnésia causada pela escopolamina em camundongos. Estes resultados sugerem efeito positivo do guaraná na aquisição e manutenção da memória em uma dose mínima de 0,3 mg/ml. Da mesma forma, em humanos foi relatada ação positiva do guaraná na memória (KENNEDY et al., 2004; HASKELL et al., 2007). Além disso, em ratos

submetidos a nado forçado foi demonstrado o efeito antidepressivo desta planta (CAMPOS et al., 2005).

Outra abordagem avalia o efeito do guaraná no metabolismo lipídico, onde se observa melhoria no metabolismo do tecido adiposo em ratos, principalmente os treinados com atividade física. Os autores sugerem que esta propriedade estaria associada às metilxantinas presentes no guaraná (LIMA et al., 2005).

Em relação às suas propriedades energéticas e antifatigantes o estudo de Miura, et al. (1998) se destaca. Estes autores conduziram um experimento em que camundongos foram tratados com extrato aquoso de guaraná sendo submetidos a exercício físico ou tratados com epinefrina que induz a glicogenólise. O guaraná promoveu uma supressão da hipoglicemia induzida pelo exercício via diminuição do conteúdo de glicogênio hepático que foi mobilizado para manter os níveis plasmáticos de glicose. Tais resultados corroboraram fortemente a hipótese de que o guaraná possui propriedades energéticas, já que a manutenção dos níveis glicêmicos diminuiu as sensações desconfortáveis provocadas pela hipoglicemia, incluindo fadiga.

Algumas pesquisas sobre as propriedades funcionais do guaraná na obesidade e obesogênese têm sido conduzidas. A primeira publicação a comentar a potencial associação do guaraná com obesidade foi feita por Moreli e Zoorob (2000). Entretanto, as primeiras evidências anti-obesogênicas mostraram uma perda significativa de peso e gordura corporal nos indivíduos tratados com um composto contendo guaraná e a erva chinesa Mahuang (BOOZER et al., 2001). Além disso, foi observado um aumento de velocidade de esvaziamento gástrico e diminuição de peso em indivíduos que ingeriram o guaraná (OPALA et al., 2006). Os efeitos anti-obesogênicos e o aumento no gasto calórico de indivíduos que ingerem guaraná, tem sido atribuídos especialmente à cafeína e às catequinas da sua composição (BERUBÉ-PARENT et al., 2005).

Apesar das evidências sugerindo as propriedades anti-obesogênicas do guaraná, estudos epidemiológicos que avaliem a potencial influência do seu consumo na prevalência da obesidade e demais doenças metabólicas ainda não foram conduzidos. Em parte, porque o guaraná é uma planta brasileira e o seu consumo populacional ocorre principalmente na região amazônica. Além da

necessidade de evidências populacionais, se faz necessário investigar se o guaraná teria ação regulatória sobre as citocinas inflamatórias que são produzidas de modo continuado em estados obesogênicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vivo* da ingestão habitual de guaraná na ocorrência de obesidade, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica, bem como estudar o comportamento *in vivo* e *in vitro* dos marcadores bioquímicos e inflamatórios associados a essas doenças.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Analisar a associação *in vivo* da ingestão habitual de guaraná por idosos de Maués, AM com:

- a prevalência de obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão e dislipidemia;
- marcadores antropométricos;
- marcadores bioquímicos do metabolismo lipídico, glicêmico e oxidativo.

3.2.2 Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* do extrato de guaraná, por meio da mensuração dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) e anti-inflamatória (IL-10) em:

- amostras de células mononucleares sanguíneas periféricas cultivadas em presença de glicose e insulina, que mimetizam uma condição de obesidade;
- amostras de sangue de indivíduos que ingeriram guaraná por um período de 14 dias.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, que se encontram a seguir. O primeiro artigo já está publicado na revista *Phytotherapy Research*. O segundo encontra-se apresentado na forma em que foi submetido para a revista *Journal of Natural Products*.

4.1 Artigo 1

4.1.1 Ingestão Habitual de Guaraná e Doenças Metabólicas: um estudo epidemiológico de uma população idosa da Amazônia

Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population

Cristina da Costa Krewer, Euler Esteves Ribeiro, Ednéa Aguiar Maia Ribeiro, Rafael Noal Moresco, Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Greice Franciele Feyl dos Santos Montagner, Michel Mansur Machado, Karien Viegas, Elorídes Brito, Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population

Cristina da Costa Krewer,^{1,2} Euler Esteves Ribeiro,³ Ednéa Aguiar Maia Ribeiro,² Rafael Noel Moresco,⁴ Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha,¹ Gréice Franciele Feyl dos Santos Montagner,² Michel Mansur Machado,² Karin Viegas,¹ Elorides Brito¹ and Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2,3*}

¹Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

³Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas, Brazil

⁴Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

The aim of the present study was to evaluate the associations of metabolic disorders and anthropometric and biochemical biomarkers of lipid, glucose and oxidative metabolism and the habitual ingestion of guaraná (*Paullinia cupana*, Mart. var. *sorbilis*) by an elderly population residing in the Amazon Riverine region of the Maués municipality (Brazil). A case-controlled study was performed that included 637 elderly (≥ 60 years of age) patients classified as either those who habitually drank guaraná (GI, $n = 421$) or those who never drank guaraná (NG, $n = 239$) based upon their self-reported intake of guaraná. Indeed, the prevalence of various metabolic disorders was associated with guaraná ingestion. The prevalence of hypertension, obesity and metabolic syndrome in the GI group was lower than the prevalence found in the NG group. The NG group exhibited lower systolic and diastolic blood pressure values. The males in the GI group exhibited a lower waist circumference, on average, than the circumference found in the NG group, whereas the females in the GI group had lower cholesterol (total and LDL-c) levels than the control cohort. Additionally, a significant association was found between lower levels of advanced oxidative protein product (AOPP) and habitual guaraná consumption. The results constitute the first epidemiological study to suggest a potentially protective effect of habitual guaraná ingestion against metabolic disorders in elderly subjects. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Paullinia cupana*; guaraná; metabolic syndrome; oxidative metabolism; obesity; hypertension

INTRODUCTION

The plant guaraná (*Paullinia cupana*, Mart. var. *sorbilis*) originates in Brazil, is rich in methylxanthines such as caffeine, theobromine and theophylline, and contains tannins, saponins, catechins, epicatechins, proanthocyanidols, as well as trace concentrations of many other compounds (Belliaro *et al.*, 1985). A study of the guaraná transcriptome performed by Ângelo *et al.* (2008) revealed the presence of important secondary compounds in this plant, including transcript sequences related to flavonoid metabolism. These results suggested that guaraná exhibits similarities to *Camelia sinensis* (green and black tea), a plant that has been shown to have several interesting functional properties (Babu and Liu, 2008).

There have been medicinal beverages using extracts of roasted guaraná seeds available since the pre-Colombian era (Smith and Atroch, 2007). Previous studies in experimental models as well as *in vitro* assays have described several biological effects that guaraná shares with green tea, such as antioxidant activity (Mattei *et al.*,

1998; Basile *et al.*, 2005; Jimoh *et al.*, 2007), antimicrobial effects (Da Fonseca *et al.*, 1994; Pinheiro *et al.*, 1987; Yamaguti-Sasaki *et al.*, 2007) and anticarcinogenic and antitumoral properties (Fukumasu *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2010). Additional studies in animals and human volunteers have demonstrated that guaraná ingestion exhibits important biological effects, such as an improvement in cognitive performance (Espinola *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2004) and an antidepressive effect (Campos *et al.*, 2005; Otobone *et al.*, 2007). Similar effects have also been described for green tea consumption (Feng *et al.*, 2010; Niu *et al.*, 2009).

The functional properties of guaraná that are potentially the most similar to those of green tea are those properties related to metabolic disorders. Investigations have shown that guaraná positively affects lipid metabolism (Lima *et al.*, 2005), enhances weight loss (Boozer *et al.*, 2001; Opala *et al.*, 2006), and increases basal energy expenditure (Bérubé-Parent *et al.*, 2005). Therefore, these data suggest that guaraná potentially conveys an antiobesity effect. Furthermore, guaraná exhibits a cardioprotective effect due to opposition to platelet aggregation (Bydlowski *et al.*, 1988, 1991).

However, in contrast to green tea, in which many epidemiological studies have been performed that consistently describe effects on metabolic disorders and components of metabolic syndromes (Imai and

* Correspondence to: I. B. M. da Cruz, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Laboratório de Biogenômica-UFSM, Santa Maria-RS, Brazil, 97105-900. E-mail: ibmcruz@hotmail.com

Nakachi, 1995; Sasazuki *et al.*, 2000; Iso *et al.*, 2006; Kuriyama *et al.*, 2006; Basu *et al.*, 2010, 2011), most studies investigating the effects of guaraná have been performed in experimental models or in clinical approaches that used guaraná mixed with other bioactive compounds. In this manner, Bozzer *et al.* (2001) investigated the associations among guaraná, *Mahuang*, and obesity, and Bérubé-Parent *et al.* (2005) studied the metabolic effects of guaraná, multi-vitamin supplements and green tea extracts. Other controlled investigations testing the effects of guaraná have been performed in studies over a short time period and with a relatively low number of subjects.

The investigation of guaraná consumption is important, in a manner similar to the investigation of other potentially beneficial foods such as green tea, soybeans and red wine, in larger population groups. Therefore, the objective of our study was to analyse the association between guaraná consumption and the prevalence of obesity, hypertension, type 2 diabetes and dyslipidemia in an elderly population living in the Riverine region of the Maués municipality in Brazil. Additionally, the study evaluated the effect of habitual guaraná ingestion on anthropometric and biochemical biomarkers of lipid, glycemic and oxidative metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Study design, population characteristics, and sample selection. There were a total of 637 elderly (≥ 60 years of age) patients included in the present case-controlled study. The elderly patients were classified into two groups based on self-reported data: those who habitually ingested guaraná and those who never ingested guaraná. At the time of data collection, Maués had 45284 inhabitants, of which 2939 (6.4%) were elderly. Therefore, the samples analysed represent 22.4% of the elderly population. This sample population was based upon a

previous investigation performed by our research group that included 1808 elderly subjects (Ribeiro *et al.*, 2010).

The study participants comprised elderly volunteers who could be easily accessed by researchers; about 50% of the population lived in far-flung coastal communities located among the rivers and tributaries of the Amazon forest. The study age criteria of ≥ 60 years was based on the World Health Organization (WHO, 1998) definition of an 'elderly' population in a developing country. The baseline general characteristics of the subjects studied here are described in Table 1. Aside from the higher number of males in the GI group compared with females, the other socioeconomic and cultural variables were similar between the groups.

This study was performed in an elderly population because elderly people tend to have a stable dietary pattern and are less susceptible to changes arising from the increased global use of nutritional foods compared with young adults. Additionally, epidemiological studies have demonstrated that the metabolic diseases investigated here are most prevalent in elderly adults (Cigolle *et al.*, 2009).

Region of study and history of guaraná consumption.

The study was performed in Maués because this location is historically important for guaraná production. Maués is located in the geographical middle of the Amazon region; it was founded in 1798 by the Portuguese and became a municipality in 1896. The prominent region of Maués is located on the right bank of the River Maués-Açu (Table 2).

The primary agricultural product of Maués is guaraná (*Paullinia cupana*). Evidence has suggested that the native Sateré-Maués people, who live in a native indigenous reserve localized in Maués, were the first to farm guaraná. However, as guaraná consumption increased rapidly among European colonizers, the beverage was incorporated into the traditional culture of the mixed population that arose from the interaction between the settlers and the indigenous peoples of

Table 1. Baseline characteristics of elderly Riverine inhabitants who habitually ingest guaraná (GI) and those who never ingest guaraná (NG), Maués, Amazonas-Brazil

Variable		Group		<i>p</i>
		GI	NG	
Sample number (<i>n</i> , 637)		421	239	
Sex	Males	219	86	<0.0001
	Females	202	153	
Age (years, mean \pm SD)		72.87 \pm 8.13	71.93 \pm 7.84	0.149
Place of birth	Maués	304 (73.6)	156 (69.6)	0.384
Education	Illiterate	287 (68.8)	158 (68.1)	0.923
	<4 years	82 (19.7)	46 (19.8)	
	4–8 years	22 (5.3)	15 (6.5)	
	>8 years	26 (6.2)	13 (5.6)	
Functional status	Retired	360 (86.7)	192 (82.1)	0.135
Occupation	Subsistence farming*	396 (94.5)	234 (97.9)	0.203
Personal income		225 (55.6)	116 (51.3)	0.307

n = amostral sample.

*Agricultural and fishing activities; comparison between categorical variables were performed by Chi-square statistical test.

HABITUAL INGESTION OF GUARANÁ AND METABOLIC MORBIDITIES

Table 2. Maués, Amazonas-Brazil baseline characteristics

Indicator	
Geographic location	Latitude: 3°38'36.1"S Longitude: 57°71'36.1"W
Area	39988 km ²
Population (2009)	45284
Transport	Access: boat and air transport
Distance from Manaus	356 km (train transport)
Population distribution (2009)	Urban Riverine region: 21094 Rural Riverine: 24190 Total: 45284
Riverine population	Elderly population: 2939 (6.4%)
geographic distribution	175 communities distributed in several river deltas
Demographic density	1 hab./km ²
Life expectancy at birth ^a	68.3 years

^aBrazilian Governmental Census 2000.

the Amazon (Smith and Atroch, 2007). This general population is known as the Riverine or Caboclos population. The origins of the Caboclos cultural group can be traced back approximately 300 years. In the Maués region Caboclos are also referred to as Ribeirinhos or Riverine people (river-side dwellers).

The Riverine people that live in Maués have developed several different traditional methods of guaraná production that have been described by Smith and Atroch (2007): generally, guaraná is produced on small and large farms, either as a monocrop or alongside other crops, and is harvested by hand in the dry season. If the entire fruit bunch is ripe, it is either snipped off with scissors or small pruning shears, or broken off manually and placed in a basket and carried back to the home. Before roasting the seeds, the red skin must be removed, and so the fruits are skinned by hand, left to soak in water, or simply stored for several days until the skin softens. On small farms in the Maués watershed the guaraná seeds are roasted on a griddle, usually made of clay, that reduces the chance of burning.

To prepare the traditional guaraná beverage, the hard cylinder containing the seeds is grated with the bony tongue of the pirarucu (*Arapaima gigas*), one of the largest fish in the Amazon. The powder is collected either on a piece of paper or allowed to fall directly into a calabash gourd containing water. Sugar is then added to the mixture of guaraná powder and water, and the whole concoction is consumed, usually soon after waking, while the consumer is still in the fasting state. The ingestion of guaraná more than once a day does occur, but it appears to depend on an individual's level of energy expenditure. Repeated intake of guaraná throughout the day may be related to extreme environmental conditions, such as high temperature and humidity, common conditions in the Amazon rainforest region that increase the feeling of fatigue. We used this information as background in a brief questionnaire about sociocultural, economics, health and lifestyle variables. In the group who reported never drinking guaraná, the primary motivations were dislike of the taste and the experience of tachycardia as a consequence of the high caffeine concentration. Elderly people who had previously been advised not to drink

guaraná for medical reasons were excluded from this study. The elderly people who reported drinking guaraná noted that they had begun ingesting the drink at a young age, often as children. Moreover, the subjects who consumed guaraná reportedly ingested this plant at least two or more times a week.

Metabolic disorder diagnosis. Initially, the study evaluated the associations between guaraná ingestion and the following metabolic disorders: obesity, hypertension, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. The subjects were classified into the following groups based on their body mass index (BMI): obese, BMI >30 kg/m²; overweight, BMI ≥25 kg/m², and <30 kg/m²; control group (non-overweight), BMI <25 kg/m². Hypertension was considered to be present when the subject had a systolic blood pressure (SBP) of >140 mmHg and/or a diastolic blood (DBP) pressure of >90 mmHg, when measured on a minimum of two occasions separated by a month, or when antihypertensive drugs were used. Subjects with severe hypertension, i.e. SBP ≥160 mmHg and/or DBP ≥100 mmHg, were also included. Diabetes mellitus (type 2) was considered to be present when two independent measures demonstrated that the subject had glucose levels above 126 mg/dL or if the subject was using glucose-lowering drugs. The metabolic syndrome was diagnosed when the participant met three or more of the following criteria: (1) high blood pressure: blood pressure ≥130/85 mmHg or under treatment for hypertension; (2) hypertriglyceridemia: fasting plasma triglycerides ≥150 mg/dL; (3) low HDL: fasting HDL cholesterol <40 mg/dL in men, <50 mg/dL in women; (4) hyperglycemia: fasting glucose level of ≥110 mg/dL or under treatment for diabetes; (5) central obesity: waist circumference >88 or >102 cm in women and men, respectively (Grundy, 2005).

Also elderly patients without metabolic disorders or other morbidities (healthy elderly) were identified.

Biochemical and anthropometric data collection. Biochemical analyses were performed on blood samples collected from subjects after an overnight (>12 h) fast. Peripheral blood samples were collected by venipuncture using Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes containing heparin and EDTA. The levels of the following blood components were assayed: glucose, total cholesterol, HDL-c, LDL-c and triglycerides (TG). Total cholesterol, HDL-c, TG and glucose levels were determined using an enzymatic colorimetric method with the following commercial kits: total cholesterol, Cod-Ana Labtest®; HDL-c, precipitant Labtest®; TG, Gpo-Ana; Glucose, PAP Labtest®. The LDL-c level was calculated according to the Friedewald equation: (LDL-c) = (TG) - (HDL-c + TG/5) (Tonks, 1972; Friedewald *et al.*, 1972).

The levels of biomarkers of oxidative metabolism were analysed; the total polyphenol content was spectrophotometrically determined in plasma by measuring the absorbance at 750 nm (the Folin-Ciocalteu method) and using gallic acid as a standard, as described by Chandra and De Mejia Gonzalez (2004). The total phenol concentration of the plasma samples was determined after a procedure of acid extraction/hydrolysis and protein precipitation with 0.75 M metaphosphoric acid (MPA). For hydrolysis of the conjugated forms of polyphenols, hydrochloric acid was added to the

sample, followed by sodium hydroxide in methanol, which breaks the polyphenol–lipid links and provides a first extraction of polyphenols. MPA was used in this procedure to remove the plasma proteins. The final extraction of polyphenols was performed by adding a 1:1 (v/v) solution of acetone:water. The results were expressed as the gallic acid equivalent (GAE) in mg/L, and thiol groups were determined as described by Ellman (1959). Lipid peroxidation was quantified by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Ohkawa *et al.*, 1979). Total blood SOD (EC 1.15.1.1) activity was measured spectrophotometrically according to Boveris and Cadenas (1997). One unit of activity is defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine auto-oxidation by 50%. Catalase activity (EC 1.11.1.6.) was determined according to Aebi (1984). One unit of catalase activity was defined as the activity required to degrade 1 μ mol of hydrogen peroxide in 60 s. Protein carbonyls were measured according to a method described previously (Morabito *et al.*, 2004). The results were expressed as nanomoles of carbonyl groups per mg protein. Advanced oxidized protein products (AOPP) were measured using a Cobas Mira Plus clinical chemistry analyser and using the technique described by Selmecci *et al.* (2005). Nitric oxide was evaluated indirectly by plasma nitrate and nitrite quantification using the Griess method (adapted to Cobas Mira automated analyser by Pereira *et al.* (2010)).

The anthropometric variables investigated included height (measured in meters; without shoes) and weight (measured in kilograms; with heavy clothing removed and 1 kg deducted for remaining garments). Body mass index was calculated as weight in kilograms divided by the square of the height in meters. The waist circumference on standing subjects was measured with a soft tape midway between the lowest rib and the iliac crest. Two blood pressure recordings were obtained from the right arm of patients in a sitting position after 30 min of rest; measurements were taken in 5 min intervals, and the mean values were calculated.

Ethics. This study was approved by the Ethical Committee of the Universidade do Estado do Amazonas. Since the vast majority of the elderly included in this study were illiterate, oral consent or fingerprint in Term was obtained to indicate their voluntary participation in the study after the researchers read the consent form to the patients.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the SPSS/PC statistical package, version 17.0 (SPSS, Inc., IL). The difference in the prevalence of metabolic diseases between the elderly subjects who habitually ingested guaraná and the elderly subjects who never consumed guaraná was compared using the Chi-square test. A multivariate analysis was performed using logistic regression (the backward Wald method) to evaluate age, gender, smoking and previous cardiovascular disease as possible intervening variables. The biomarker comparison was performed using the Student's *t*-test analysis and considered males and females separately due to the potential biological differences between sexes, such as waist circumference. The variables that presented statistical significance were tested using multivariate analysis in order to observe

whether the associations were independent of age, smoking habits, medicine consumption, previous cardiovascular disease and risk factors. The odds ratio (OR) and confidence interval at 95% (CI95%) were calculated for categorical variables associated with guaraná consumption. All *p* values were two-tailed, and *p* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The prevalence of metabolic disorders in the GI and NG group was analysed, and the results are shown in Table 3. The prevalence of metabolic disorders was negatively associated with guaraná ingestion. The group that consumed guaraná showed a lower prevalence of hypertension, obesity and metabolic syndrome than the NG group. However, the prevalence of type 2 diabetes was identical between the GI and NG groups. Multivariate analysis showed that these results were independent of age and sex. For hypertension in the GI group, the odds ratio (corrected for sex and age) was 0.699 (95% CI = 0.500–0.960). For obesity the odds ratio was 0.661 (95% CI = 0.456–0.958) and for metabolic syndrome it was 0.856 (95% CI = 0.726–1.000). These results indicate that there is a protective effect associated with habitual guaraná ingestion.

Three additional analyses related to health conditions among the elderly were performed. As shown in Table 2 the percent of subjects that had self-reported daily consumption of medicine was higher in the NG group than in the GI group. However, the incidence of hospitalization over the past year was similar between the two groups. The percent of subjects with no history of metabolic disorders or other morbidities was 19.9% (*n* = 127) and was not significantly different between the GI and NG groups (*p* = 0.765).

There were a total of 42 patients in this study who had self-reported histories of stroke or myocardial infarction; there was a significantly higher prevalence of these seniors in the group who did not drink guaraná (*n* = 22, 9%) than in the habitual consumption group (*n* = 20, 5%) (*p* = 0.028). These results were independent of sex and age.

Another important variable in the results described here is smoking; 12% (*n* = 76) of the subjects were

Table 3. Comparison of the prevalence of metabolic disorders between elderly Riverine inhabitants who habitually ingest guaraná (GI) and those who never ingest guaraná (NG)

Disorder	Group		<i>p</i>
	GI	NG	
	% (<i>n</i>)	% (<i>n</i>)	
Hypertension	43 (174)	53 (123)	0.018
Type 2 diabetes	11 (44)	15 (35)	0.186
Obesity	32 (131)	47 (108)	<0.001
Metabolic syndrome	21 (70)	32 (56)	0.007
Daily medicine ingestion	44 (185)	55 (129)	0.020
Hospitalization in the past year	13 (54)	15 (35)	0.562

n = a mostral sample. Statistical comparison was performed using a Chi-square test.

HABITUAL INGESTION OF GUARANÁ AND METABOLIC MORBIDITIES

smokers, and the frequency of smoking was similar between the GI and NG groups ($p=0.509$).

The biochemical and anthropometric variables for the male and female patients were analysed separately due to biological characteristics such as abdominal circumference that differ between sexes. This analysis also excluded subjects with a history of type 2 diabetes mellitus, whose self-reported use of medicine could influence the variables investigated; the results obtained are shown in Table 4. The males in the GI group exhibited a significantly lower waist circumference, systolic blood pressure and diastolic blood pressure when compared with the males in the NG group and multivariate analysis showed that these factors were significantly associated with guaraná ingestion independent of age, smoking habit, diabetes and previous cardiovascular disease. However, the biochemical variables investigated were similar between the two groups, aside from the AOPP level, that was found to be lower in the GI group.

Females in the GI group exhibited lower systolic and diastolic blood pressure than the females in the NG group. In contrast to the results obtained in male subjects, waist circumference was found to be similar between the two groups. However, habitual ingestion of guaraná was associated with differences in some biochemical parameters. In females, total cholesterol, LDL-cholesterol and AOPP levels were significantly lower in the GI group compared with the NG group.

An additional analysis was performed using a level of 25 $\mu\text{mol/L}$ AOPP between the GI and NG groups as a cut-off value in order to delineate the first quartile of the sample population. The frequency of subjects with lower AOPP values was significantly reduced in the GI group ($n=117$, 38%) compared with the NG group ($n=41$, 25%) ($p=0.004$). The odds ratio for higher AOPP values in the NG group (after correction for sex, age, previous cardiovascular diseases and smoking) was $\text{OR}=1.709$ (95% $\text{CI}=1.133\text{--}2.578$).

DISCUSSION

This is the first epidemiological study to investigate the association between the prevalence of metabolic disease and habitual guaraná ingestion in an elderly Amazon rainforest population residing in a region of Brazil known for its guaraná production (Maués). In general, the results suggest that guaraná consumption, most likely due to the bioactive compounds present in the beverage, potentially conveys a protective effect against the metabolic disorders investigated here. The association between guaraná ingestion and a lower risk of obesity, hypertension and metabolic syndrome is important because these morbidities are related to cardiovascular disease risk. Some of the differences in the biochemical and anthropometric parameters that were observed in this study corroborate the possible protective effect of guaraná.

Our findings on the impact of habitual guaraná ingestion on the prevalence of metabolic disorders are in concordance with previous results obtained from experimental models and clinical investigations that used guaraná as a supplement. The antiobesity effects of guaraná have been described by Boozer *et al.* (2001), Bébé-Parent *et al.* (2005) and Opala *et al.* (2006).

In addition to finding a lower prevalence of obesity in the elderly subjects who habitually ingested guaraná, an association was found between the consumption of guaraná and waist circumference (WC) in men. These data potentially have an epidemiological impact as waist circumference is considered to be a measure of abdominal obesity correlated with cardiovascular risk, particularly in men. Population studies have described positive associations between this trait and higher mortality, independent of BMI. A recent investigation by Jacobs *et al.* (2010) examined the association between WC and mortality among 48500 men and 56343 women aged 50 or more in the Cancer Prevention Study II

Table 4. Comparison of biochemical, anthropometric and physiological variables between elderly Riverine inhabitants who habitually ingest guaraná (GI) and those who never ingest guaraná (NG)

Variable	Male		Female	
	GI	NG	GI	NG
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
BMI (kg/m^2)	25.1 \pm 5.6	25.1 \pm 4.4 ^{ns}	26.0 \pm 4.5	25.0 \pm 4.1 ^{ns}
Waist circumference (cm)	87.3 \pm 14.4	92.7 \pm 11.3 ^b	86.7 \pm 14.2	87.6 \pm 16.4 ^{ns}
SBP (mmHg)	130.2 \pm 20.4	137.3 \pm 21.9 ^b	129.4 \pm 18.6	134.1 \pm 22.4 ^a
DBP (mmHg)	73.9 \pm 11.1	76.9 \pm 10.8 ^a	74.5 \pm 9.9 ^{ns}	75.3 \pm 10.4 ^{ns}
Glucose (mg/dL)	107.4 \pm 16.5	110.1 \pm 18.3 ^{ns}	118.9 \pm 37.1	115.5 \pm 31.1
Cholesterol (mg/dL)	193.6 \pm 191.9	191.9 \pm 41.3 ^{ns}	207.6 \pm 48.3	227.8 \pm 60.9 ^b
LDL-c (mg/dL)	144.3 \pm 49.2	156.2 \pm 59.3 ^{ns}	140.5 \pm 45.0	155.9 \pm 57.2 ^a
HDL-c (mg/dL)	37.9 \pm 15.7	38.4 \pm 11.2 ^{ns}	37.9 \pm 15.7	38.4 \pm 11.2 ^{ns}
Triglycerides (mg/dL)	178.9 \pm 89.9	168.4 \pm 85.4 ^{ns}	178.9 \pm 89.9	168.4 \pm 85.4 ^{ns}
Total polyphenols (mg/dL)	2.58 \pm 0.67	2.60 \pm 0.51 ^{ns}	2.56 \pm 0.54	2.43 \pm 0.70 ^{ns}
TBARS (nmol/mL erit)	21.8 \pm 9.6	21.5 \pm 10.2 ^{ns}	22.0 \pm 9.9	21.3 \pm 8.3 ^{ns}
Carbonyl proteins (mg/dL)	0.173 \pm 0.09	0.183 \pm 0.09 ^{ns}	0.183 \pm 0.09	0.189 \pm 0.08 ^{ns}
AOPP (nmol/L)	36.3 \pm 30.9	44.3 \pm 35.2 ^a	34.6 \pm 19.6	41.1 \pm 28.1 ^a
Nitric oxide (nmol/L)	30.5 \pm 24.1	34.9 \pm 26.8 ^{ns}	34.7 \pm 28.5	34.5 \pm 21.1 ^{ns}

SD, standard deviation; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; AOPP, advanced oxidation protein products. Mean comparison between GI and NG groups were performed by statistical Student's *t* test. NS, not significant; ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$

Nutrition Cohort. The authors observed that, after adjustment for BMI and other risk factors, very high WC values were associated with an approximately two-fold higher risk of mortality in men and women. Thus, the association between lower waist circumferences and ingestion of guaraná described here appears to be relevant. The catechins, caffeine, and other xanthines present in guaraná likely contribute to these results; however, the exact mechanism of action remains to be elucidated.

As noted previously, guaraná contains some bioactive compounds that are similar to those found in green tea (Bellardo *et al.*, 1985; Angelo *et al.*, 2008) that have been well studied. Tea polyphenols have been shown to exhibit antioxidative, antithrombotic, antiinflammatory, hypotensive, hypocholesterolemic, antihypertensive and antiobesogenic effects (Yung *et al.*, 2008).

An association was also observed between hypertension and metabolic syndrome and guaraná ingestion. However, the effect of guaraná on hypertension and metabolic syndrome in humans is poorly understood. On the other hand, a growing body of evidence indicates that there is a potential role for green tea, or its ingredient bioactive polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG), in significantly ameliorating features of metabolic syndrome and subsequent risks for type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. The results from these studies demonstrate the beneficial effects of green tea or green tea extracts rich in EGCG on weight management, glucose control and cardiovascular risk factors (Thielecke and Boschmann, 2009).

Certainly, the most unexpected result reported here, as guaraná contains a high concentration of caffeine, was the association between guaraná intake and the low prevalence of hypertension. The effect of caffeine on blood pressure has been examined for decades, with variable results that depend on factors such as the population under study. The relationship between foods rich in caffeine and hypertension is based on the extensive use of caffeinated drinks, particularly coffee, in modern societies. However, epidemiological studies have not found a consistent relationship between dietary caffeine intake and the incidence of hypertension (Smith *et al.*, 2003). An explanation for the lack of such a relationship is that regular caffeine consumption is thought to lead to complete tolerance of its effects on blood pressure (Myers and Reeves, 1991).

Therefore, a question that emerges from our results concerning blood pressure and hypertension and guaraná ingestion is whether these results are related to the development of tolerance to caffeine or whether the association is due to the existence of chemical interactions between that compound with other chemicals present in guaraná, including catechins. Evidence from robust longitudinal studies such as the Framingham Heart Study suggests that there is a significant negative association between the consumption of caffeinated coffee and cardiovascular events, i.e. lower risk of cardiovascular mortality heart valve disease development or progression in older Framingham subjects without moderate and severe hypertension (Greenberg *et al.*, 2008). A recent study (Chen *et al.*, 2010) examined the relationship between sugar-sweetened beverages, including coffee, and blood pressure in a prospective analysis that included 810 subjects. The authors observed that reduction of sugar in such beverages caused a

reduction in blood pressure. The authors noticed no association between caffeine intake and blood pressure.

It is clear that hypertension, obesity and metabolic syndrome are common pathophysiological aspects that are directly impacted by nutritional status. Excessive energy intake and obesity are major causes of hypertension. Obesity is associated with increased activity of the renin-angiotensin-aldosterone pathway and the sympathetic nervous system, as well as with mineralocorticoid activity, insulin resistance, salt-sensitive hypertension, excess salt intake and reduced kidney function (Savica *et al.*, 2010).

Recently, Namkung *et al.* (2010) found that tannic acid and the related gallotannins present in green tea and red wine exhibited an inhibitory effect on Ca^{2+} -activated Cl^- channels (CACCs). The authors concluded that gallotannins are potent CACCs inhibitors whose biological activity provides a potential molecular basis for the cardioprotective and antisecretory benefits of red wine and green tea. Therefore, there is a need for the performance of complementary studies in order to evaluate whether the tannins and catechins present in guaraná have similar effects on blood pressure.

In addition to examining the prevalence of metabolic disorders, we also investigated whether habitual intake of guaraná exhibited an impact on components of oxidative metabolism. It was decided to investigate this as previous evidence has shown that polyphenols (such as catechins) present in beverages such as green tea and guaraná exhibit antioxidant and antiinflammatory properties (Mattei *et al.*, 1998; Basile *et al.*, 2005; Babu and Liu, 2008). This study describes an important result regarding the association between guaraná ingestion and AOPP levels.

Protein oxidation and glycosylation are post-translational modifications implicated in the pathological development of many age-related diseases (Zwart *et al.*, 2009). Changes in AOPP levels are connected to poor glycemic control, chronic disease, dyslipidemia and diabetic complications, particularly nephropathy (Cakatay, 2005).

A significant association was found between higher AOPP levels ($\geq 25 \mu\text{mol/L}$) and lack of guaraná consumption. It is important to note that our choice of the cut-off value ($\geq 25 \mu\text{mol/L}$) was based on a percentile distribution of AOPP values in our sample population and represented the first quartile. However, in the study by Selmeçci *et al.* (2005) that established reference values for AOPP in a student population aged 18–33 years this cut-off point lies approximately in the 3rd quartile. We believe that the discrepancy could be caused by age because our sample population was composed of elderly volunteers. A previous study performed by Pandey *et al.* (2010) reported that oxidative alterations in biomarkers of plasma protein oxidation such as protein carbonyls (PCO), plasma total thiol groups (ThG) and AOPP are age-dependent; with increased age, PCO and AOPP levels increase and ThG levels decrease. In an additional investigation performed by Pandey *et al.* (2010), healthy control subjects with a mean age of 58 ± 7 years exhibited an AOPP concentration of $63.64 \pm 25.23 \mu\text{mol/L}$, whereas the mean AOPP level in diabetic patients was significantly higher ($89.51 \pm 36.46 \mu\text{mol/L}$). It is of interest to point out that the mean AOPP value in our sample population was lower than that described by Pandey and

HABITUAL INGESTION OF GUARANÁ AND METABOLIC MORBIDITIES

collaborators regarding the healthy control group. A greater number of habitual guaraná drinkers exhibited low levels of AOPP, suggesting a protective effect of guaraná that is related to protein oxidative damage.

Studies investigating the association between AOPP levels and ingestion of phytotherapeutic beverages such as green tea have also been performed. Nakagawa *et al.* (2002) investigated the potential effects of green tea extract, a green tea tannin mixture and its components, on protein damage induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (a free radical generator) and glucose *in-vitro*. The authors reported that the green tea extract effectively conferred protection against protein damage and that this protection was most likely due to the presence of a tannin compound; these results suggest that green tea could be useful in the control of protein oxidation- and glycosylation-associated diseases.

Due to the fact that nitric oxide (NO) participates in such highly active metabolic and regulatory processes as hemostasis, fibrinolysis in platelets, vascular tone modulation and blood pressure homeostasis, plasma nitrite, an indirect measure of NO release, was evaluated in our sample population. Although the nitrite levels described here are similar to those in other adult populations (Ghasemi *et al.*, 2010), no association was found between guaraná ingestion and plasma levels of nitrite or other oxidative biomarkers.

Therefore, although previous studies have described antioxidant properties of guaraná based on results obtained from *in vitro* assays and other experiments (Mattei *et al.*, 1998; Basile *et al.*, 2005; Jimoh *et al.*, 2007) the effect of guaraná on such markers of oxidative metabolism as AOPP levels in humans has, to our knowledge, never before been described.

It is important to comment on the methodological limitations of this study. Because this investigation used a cross-sectional design, it is not possible to determine whether the associations found represent cause-and-effect relationships. As we selected the case-control subjects of the population and, as in the previous investigation in which 1808 subjects were analysed, a higher prevalence of guaraná consumption was found in males compared with females, thus it was decided to maintain this proportion in the investigation described here.

There is no previous reference to explain the higher consumption of guaraná by males compared with females. However, guaraná is traditionally consumed in the region for its antifatigue and aphrodisiac properties. Therefore, the labor-intensive fishing and agricultural work commonly performed by males is potentially the culturally associated reason behind the higher consumption of guaraná. Thus, in our study we opted to maintain this proportion in the case-control groups and to evaluate the possible influence of gender using statistical tools such as multivariate analyses.

Furthermore, other variables exist that were not investigated in this population, such as physical activity and genetic factors, and these variables potentially influence the results to some extent. However, the results described here are intriguing, and are in concordance with previous studies in various experimental models, and moreover are similar to results obtained with other herbal beverages such as green tea.

In this context, we believe that, despite the methodological limitations, the results described in this study suggest that habitual guaraná ingestion contributes positively to the prevention of various metabolic disorders in the elderly.

Acknowledgements

We are grateful to the Maués governmental team for helping us with data collection and especially to Mr Odivaldo Miguel de Oliveira Paiva, Mrs Andréa dos Santos Nascimento, Mrs Shirley Antunes, Mrs Chrystianne Salles Teixeira, Miss Jenice Coimbra, Mr Deni Dorzani and Mr Ildnave Trajano. We are also grateful to the Amazonas ESF-SUS and the research team that assisted in data collection, composed of Elorides Brito, Jefferson da Silva Souza, Kenya Motta, Shirley Santos and Karin Viegas and to the UFSM research team that helped with the biochemical analyses. This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) number: 300969/2009-0 and 471233/2007-2, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**: 121–126.
- Ângelo PCS, Nunes-Silva CG, Brígido MM *et al.* 2008. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Reports* **27**: 117–124.
- Babu PV, Liu D. 2008. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem* **15**: 1840–1850.
- Basile A, Ferrara L, Pezzo MD *et al.* 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J Ethnopharmacol* **31**: 32–36.
- Basu A, Du M, Sanchez K *et al.* 2011. Green tea minimally affects biomarkers of inflammation in obese subjects with metabolic syndrome. *Nutrition* **27**: 206–213.
- Basu A, Sanchez K, Layva MJ *et al.* 2010. Green tea supplementation affects body weight, lipids, and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome. *J Am Coll Nutr* **29**: 31–40.
- Bellardo F, Martelli A, Valle MG. 1985. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) and *Cola* spp. samples. *Z Lebensm Unters Forsch* **1180**: 398–401.
- Bérubé Parent S, Pelletier C, Doré J, Tremblay A. 2005. Effects of encapsulated green tea and Guaraná extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. *Br J Nutr* **94**: 432–436.
- Boozer CN, Nasser JA, Heymsfield SB, Wang V, Chen G, Solomon JL. 2001. An herbal supplement containing Ma Huang-Guaraná for weight loss: a randomized, double-blind trial. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**: 316–324.
- Boveris A, Cadenas E. 1997. Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In *Oxygen, Gene Expression and Cellular Function*, Clerch L, Massaro D (eds). Marcel Dekker: New York, **105**: 1–25.
- Bydlowski SP, D'Amico EA, Chamone DA. 1991. An aqueous extract of guaraná (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. *Braz J Med Biol Res* **24**: 421–424.
- Bydlowski SP, Yunker RL, Subbiah MT. 1988. A novel property of an aqueous guaraná extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation *in vitro* and *in vivo*. *Braz J Med Biol Res* **21**: 535–538.
- Cakatay U. 2005. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diab Metab* **31**: 551–557.

- Campos AR, Barros AI, Albuquerque FA, M Leal LK, Rao VS. 2005. Acute effects of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. *Phytother Res* 19: 441–443.
- Chandra S, De Mejia Gonzalez E. 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Agric Food Chem* 52: 3583–3589.
- Chen L, Caballero B, Mitchell DC, Loria C, Lin PH, Champagne CM, Elmer PJ, Ard JD, Batch BC, Anderson CA, Appel LJ. 2010. Reducing consumption of sugar-sweetened beverages is associated with reduced blood pressure: a prospective study among United States adults. *Circulation* 121(22): 2398–2406.
- Cigolle CT, Blaum CS, Halter JB. 2009. Diabetes and cardiovascular disease prevention in older adults. *Clin Geriatr Med* 25: 607–641.
- Da Fonseca CA, Leal J, Costa SS, Leitão AC. 1994. Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mutat Res* 321: 165–173.
- Elman GL. 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 589: 70–77.
- Espinola EB, Dias RF, Mattai R, Carlini EA. 1997. Pharmacological activity of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *J Ethnopharmacol* 55: 223–229.
- Feng L, Gwee X, Kua EH, Ng TP. 2010. Cognitive function and tea consumption in community dwelling older Chinese in Singapore. *J Nutr Health Aging* 14: 433–438.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499–502.
- Fukumasu H, Da Silva TC, Avanzo JL et al. 2006. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 233: 158–164.
- Ghasemi A, Zahediast S, Azizi F. 2010. Reference values for serum nitric oxide metabolites in pediatrics. *Nitric Oxide* 23: 264–268.
- Greenberg JA, Chow G, Ziegelstein RC. 2008. Caffeinated coffee consumption, cardiovascular disease, and heart valve disease in the elderly (from the Framingham Study). *Am J Cardiol* 102: 1502–1508.
- Grundy SM. 2005. Metabolic syndrome: therapeutic considerations. *Handb Exp Pharmacol* 170: 107–133.
- Imai K, Nakachi K. 1995. Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *Br Med J* 10: 693–696.
- Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Tamakoshi A; JACC Study Group. 2006. The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med* 144: 554–562.
- Jacobs EJ, Newton CC, Wang Y et al. 2010. Waist circumference and all-cause mortality in a large US cohort. *Arch Intern Med* 170: 1293–1301.
- Jimoh FO, Sofidiya MO, Afolayan AJ. 2007. Antioxidant properties of the methanol extracts from the leaves of *Paullinia pinnata*. *J Med Food* 10: 707–711.
- Kennedy DO, Haskell CF, Wesnes KA, Scholey AB. 2004. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guaraná (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. *Pharmacol Biochem Behav* 79: 401–411.
- Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K et al. 2006. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *J Am Med Assoc* 296: 1255–1265.
- Leite RP, Wada RS, Monteiro JC, Predes FS, Dolder H. 2010. Protective effect of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) pre-treatment on cadmium-induced damages in adult Wistar testis. *Biol Trace Elem Res* [Epub ahead of print].
- Lima WP, Camevali LC JR, Eder R, Costa Rosa LF, Bacchi EM, Seelaender MC. 2005. Lipid metabolism in trained rats: effect of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. *Clin Nutr* 24: 1019–1028.
- Mattai R, Dias RF, Espinola EB, Carlini EA, Barros SB. 1998. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity *in vitro*. *J Ethnopharmacol* 60: 111–116.
- Morabito F, Cristani M, Saija A et al. 2004. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators Inflamm* 13: 381–383.
- Myers MG, Reeves RA. 1991. The effect of caffeine on daytime ambulatory blood pressure. *Am J Hypertens* 4: 427–431.
- Nakagawa T, Yokozawa T, Terasawa K, Shu S, Juneja LR. 2002. Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *J Agric Food Chem* 50: 2418–2422.
- Namkung W, Thiagamajah JR, Phuan PW, Verkmann AS. 2010. Inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels by gallotannins as a possible molecular basis for health benefits of red wine and green tea. *FASEB J* 24: 4178–4186.
- Niu K, Hozawa A, Kuriyama S et al. 2009. Green tea consumption is associated with depressive symptoms in the elderly. *Am J Clin Nutr* 90: 1615–1622.
- Ohtawa H, Ohishi H, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358.
- Opala T, Rzymiski P, Ptschel I, Wilczak M, Wozniak J. 2006. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *Eur J Med Res* 11: 343–350.
- Otobone FJ, Sanches AC, Nagae R et al. 2007. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Res* 21: 531–535.
- Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. 2010. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 43: 508–511.
- Pereira AC, Olivon VC, De Oliveira AM. 2010. Impaired calcium influx despite hyper-reactivity in contralateral carotid following balloon injury: eNOS involvement. *Eur J Pharmacol* 642: 121–127.
- Pinheiro CE, De Oliveira SS, Da Silva SM, Poletto MI, Pinheiro CF. 1987. Effect of guaraná and *Stévia rebaudiana* Bertoni (leaves) extracts, and stevioside, on the fermentation and synthesis of extracellular insoluble polysaccharides of dental plaque. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1: 9–13.
- Ribeiro EE, Ribeiro EAM, Brito E et al. 2010. Health status of Brazilian riverine elderly living in the Amazon Rainforest. *Pan American J Pub Health*. Print go ahead.
- Sasazuki S, Kodama H, Yoshimasu K et al. 2000. Relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Ann Epidemiol* 10: 401–408.
- Savica V, Bellinghieri G, Kopple JD. 2010. The effect of nutrition on blood pressure. *Annu Rev Nutr* 30: 365–401.
- Selmeci L, Seres L, Antal M, Lukács J, Regöly-Mérei A, Acsády G. 2005. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med* 43: 294–297.
- Smith L, Payne JA, Sedeek MH, Ganjar JP, Khalil RA. 2003. Endothelin-induced increases in Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction are enhanced during high-salt diet. *Hypertension* 41: 787–793.
- Smith N, Atroch AL. 2007. Guaraná's journey from regional tonic to aphrodisiac and global energy drink. *Evid Based Complement Alternat Med* 7: 279–282.
- Thielecke F, Boschmann M. 2009. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome – a review. *Phytochemistry* 70: 11–24.
- Tonks DB. 1972. *Quality Control in Clinical Laboratories*. Warner-Chilcott Laboratories: Scarborough.
- World Health Organization. 1998. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*. Report of a WHO Consultation on Obesity. World Health Organization: Geneva.
- Yamaguti-Sasaki E, Ito LA, Carreira VC et al. 2007. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules* 12: 1950–1963.
- Yung LM, Leung FP, Wong WT et al. 2008. Tea polyphenols benefit vascular function. *Inflammopharmacology* 16: 230–234.
- Zwart SR, Kala G, Smith SM. 2009. Body iron stores and oxidative damage in humans increased during and after a 10- to 12-day undersea dive. *J Nutr* 139: 90–95.

4.2 Artigo 2

4.2.1 Efeito *in vitro* e *in vivo* do Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) nos níveis de citocinas em humanos

The *in vitro* and *in vivo* effect of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) on human cytokines levels

Cristina da Costa Krewer, Leila Sulleiman, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Euler Esteves Ribeiro, Clarice Pinheiro Mostardeiro, Marco Aurélio Echart Montano, Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Guilherme Bresciani, Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, January 11, 2012.

Dear Editor

Journal of Natural Products

I would like to submit the manuscript "In vitro effect of guaraná (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) extract on viability and cytokine levels of human T-lymphocytes" by Cristina da Costa Krewer, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Euler Esteves Ribeiro, Clarice Pinheiro Mostardeiro, Marco Aurélio Echart Montano, Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Guilherme Bresciani and Ivana Beatrice Mânica da Cruz for consideration for possible publication in the Journal of Natural Products. This manuscript has not been published or accepted for publication.

Sincerely



Ivana Beatrice Manica da Cruz

Corresponding Author

Submitted to Journal of Natural Products

The in vitro and in vivo effect of guaraná (Paullinia cupana Mart.) on human cytokines levels

Journal:	<i>Journal of Natural Products</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Krewer, Cristina; Universidade Federal de Santa Maria, Morfologia Sulleiman, Leila; Universidade Federal de Santa Maria, Duarte, Marta Maria; Universidade Federal de Santa Maria, Ribeiro, Euler; Universidade Aberta da Terceira Idade, Mostardeiro, Clarice; Universidade Federal de Santa Maria, Montano, Marco Aurelio; Universidade do Oeste de Santa Catarina, da Rocha, Maria Izabel; Universidade Federal de Santa Maria, Bresciani, Guilherme; Universidade Federal de Santa Maria, Cruz, Ivana; Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde

SCHOLARONE™
Manuscripts

ACS Paragon Plus Environment

The *in vitro* and *in vivo* effect of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) on human cytokines levels

Cristina da Costa Krewer¹, Leila Sulleiman², Marta Maria Medeiros Frescura Duarte², Euler Esteves Ribeiro³, Clarice Pinheiro Mostardeiro⁴, Marco Aurélio Echart Montano⁵, Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha², Guilherme Bresciani², Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2,3,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria

² Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

³ Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas

⁴ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria

⁵ Universidade do Noroeste do Estado de Santa Catarina. Xanxeré SC. Brazil

* **Corresponding author:** Ivana B M da Cruz

Address: Av Roraima 1000, Prédio 19, Laboratório de Biogenômica-UFSM
Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code 97105-900.

Phone: 55-55-32208736 Fax: 55-55-32208239

Email: ibmcruz@hotmail.com

ABSTRACT

Previous studies suggested that guaraná (*Paulinia cupana*) has some anti-obesogenic effect. Considering that obesity is related to a low grade inflammatory condition and other immune dysfunctions, the present study analyzed *in vitro* and *in vivo* guaraná effects on peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cytokine levels (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ and IL-10). Guaraná hydro-alcoholic extract was produced and the main bioactive compounds (caffeine, theobromine, total catechins and tannins) were determined. The *in vitro* protocol was performed using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) treated with and without guaraná, glucose (15 mM) and insulin (1 mU/mL). Afterwards cytokines were determined using ELISA immunoassay. The *in vivo* protocol measured serum cytokines of 14 healthy adult subjects supplemented for 14 days with guaraná (90 mg/day). The cytokine levels were evaluated in 0; 7 and 14 days. Mean cytokine concentrations in the PBMCs control group were: IL-1 β = 59.66 \pm 37.63 pg/mL, IL-6 = 95.33 \pm 24.58 pg/mL, TNF- α = 109.67 \pm 34.50 pg/mL, IFN- γ = 46.0 \pm 60.9 pg/mL, and IL-10 = 46.0 \pm 10.53 pg/mL. The inflammatory cytokine levels decreased in the presence of guaraná plus glucose and/or insulin, whereas the IL-10 cytokine increased its levels. In the individuals when compared to baseline values, the IL-1 β ($F=9.12$, $p=0.006$) and IFN- γ ($F= 7.64$, $p=0.007$) decreased after 14 days of guaraná supplementation. TNF- α ($F= 10.82$, $p=0.003$) and IL-6 ($F=10.82$, $p=0.002$) decreased after seven treatment days. Conversely, the IL-10 levels ($F=4.95$, $p=0.027$) increased after seven days of guaraná supplementation. These results suggest effect of guaraná lowering human cytokines, probably due the caffeine and catechins present in its composition.

INTRODUCTION

Guaraná (*Paullinia cupana*, Mart. var. *sorbilis*) is a rainforest vine that was domesticated in the Amazon and has long been used by the Amazonians to increase awareness and energy since its seeds contain more caffeine than any other plant in the world (2-8%) [1]. Additionally, guaraná presents other bioactive compounds such as methylxanthines (theobromine and theophylline) and catechins [1,2]. Previous studies suggested that guaraná positively affects the lipid metabolism, [3] enhances weight loss [4,5] and increases basal energy expenditure [6].

An epidemiological study recently performed by our group in the Amazon Riverine region (Maués, Brazil) showed a significant association between habitual guaraná ingestion and hypertension, obesity and metabolic syndrome (MS) prevalence decrease [7]. These results corroborated previous investigations that suggested an anti-obesogenic effect of guaraná [4,5,6]. However, we need to elucidate the potential causal mechanisms associated with this metabolic effect.

Obesity typically causes metabolic deregulation, elevates fatty acids, and increases pro-inflammatory adipokines secretion. Left untreated, these conditions cause lipotoxicity, low grade inflammation, and other immune dysfunctions, hypertension, type 2 diabetes, atherosclerosis, and cardiovascular diseases [8,9,10]. Therefore, we tested the *in vitro* and *in vivo* guaraná effect on human pro-inflammatory cytokines [interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β), interferon-gamma (IFN- γ)] and anti-inflammatory interleukin 10 (IL-10) modulation that are associated with low grade obesity inflammation process.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1 The *in vitro* effect of the guaraná extract on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cytokine levels

Mean cytokine concentrations of the Group C were: IL-1 β = 59.66 \pm 37.63 pg/mL, IL-6=95.33 \pm 24.58 pg/mL, TNF- α =109.67 \pm 34.50 pg/mL, IFN γ =146.0 \pm 60.9 pg/L, and IL-10= 46.0 \pm 10.53 pg/mL. *In vitro* treatments supplemented with the guaraná extract presented a significant effect on cytokine levels whereas the treatments without guaraná (G, I and GI) presented similar cytokine levels than in Group C (Figure 1). Therefore, the increase in the buffer glucose concentration or the addition of insulin is not sufficient to change PBMCs cytokine levels.

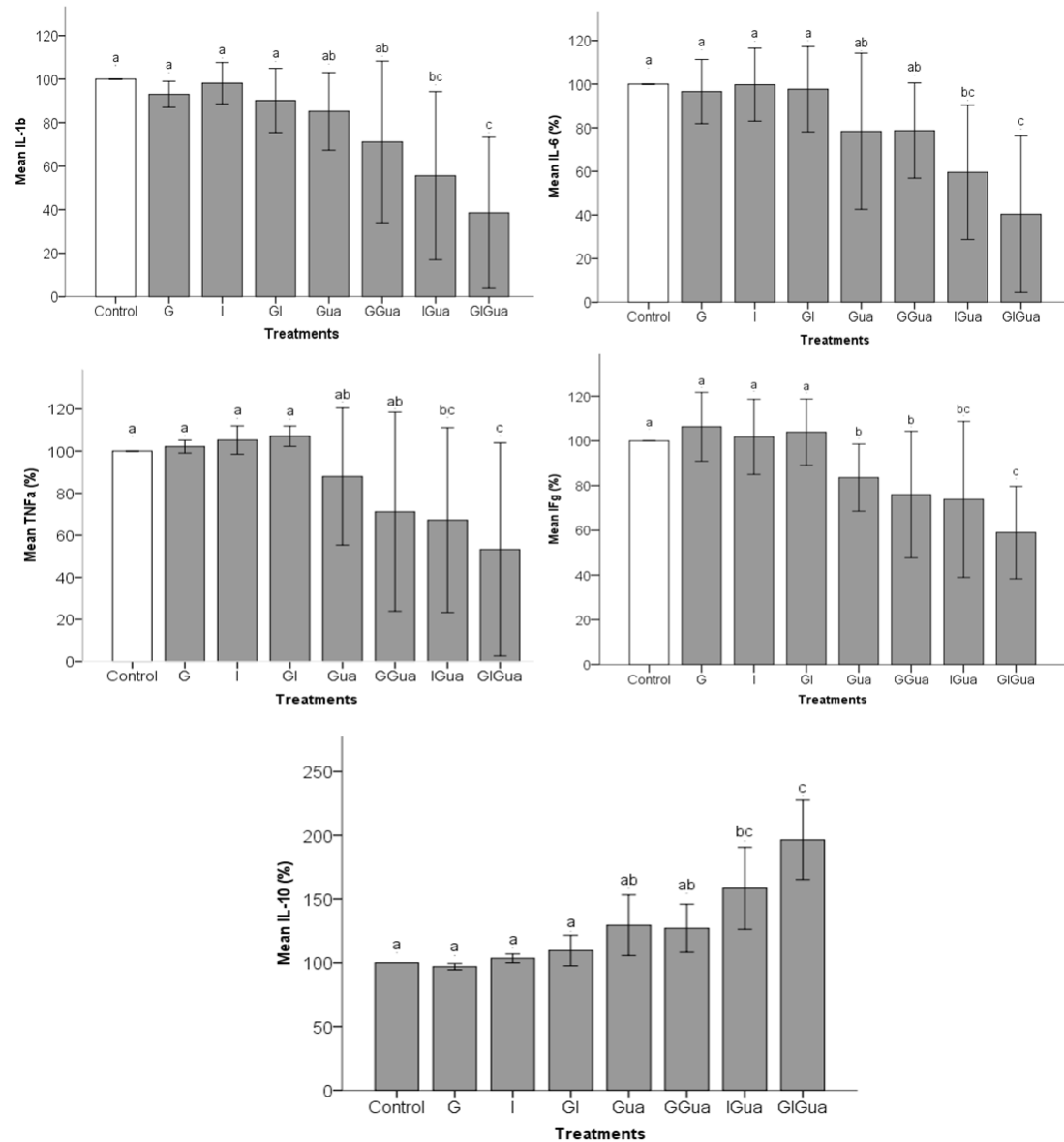


Figure 1 PBMC cytokines levels comparison after 6h treatment with glucose (G), insulin (I), guarana (Gua), guarana plus glucose (GGua), guarana plus Insulin (GIGua) and Guarana plus glucose and insulin (GI). Results presented in percent (%) related to cytokines levels observed in control groups. Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$) from Anova One-Way test followed by Dunnett's post hoc test.

Guaraná supplementation influenced the cytokine levels showing the occurrence of interaction between guaraná, glucose and insulin in cytokine production. The IL-1 β and IL-6 levels decreased significantly in GGua, IGua and GIGua treatments when compared to Group C. The level of TNF- α decreased just in the treatments that have concomitantly insulin and guaraná supplementation (IGua and GIGua). Levels of IFN- γ decreased in all guaraná treatments (Gua, GGua, IGua and GIGua groups). On the other hand the levels of IL-10 antiinflammatory cytokine significantly increased in IGua and GIGua treatments when compared to Group C.

2.2The *in vivo* effect of the guaraná extract on serum cytokine levels

Fasting baseline cytokine levels of subjects who participated of the *in vivo* protocol are described in Table 1. Guaraná supplementation changed the cytokine levels, as can be seen in Figure 2. When compared to baseline values, the IL-1 β ($F=9.12$, $p=0.006$) and IFN- γ ($F= 7.64$, $p=0.007$) decreased after 14 days of guaraná supplementation. The levels of TNF- α ($F= 10.82$, $p=0.003$) and IL-6 ($F=10.82$, $p=0.002$) decreased after seven days of guaraná supplementation.

Table 1 Baseline cytokine levels of adult healthy subjects (pg/mL).

Cytokines	Mean \pm SD	Minimum-Maximum
Interleukin 1 β	111.1 \pm 15.7	89 -143
Interleukin 6	135.8 \pm 5.4	128-146
TNF- α	156.3 \pm 7.8	140-169
IFN- γ ,	221.2 \pm 20.6	189-256
Interleukin 10	57.4 \pm 7.4	41-69

SD= standard deviation

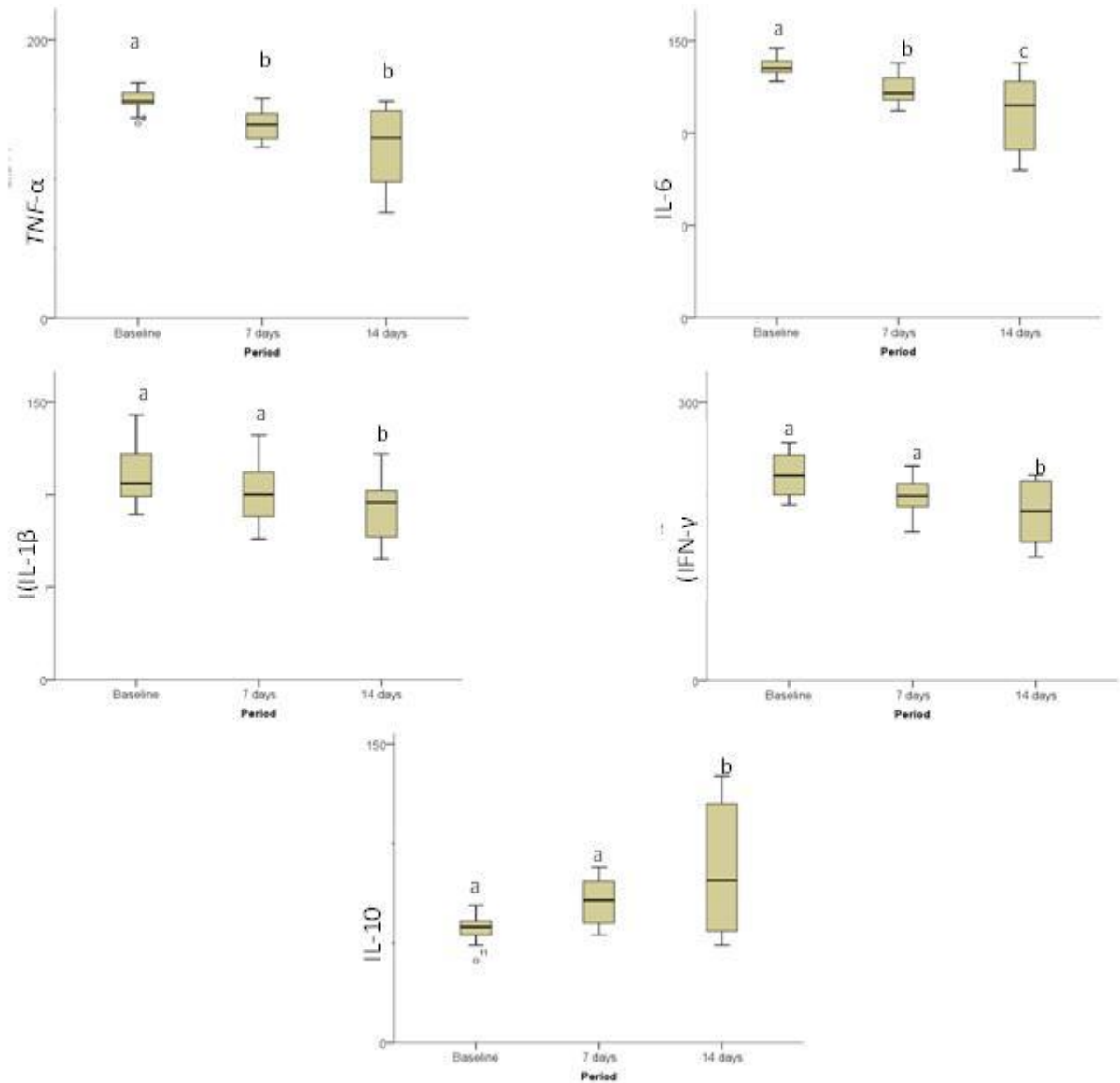


Figure 2 Individual cytokines plasmatic levels (pg/mL) comparison after 7 and 14 days of guaraná supplementation. Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$) from Anova One-Way test followed by Dunnett's post hoc test.

Conversely, the IL-10 levels ($F=4.95$, $p=0.027$) increased after seven days of guaraná supplementation when compared to baseline values before the treatment.

Results described here from the *in vitro* and *in vivo* protocols showed the potential effect of guaraná extract on human inflammatory and anti-inflammatory cytokines. However, with the *in vitro* protocol, the guaraná effect was dependent on glucose and insulin median conditions. This interaction among guaraná, glucose and insulin on PBMCs cytokine levels suggests an immunomodulation effect. On the other hand, after 14 days of guaraná supplementation, we observed a significant decrease in inflammatory cytokines and increase of IL-10, an anti-inflammatory cytokine.

The guaraná effect on cytokine modulation is probably related to caffeine and/or the catechin content presented in this fruit, specifically in the extract tested here. Studies have indicated that caffeine has immunomodulatory effects like other members of the methylxanthine family [11]. The study performed by Horrigan et al. [12] using diluted human whole blood preincubated with caffeine, showed suppression of TNF- α by this compound.

Epidemiological studies also suggest immunomodulation related to caffeine. Chavez Valdez et al. [13] performed a cross-sectional study that in a cohort of pre-term infants treated for one week with caffeine (<20 $\mu\text{g/mL}$) determined a decrease in IL-1 β , IL-6 and TNF- α peripheral blood concentrations. Other studies in mice that were fed high-fat diets, coffee showed an important anti-inflammatory response by differential gene expression that could reduce the risk of metabolic syndrome [14].

Catechins are the predominant flavonoids and are mainly comprised of, epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) and epicatechin (EC) [15].

Previous studies also described the effect of catechins or foods rich in these compounds such as green tea on human PBMC cytokines. The study performed by Neyestani et al. [16] showed the suppressive effect of black tea extract on human IL-1 β , TNF- α and IL-6 in PBMC cytokine secretions.

Other investigations explained that epigallocatechin gallate (EGCG) increased IL-10 levels in obese and lean human PBMCs cultures. The EGCG is considered a potent anti-inflammatory agent and an active ingredient of green tea and other plants, including guaraná [17]. In experimental conditions, there is evidence that EGCG inhibits the migration and adhesion of monocytes. The authors who described these results considered that the inhibitory effects of EGCG on the monocyte function should be as a promising new anti-inflammatory response with a potential therapeutic role in the treatment of inflammation-dependent diseases [18].

Currently, it is well-known that obesity is clearly associated with alterations in the immune and inflammatory functions as manifested by an abnormal regulation of serum inflammatory cytokines in obese subjects. Some authors, such as O'Rourke et al. [19], suggest that the obesity-related alterations in immunity are also reflected in the peripheral blood lymphocyte function. Our results corroborate this hypothesis as we found differences in PBMC cytokine levels related to guaraná, glucose and insulin treatments.

Unfortunately, the *in vivo* mechanisms of PBMCs interactions to glucose and insulin are not totally elucidated. There are, however, evidences that PBMCs from diabetic patients and from healthy subjects exposed to different glucose concentrations have presented different responses [20].

It is important to ponder some considerations associated with our methodological design. We conducted an exploratory *in vitro* and *in vivo* study to observe if the guaraná could differentially modulate the inflammatory cytokines that are related to obesity and metabolic dysfunctions. Although we found positive results indicating a direct effect of guaraná on inflammatory metabolism, additional investigations with a more robust experimental design, preferentially via randomized, double-blind and crossover case-control studies need to be performed to confirm these results. Complementary investigations analysing if the guaraná supplementation can help obese subjects to decrease the inflammatory low grade conditions also need to be realized.

However, even with these methodological limitations in the present study, we provide novel, preliminary data suggesting that guaraná have an effect on anti-inflammatory human cytokine modulation.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 Drugs and Reagents

The drugs and reagents used in the experiment were as follows: ODS-3 column, supplied by Phenomenex Prodigy (Torrance, CA, USA); caffeine, theobromine, catechins and insulin, RPMI Medium (RPMI, 1640); phytohematoglutin (PHA), HEPES by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA); fetal bovine serum (FCS), heat-inactivated horse serum, penicillin and streptomycin, purchased from Gibco

(Grand Island, NY, USA); Vacutainer® by BD Diagnostics (Plymouth, UK), and cytokines kits to ELISA immunoassay by Biomyx Technology (San Diego, CA, USA).

3.2 Guaraná extract characterization

P. cupana powder was supplied by EMBRAPA-Amazônia Ocidental located in Maués, Amazonas State, Brazil. The guaraná sample was preserved in dry conditions at 4°C until the extract preparation that was performed to use in the *in vitro* protocol or to human supplementation in the *in vivo* protocol. The guaraná extract was prepared as follows: 300 g of powdered guaraná seeds were extracted using 70% ethanol and 30% distilled water in a 1:10 proportion (3000 ml) for two weeks at room temperature. After removing the ethanol, the remaining solid material was lyophilized and stored at 4°C until the experiments were running. Previously obtained powder extract was further diluted in an HBSS buffer prepared at a concentration of 5 µg/ml to use in PBMCs treatments.

The main bioactive compounds presented in guaraná extract were evaluated by the chromatographic analysis performed on a HPLC system based on UV absorbance at 272 nm. A 150 mm × 4.6 mm ODS-3 column (5 µm particle size) was used for the separation (Carlson and Thompson, 1998). Stock solutions of caffeine, theobromine and catechins (250µg/mL) were prepared and stored at 5°C. Working level standards were prepared by diluting the stock solutions in its mobile phase at the following ratios: 200 µL to 100 mL, 400 µL to 100 mL, 2 mL to 100 mL, 4 mL to 100 mL, 8 mL to 100 mL. The last concentration standard was designed to achieve a detection limit of 0.005% based on a 1 g sample diluted to 100 mL (LOD = 0.05

mg/g). A guaraná sample extract was filtered through a 0.45 µm filter into an auto sampler vial for analysis. The HPLC conditions were: flow rate, 1 mL/minute; mobile phase A, 0.1% H₃PO₄ in water; mobile phase B, 100% ACN. The chromatographic system was calibrated with at least a five-point standard curve for each set of samples analyzed. Standards were run after every four samples that were read. Excellent reproducibility was seen in the standards; typically the R value for the calibration curve was 0.9999 or higher.

Tannin content in the guaraná extract was measured spectrophotometrically by the modified vanillin method, described by Ferreira & Nogueira [21]. An estimation of condensed tannin in the samples was carried out in triplicate and the contents were expressed as milligram equivalents of gallic acid/mL. The equation obtained for the standard curve of gallic acid in the range of 2.5-20 mg/mL was $y = 0.0434x + 0.1359$ ($R^2 = 0.9819$).

Guaraná extract used in the experiments presented caffeine=12.240 mg/g theobromine=6.733 mg/g and total catechins=4.336 mg/g concentrations. The condensed tannin concentration was 16 mg/g.

3.3 *In vitro* guarana effect on PBMC cytokines levels

The *in vitro* evaluation of the guaraná effect on PBMC cytokine levels was performed in the presence or absence of additional glucose and insulin culture mean supplementation. First, we produced a PBMC culture from peripheral blood samples from three healthy human volunteers collected after 12 h of overnight fasting by

venipuncture, using top Vacutainer® tubes with heparin. Human peripheral blood cells a 72h PBMCs culture were performed using PHA as mitogen.

Peripheral whole blood (1 ml) was added for each glass containing 5 ml of RPMI 1640 lymphocytes culture medium with 10% (FCS), and 1% penicillin/streptomycin and PHA (Hedekov, 1968). Cells were maintained in a suspension culture at 37°C in a 5% humidified CO₂ atmosphere for 72 h without guaraná, glucose or insulin supplementation. In this phase we did not add supplementation since the presence of these compounds could affect the cytokine production.

PBMCs cultures were centrifuged for 10 min (3 rpm) and washed twice with a HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) buffer containing 118 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 10 mM d-glucose, 20 mM HEPES, 0.4 mM CaCl₂, pH 7.4. Afterwards, sample cells were transferred to the same buffer with and without the glucose, insulin and guaraná supplemental treatments: (1) Control group (C) = a group cell without supplementation; (2) HBSS plus glucose supplementation (15 mM, G); (3) HBSS buffer and insulin (1 mU/mL) supplementation (I); (4) HBSS buffer and 15 mM glucose and insulin supplementation (IG); (5) HBSS buffer and guaraná extract (5 µg/mL) (Gua); (6) guaraná and glucose (GGua); (7) guaraná and insulin (IGua), and (8) guaraná, glucose and insulin (GIGua) supplementation.

The choice of guaraná extract concentration was based on a previous study performed by our team that found an *in vitro* antioxidant effect of guaraná against nitroprusside oxide intoxication [22]. The PBMCs were maintained during the treatments for six hours. The PBMC concentration in all treatments was 5×10^7 cells/ml. Samples were then stored at -20°C until the cytokines analysis took place. All

treatments were performed in triplicate. The main experimental procedures are described below.

3.4 The *in vivo* guaraná effect on serum cytokines levels

This protocol is part of a project approved by the Ethical Board (n°23081.015838/2011-10) of Universidade Federal de Santa Maria and all subjects provided informed consent. We performed an additional protocol to test if a daily guaraná extract supplement could affect blood inflammatory and anti-inflammatory cytokine modulation in a short period (14 days). We choose adults who were not obese, non-smokers, sedentary and without chronic degenerative diseases or dysfunctions that could affect the cytokine modulation. All subjects were determined to be healthy by history, physical examination and basic laboratory indices before inclusion into the study protocol. Volunteers were invited to participate in the study and were prospectively enrolled at FARMABIZ Laboratory. The participants of this protocol (7 male and 7 female) live in a Southern Brazilian region where guaraná consumption is not as habitual as that of people in the Amazonas State. The mean age was 37.0 ± 8.3 years old (minimum 23 and maximum 49 years), and the body mass index (BMI) was 25.2 ± 1.9 Kg/m² (minimum 22.8 and maximum 29.8 Kg/m²).

Although the amounts of guaraná recommended in popular medicine is 500 mg/day, there are no studies showing if this dosage is efficient or safe. On the other hand, we considered that this concentration could produce cafeinism symptoms in some persons; these conditions could cause collateral effects [23] and the discontinuity of subjects during the treatment period. Therefore, using two studies as

our reference, we determined the minimal guaraná dosage to be administered was 90 mg/day [24,25]. The concentration of bioactive compounds present in each capsule containing guaraná was 12% caffeine, 6% theobromine and 3.9% of catechins) by dry weight.

Subjects were taking no medications, and abstained from caffeine, ethanol, and fruit juices during the study. After a minimum seven days wash-out period to adjust the nutritional conditions of all samples, the subjects were provided a 14 day supply of guaraná extract capsules. The subjects took two capsules one time each day at 8:00-9:00 AM.

3.5 Cytokines analysis

The cytokines IL- β , IL-6, TNF- α , IFN- γ and IL-10 were analyzed as previously described by Duarte et al. [26] using ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Due to donor variation in cytokine production, we compared the cytokine levels observed in each treatment using a percentage relative to the C group. Similar analysis was previously used and described by Stølevik et al. [27].

3.6 Statistical Analysis

All analyses were carried out using the statistical package for social studies SPSS version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The cytokine levels observed in the

PBMCs C group were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The analysis of cytokine modulation from the *in vitro* protocol was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test to detect inter-group differences. The analysis of cytokine modulation from the *in vivo* protocol was performed by repeated measures (one-way ANOVA) that compares three or more matched groups, based on the assumption that the differences between matched values are Gaussian. The p values were two-tailed and the differences were considered to be statistically significant at $p \leq 0.05$.

4. ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the following Brazilian research agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process number: 300969/2009-0 and 471233/2007-2, Coordenação e Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). The authors express their gratitude for Thais Doeller Algarve and all of the other students of Laboratory of Biogenomic-UFSM for helping with the collection of these data.

5. REFERENCES

- [1] Smith, N., Atroch, A.L. Guaraná's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. *Evid. Based Complement. Alternat Med*, 2007, 7, 279-82.
- [2] Belliardo, F., Martelli, A., Valle, M.G. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) and Cola spp. samples. *Z Lebensm. Unters. Forsch.* 1985, 1180, 398-401.
- [3] Angelo, P.C., Nunes-Silva, C.G., Brígido, M.M., Azevedo, J.S., Assunção, E.N., Sousa, A.R., Patrício, F.J., Rego, M.M., Peixoto, J.C., Oliveira, W.P. Jr, Freitas, D.V., Almeida, E.R., Viana A.M., Souza, A.F., Andrade, E.V., Acosta, P.O., Batista, J.S., Walter, M.E., Leomil, L., Anjos, D.A., Coimbra, R.C., Barbosa, M.H., Honda, E., Pereira, S.S., Silva, A., Pereira, J.O., Silva, M.L., Marins, M., Holanda, F.J., Abreu, R.M., Pando, S.C., Gonçalves, J.F., Carvalho, M.L., Leal-Mesquita, E.R., da Silveira, M.A., Batista, W.C., Atroch, A.L., França, S.C., Porto, J.I., Schneider, M.P., Astolfi-Filho, S., Brazilian Amazon Consortium for Genomic Research (REALGENE). Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. *Plant. Cell Rep*, 2008, 27, 117-24.
- [4] Lima, W.P., Carnevali, L.C. Jr., Eder, R., Costa, Rosa, L.F., Bacchi, E.M., Seelaender, M.C. Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. *Clin Nut*, 2005, 24, 1019-28.
- [5] Boozer, C.N., Nasser, J.A., Heymsfield, S.B., Wang, V., Chen, G., Solomon, J.L. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2005, 25, 316-24.
- [6] Opala, T., Rzymiski, P., Pischel, I., Wilczak, M., Wozniak, J. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects—a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *Eur J Med Res*, 2006, 11, 343-50.
- [7] Bérubé-Parent, S., Pelletier, C., Doré, J., Tremblay, A. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate

and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. *British J Nutr*, 2005, 94, 432-6.

[8] Krewer, C.C, Ribeiro, E.E., Ribeiro, E.A., Moresco, R.N., da Rocha, M.I.U., Montagner, G.F.S., Machado, M.M., Viegas, K., Brito, E., Cruz, I.B. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. *Phytother Res*, 2011 doi: 10.1002/ptr.3437. [Epub ahead of print]

[9] Gade, W., Schmit, J., Collins, M., Gade, J. Beyond obesity: the diagnosis and pathophysiology of metabolic syndrome. *Clin Lab Sci*, 2010, 23, 51-61.

[10] Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993, 259, 87–91.

[11]van Asseldonk, E.J., Stienstra, R., Koenen, T.B., van Tits, L.J., Joosten, L.A., Tack, C.J., Netea, M.G. The effect of the interleukin-1 cytokine family members IL-1F6 and IL-1F8 on adipocyte differentiation. *Obesity*, 2010, 18, 2234-6.

[12] Horrigan, L.A., Kelly, J.P., Connor, T.J. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol Ther*, 2006, 111, 877-92.

[13] Horrigan, L.A., Kelly, J.P., Connor, T.J. Caffeine suppresses TNF- α production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Int Immunopharmacol*, 200, 4,1409-17.

[14] Chavez Valdez, R., Ahlawat, R., Wills-Karp, M., Nathan, A., Ezell, T., Gauda, E.B. Correlation between serum caffeine levels and changes in cytokine profile in a cohort of preterm infants. *J Pediatr*, 2011, 158, 57-64.

[15] Fukushima, Y., Kasuga, M., Nakao, K., Shimomura, I., Matsuzawa, Y. Effects of coffee on inflammatory cytokine gene expression in mice fed high-fat diets. *J Agric FoodChem*, 2009, 57, 11100-5.

[16] Yang, C.S., Landau, J.M. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr*, 2000, 130, 2409–2412.

- [17] Neyestani, T.R., Gharavi, A., Kalayi, A. Selective effects of tea extract and its phenolic compounds on human peripheral blood mononuclear cell cytokine secretions. *Int J Food Sci Nutr*, 2009, 60, 79-88.
- [18] Yun, J.M., Jialal, I., Devaraj, S. Effects of epigallocatechin gallate on regulatory T cell number and function in obese v. lean volunteers. *Br J Nutr*, 2010, 103, 1771-7.
- [19] Melgarejo, E., Medina, M.A., Sánchez-Jiménez, F., Urdiales, J.L. Epigallocatechin gallate reduces human monocyte mobility and adhesion in vitro. *Br J Pharmacol*, 2009, 158, 1705-12.
- [20] O'Rourke, R.W., Metcalf, M.D., White, A.E., Madala, A., Winters, B.R., Maizlin, I.I., Jobe, B.A., Roberts, C.T. Jr, Slifka, M.K., Marks, D.L. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*, 2009, 33, 978-90.
- [21] Daoud, A.K., Tayyar, M.A., Fouda, I.M., Harfeil, N.A. Effects of diabetes mellitus vs. in vitro hyperglycemia on select immune cell functions. *J Immunotoxicol*, 2009, 6, 36-41.
- [22] Ferreira, E. C., Nogueira, A. R. A. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrometry. *Talanta*, 2000, 51, 1-6.
- [23] Bittencourt, A., Cruz, I. B. M., Marinowic, D.R., Machado, D.C. Efeitos do extrato de *Paullinia cupana* (guaraná) em linhagem de fibroblastos NIH3T3. In: XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2010, Porto Alegre. XI Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2010.
- [24] Higgins, J.P., Tuttle, T.D., Higgins, C.L. Energy beverages: content and safety. *Mayo Clin Proc*, 2010, 85, 1033-41.
- [25] Bérubé-Parent, S., Pelletier, C., Doré, J., Tremblay, A. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. *Br J Nutr*, 2005, 94, 432-6.
- [26] de Oliveira Campos, M.P., Riechelmann, R., Martins, L.C., Hassan, B.J., Casa, F.B., Del Giglio, A. Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer

patients undergoing systemic chemotherapy. *J Altern Complement Med*, 2011, 17, 505-12.

[27] Gottlieb, M.G., da Cruz, I.B., Duarte, M.M., Moresco, R.N., Wiehe, M., Schwanke, C.H., Bodanese, L.C. Associations among metabolic syndrome, ischemia, inflammatory, oxidatives, and lipids biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95, 586-91.

[28] Stølevik, S.B., Nygaard, U.C., Namork, E., Granum, B., Pellerud, A., van Leeuwen, D.M., Gmuender, H., van Delft, J.H., van Loveren, H., Løvik, M. In vitro cytokine release from human peripheral blood mononuclear cells in the assessment of the immunotoxic potential of chemicals. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25, 555-62.

5 DISCUSSÃO

Inicialmente, o presente estudo mostrou que idosos do município de Maués, AM, que consomem habitualmente esta planta apresentam menor ocorrência de obesidade e SM do que aqueles que nunca ingerem guaraná na sua dieta. A investigação complementar aqui conduzida com protocolos *in vitro* e *in vivo* também descreveu ação do guaraná sobre marcadores inflamatórios. No caso, o guaraná diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentou os níveis de citocinas anti-inflamatórias. Portanto, o conjunto destes resultados sugere que o guaraná tem efeito anti-obesogênico e protetor da SM agindo tanto na modulação de fatores oxidativos, quanto inflamatórios.

Estes resultados corroboram a tendência contemporânea da população na busca de produtos naturais para tratamento e prevenção de enfermidades (KUCZMARSKI et al., 1994; HAN et al., 1997; HEYMSHELD et al., 1998). Vários estudos demonstram que a alimentação rica em produtos de origem vegetal traz benefícios à saúde, pois esses alimentos contêm compostos bioativos que agem em alvos fisiológicos específicos, interferindo nos processos patogênicos das doenças crônicas (SABATE, 2003; BASTOS et al., 2009). Nesse sentido, o guaraná assume papel de destaque, especialmente no Brasil e particularmente na região Norte do país, onde é ingerido de forma habitual. Considerando ainda as várias propriedades biológicas já descritas para esta planta, tornam-se pertinentes as pesquisas que visam determinar o efeito da sua ingestão na saúde dos indivíduos.

Os resultados dessa pesquisa demonstraram a associação da ingestão de guaraná com a redução na ocorrência de obesidade, SM e hipertensão arterial, bem como na modulação dos marcadores bioquímicos associados a essas enfermidades. Estes resultados estão em consonância com investigações prévias publicadas na literatura. Um dos primeiros estudos que evidenciou a atividade anti-obesogênica do guaraná foi conduzido por Boozer e colaboradores (2001), que demonstraram uma redução no peso e na quantidade de gordura corporal em indivíduos que receberam suplementação com guaraná e erva Ma Huang, em um ensaio de oito semanas, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo em 67 indivíduos. Neste mesmo

estudo, foi relatada diminuição nos níveis de triglicerídeos, e não foi observada diferença na pressão arterial das pessoas.

Berubé-Parent et al. (2005), avaliaram o efeito da ingestão de um composto associado de chá verde e guaraná, com concentrações fixas de guaraná (600 mg) e variadas de catequinas (90, 200, 300 e 400 mg e placebo) no gasto energético e na obesogênese. Foi feito um ensaio randomizado, duplo-cego, paralelo-cruzado, controlado por placebo em 14 homens saudáveis, não-fumantes, sedentários entre 20 a 50 anos com IMC de 20 a 27 kg/m². Cada voluntário permaneceu dentro de uma câmara metabólica durante 24 horas em cinco ocasiões separadas, onde recebeu cada um dos tratamentos. O gasto energético dos indivíduos aumentou cerca de 8% em relação ao placebo (750 kJ ou 186 kcal). A oxidação de macronutrientes, que indica gasto energético por meio do uso de gorduras e carboidratos corporais, também foi observada nos indivíduos tratados com os suplementos, mesmo no composto com menor concentração de catequinas. Após 24 h, não foi observado aumento significativo na pressão arterial sistólica, entretanto, ocorreu aumento na pressão arterial diastólica (em média de 5 mmHg).

Os efeitos biológicos do guaraná são atribuídos aos seus compostos bioativos, principalmente metilxantinas e catequinas. A cafeína, teobromina e teofilina são metilxantinas presentes em outros alimentos, como o café, o chá preto, verde e o chocolate. A cafeína é considerada um alcalóide xantina bloqueador do receptor da adenosina que possui propriedades psicoestimulantes (ARNAULD, 1987; HECKMAN et al., 2010), sendo também denominada guaranina, pois está em alta concentração no guaraná.

Além disso, a cafeína tem ação reconfortante em consequência da liberação da dopamina no circuito central de recompensa (sistema mesolímbico e núcleo *accumbens*) (LINDSKOG et al., 2002; BEUAMONT et al., 2005), bem como ação analgésica (LASKA et al., 1984; GLIOTTONI et al., 2009). Já foi relatado também o efeito protetor desta substância contra doenças neurodegenerativas como a demência do tipo Alzheimer (ROSSO et al., 2008; CANAS et al., 2009) e a doença de Parkinson (XU et al., 2010). A cafeína tem sido associada ainda à proteção contra câncer de mama, renal e de fígado (NKONDJOCK, 2009). Já a teofilina age

principalmente em nível de sistema respiratório, sendo especialmente utilizada para tratamento de asma (TEE et al., 2008).

No sistema cardiovascular, a ingestão de bebidas ricas em cafeína apresenta resultados muitas vezes divergentes. Em termos fisiológicos parece que a cafeína promove aumento na pressão arterial sistêmica, entretanto, não induz a piora na severidade das arritmias ventriculares e no aumento do risco de fibrilação atrial (TAUBERT et al., 2007). Se o aumento na pressão arterial sistêmica constitui risco de desenvolvimento de hipertensão associado à ingestão de bebidas ricas em cafeína, principalmente o café, é um tema que ainda está sendo estudado (GROBBEE et al., 1990; LOPEZ-GARCIA et al., 2006).

Neste estudo, a ingestão de guaraná pelos indivíduos de Maués avaliados, promoveu diminuição na ocorrência de hipertensão arterial. Revisões e meta análises contemporâneas sugerem que bebidas não teriam efeitos negativos sobre o sistema cardiovascular (LOPEZ-GARCIA et al., 2006). Os indivíduos avaliados nos estudos de Boozer et al. (2001) e Berubé-Parent et al. (2005) apresentaram elevação leve na pressão arterial sistêmica. Contudo, tais indivíduos eram sedentários, ao contrário do que ocorre com a população de Maués. Conforme McArdle et al. (1996) a prática regular de exercícios físicos traz benefícios cardiovasculares que previnem o estímulo cardiovascular que poderia aumentar a pressão arterial em indivíduos expostos à cafeína. Além disso, há relatos de que os efeitos da cafeína sobre a pressão arterial desaparecem conforme seu uso crônico (CAVALCANTE et al., 2000).

Outra bebida rica em cafeína e outras substâncias bioativas presentes no guaraná como as catequinas, é o chá verde (*Camellia sinensis*), que possui uma concentração de 2-5% de cafeína e 30 a 50% de catequinas (YANG; LANDAU, 2000; DUFRESNE; FARNWORTH, 2001). As folhas do chá (tanto verde quanto preto) contêm também flavonóides como quercitina e miricina. O guaraná é rico, não só em cafeína, teobromina e teofilina, mas também em catequinas, o que aproxima este alimento do chá verde e suas propriedades funcionais (BERUBÉ-PARENT et al., 2005).

As catequinas são importantes agentes antioxidantes, que têm sido associados com a prevenção aos riscos de câncer em indivíduos (BETTUZI et al.,

2007). Além disso, há estudos que apontam a atividade dessas substâncias no combate à obesidade (WU et al., 2003; WOLFRAN et al., 2005) à SM (THIELECKE; BOSCHMANN, 2009; YANG et al., 2011) e ao diabetes tipo 2 (NKOBOLÉ et al., 2011). Alguns autores sugerem que o mecanismo para essa redução é a ativação de metabolismo lipídico no fígado (MURASE et al, 2002; BOSCHMANN; THIELECKE, 2007). Além disso, as catequinas têm sido associadas com a diminuição da deposição de gordura visceral, e síntese de ácidos graxos no fígado (IKEDA et al., 2005), bem como com a redução na diferenciação de células adiposas por inibir a expressão de enzimas lipogênicas (WOLFRAN et al., 2006).

Um recente estudo de Yang e colaboradores (2011) aponta que o tratamento de indivíduos com chá verde, durante seis semanas, promoveu a redução na pressão arterial dos indivíduos. Considerando que a composição do guaraná apresenta significativa quantidade de catequinas, esse resultado está de acordo com os que foram encontrados na nossa população idosa de Maués.

Os resultados descritos no presente trabalho evidenciaram que o consumo de guaraná diminui a quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) e aumenta a IL-10, que tem atividade anti-inflamatória. Esse efeito está provavelmente associado com as catequinas e a cafeína presentes na composição do guaraná. Vários estudos têm relatado a atividade da cafeína na imunomodulação, pois essa substância é um antagonista dos receptores de adenosina (FREDHOLM et al., 1999) e inibe a enzima adenosina monofosfato fosfodiesterase (cAMP-PDE), aumentando a quantidade de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) intracelular e com isso ativando a proteína quinase A (WELLS et al., 1975; HERRIGAN et al., 2004).

O AMPc é um importante imunomodulador, pois suprime as funções de células inflamatórias e imunocompetentes diminuindo, por exemplo, a produção de TNF- α , IFN- γ e IL-12 e aumentando a expressão de IL-10 em macrófagos (PROCOPIO, et al., 1999) e PBMC (EIGLER et al., 1998). Além disso, também inibe a expressão de IL-4, IL-3, IL-5 e a proliferação de linfócitos (KAMINUMA et al., 1999; STAPLES et al., 2001).

A adenosina é um potente imunomodulador que, em geral, suprime a atividade das células imunes (EIGLER et al., 1997). Entretanto, alguns estudos apontam a ativação de rotas inflamatórias mediada pela adenosina (CRONSTEIN, et al, 1990). Desse modo, uma vez que a cafeína é um antagonista desses receptores, espera-se que tenha uma atividade anti-inflamatória em algumas situações (HORRIGAN et al., 2006).

As catequinas também têm sido associadas com imunomodulação, especialmente com a regulação no número e na diferenciação de células T, bem como com a redução de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) em ratos após irradiação (HU et al., 2011). Além disso, seu efeito na redução dessas mesmas citocinas em PBMC já foi relatado (NEYESTANI et al., 2009), bem como o aumento de IL-10 (YUN et al., 2010). Essas substâncias também diminuem a atividade da proteína IKK e por consequência reduzem a expressão da enzima ciclo oxigenase-2 (COX-2) (ROSA et al., 2012).

Considerando que a obesidade e a SM ocasionam uma inflamação de baixo grau, que por sua vez contribui para a manutenção dos altos IMCs nos indivíduos, surge a necessidade de pesquisas visando a obtenção de moduladores para as rotas inflamatórias, os quais sejam capazes de causar um impacto positivo no metabolismo (ROCHA; FOLCO, 2011). Nesse sentido, compostos anti- TNF- α tem mostrado resultados interessantes no combate à obesidade e à resistência à insulina (DOMINGUEZ et al., 2005; GONZALES-GAY et al., 2006). Além disso, os salsalatos que suprimem a ação de IKK (KANETO et al., 2004; GOLDFINE et al., 2008), também têm demonstrado ação anti-inflamatória importante na obesidade.

Da mesma forma, o uso de nutrientes com propriedades anti-inflamatórias constitui um componente bastante promissor no combate à obesidade. Nesse contexto, considerando os resultados de nossos estudos o uso de substâncias naturais como o guaraná, devido aos seus compostos bioativos, podem constituir uma importante alternativa para o controle das doenças associadas à SM.

O presente estudo reforça a ação anti-obesogênica do guaraná e seu efeito sobre o metabolismo oxidativo e inflamatório relacionado à lipotoxicidade. Entretanto, este trabalho apresenta limitações metodológicas que precisam ser consideradas. Entre estas está o fato do estudo epidemiológico ter sido do tipo

transversal, o que pode representar influência nos resultados obtidos. Assim, investigações longitudinais que acompanhem a saúde e a mortalidade dos idosos que consomem ou não habitualmente guaraná são relevantes. Investigações *in vitro* averiguando a ação do guaraná no metabolismo dos adipócitos também são importantes e poderiam elucidar os mecanismos de ação desta planta no metabolismo bioquímico e imunológico relacionado à adiposidade.

6 CONCLUSÕES

Os resultados dos protocolos *in vitro* e *in vivo* realizados nesta pesquisa permitem concluir que:

- a ingestão habitual de guaraná está associada à baixa ocorrência de obesidade, hipertensão arterial e síndrome metabólica na população idosa de Maués;

- a ingestão habitual do guaraná está associada a níveis mais baixos de pressão arterial sistólica, marcadores como a AOPP e LDL-colesterol, principalmente nas mulheres;

- o guaraná apresenta efeito imunomodulatório *in vitro*, aumentando os níveis de IL-10 (anti-inflamatória) e diminuindo as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ) em PBMC tratadas *in vitro*;

- em indivíduos saudáveis suplementados durante 14 dias com guaraná há aumento nas taxas sanguíneas de IL-10 e diminuição de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ .

O conjunto destes resultados sugere que o guaraná possui atividade anti-obesogênica, atuando nas rotas oxidativas e inflamatórias associadas à obesidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZAK, M. et al. Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 16, n. 1, p. 72-75, 2003.

AGUILAR-SALINAS, C. A. et al. High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 10, p. 4075-4079, 2008.

AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **Journal of Biology and Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 9047–9054, 2000.

ALESSI, M. C.; JUHAN-VAGUE, I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 6, p. 995-1000, 2008.

ANGELO, P. C. et al. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 117-124, 2008.

ANTUNES, E. et al. The relaxation of isolated rabbits corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 5, p. 416-421, 2001

ARITA, Y. et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, n. 1, p. 79-83, 1999.

ARNAUD, M. J. The pharmacology of caffeine. **Drug Metabolic Disposal**, v. 31, p. 273–313, 1987

BACKER, J. M. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **EMBO Journal**, v. 11, n.9, p. 3469-3479, 1992.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 32-36, 2005.

BASTOS, H. M. et al. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BEAUMONT, M. et al. Recovery after prolonged sleep deprivation: residual effects of slow-release caffeine on recovery sleep, sleepiness and cognitive functions. **Neuropsychobiology**, v. 51, n. 1, p. 16-27, 2005.

BELLIARDO, F. et al. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and *Cola* spp. Samples. **Lebensm Unters Forsch**, v. 180, p. 398-401, 1985.

BEMPONG, D. K.; HOUGHTON, P.J. Dissolution and absorption of caffeine from guarana. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 769-771, 1992.

BÉRUBÉ-PARENT, S. et al. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 94, n. 3, p. 432-436, 2005.

BETTUZZI, S. et al. Clinical relevance of the inhibitory effect of green tea catechins (GtCs) on prostate cancer progression in combination with molecular profiling of catechin-resistant tumors: an integrated view. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 10, n. 1, p. 57-60, 2007.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 845-859, 2004.

BILATE, A. M. et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1104-1113, 2007.

BJØRNDAL, B. et al. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. **Journal of Obesity**, v. 2011, p. 789-795, 2011.

BODEN, G. et al. Acute tissue injury caused by subcutaneous fat biopsies produces endoplasmic reticulum stress. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 1, p. 349-352, 2010.

BOEKHOLDT, S. M. et al. C-reactive protein levels and coronary artery disease incidence and mortality in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study 1993–2003. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 2, p. 415-422, 2006.

BOGUSZEWSKI, C. L. et al. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. **Polish Journal of Endocrinology**, v. 61, p. 194-206, 2010.

BOOZER, C. N. et al. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity**, v. 25, p. 316-24. 2001.

BOSCHMANN, M.; THIELECKE, F. The effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and fat oxidation in obese men: a pilot study. **Journal of American College of Nutrition**, v. 26, p. 389S-395S, 2007.

BRASIL, Plano Nacional de Saúde/PNS 2008/2009-2011. **Ministério da Saúde**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_planejamento_sus_v9.pdf. Acesso em 30 jan 2012.

- CABRERA, M. A. S. et al. Metabolic syndrome, abdominal obesity, and cardiovascular risk in elderly women. **International Journal of Cardiology**, v. 114, p. 224-229, 2007.
- CALDEFIE-CHEZET, F. et al. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 3, p. 414-418, 2001.
- CAMPOS, A. R. et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199-1202, 2003.
- CAMPOS, A. R. et al. Acute effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behavior in force swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 441-443, 2005.
- CANAS, P. M. et al. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 47, p. 14741-51, 2009.
- CASSANO, P. A. et al. Body fat distribution, blood pressure, and hypertension: a prospective cohort study of men in the normative aging study. **Annual Epidemiology**, v. 1, p. 33-48, 1990.
- CAVALCANTE, A. et al. Influência da cafeína na PA e agregação plaquetária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 75, n. 2, p. 38-44, 2000.
- CHEN, Y. et al. Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease. **Nature**, v. 452, p. 429-435, 2008.
- CHUDEK, J.; WIECEK, A. Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. **Pharmacology Reports**, v. 58, p. 81-88, 2006.
- CORREIA, P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, Ed. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 620p.1984.
- COSTA, V. et al. Effectiveness of guaraná (*Paullinia cupana*) for postradiation fatigue and depression: results of a pilot double-blind randomized study. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 15, p. 431-433, 2009.
- CRONSTEIN, B. N. et al. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 1150-1157, 1990.
- DOMINGUEZ, H. et al. Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor- α blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. **Journal of Vascular Research**, v. 42, n. 6, p. 517-525, 2005.
- DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E.R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p. 404-421, 2001.

EATON, S. B., KONNER, M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 283-289, 1985.

EIGLER, A. et al. Endogenous adenosine curtails lipopolysaccharide-stimulated tumour necrosis factor synthesis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 45, p. 132-139, 1997.

EIGLER, A. et al. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF- α production. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, p. 101-107, 1998.

EMILSSON, V. et al. Genetics of gene expression and its effect on disease. **Nature**, v. 452, p. 423-428, 2008.

ESPINOLA, E. B. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 223-229, 1997.

EZZATI, M. et al. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. **Lancet**, v. 360, p.1347-1360, 2002.

FESTA, A. et al. Chronic subclinical inflammation aspart of the insulin resistance syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study (IRAS). **Circulation**, v. 102, n. 1, p. 42-47, 2000.

FLIER, J. S. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? **Cell**, v. 80, n. 1, p.15-18, 1995.

FOLCO, E. J. et al. Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25569-25575, 2009.

FONSECA, C. A. et al. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 321, p. 165-73, 1994.

FREDERICH, R. C. et al. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 3, p. 1658-1663, 1995.

FREDHOLM, B. B. et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. **Pharmacology Reviews**, v. 51, p. 83-126, 1999.

FROHLICH, M. et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v. 23, n. 12, p. 1835-1839, 2000.

FUKUMASU, H. et al. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. sorbilis, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, n. 6, p. 158-164, 2006.

FUKUMASU H. et al. *Paullinia cupana* Mart var. sorbilis, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 305-10, 2008.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2ª ed. Ribeirão Preto: SBG; 2003.

GLIOTTONI, R. C. et al. Effect of caffeine on quadriceps muscle pain during acute cycling exercise in low versus high caffeine consumers. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 150-61, 2009.

GOLDFINE, A. B. et al. Use of salsalate to target inflammation in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. **Clinical and Translational Science**, v.1, n. 1, p. 36-43, 2008.

GONZALEZ-GAY, M. A. et al. Anti-tumor necrosis factor- α blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Experimental Rheumatology**, v. 24, n. 1, p.83-86, 2006.

GOTTLIEB, M. G. V. et al. Origem da SM: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. **Scientia Medica**, v. 18, n. 1, p. 31-38, 2008.

GREENWAY, F. L.; SMITH, S. R. The future of obesity. **Research Ingestive Behavior and Obesity Nutrition**, v. 16, p. 976-982, 2000.

GROBBEE, D. E. et al. Coffee, caffeine, and cardiovascular disease in men. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 15, p. 1026-1032, 1990.

GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 200, p.224-227, 1992.

GUAL, P. et al. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 99-109, 2005.

HAFFNER, S. M. Abdominal adiposity and cardiometabolic risk: do we have all the answers? **American Journal of Medicine**, v. 120, p. S10-S16, 2007.

HALBERG, N. et al. The adipocyte as an endocrine cell. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 37, p. 753-768, 2008.

HALLER C. A. et al. Short-term metabolic and hemodynamic effects of ephedra and guarana combinations. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, p. 560-71, 2005.

HAN, T. S. et al. Waist circumference reduction and cardiovascular benefits during weight loss in women. **International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders**, v. 21, p. 127-134, 1997.

HAN, S. et al. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. **Cell Metabolism**, v. 3, p. 257-266, 2006.

HASKELL, C. F. et al. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guaraná in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, p. 65-70, 2007.

HASLAM, D. W.; JAMES W. P. Obesity. **Lancet**, v. 366, p. 187-209, 2005.

HECKMAN, M. A. et al. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. R77-R87, 2010.

HENMAN, A. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 311-338, 1982.

HEYMSFIELD, S. B. et al. Garcinia cambogia (hydroxycitric acid) as a potential antiobesity agent: a randomized clinical trial. **JAMA**, v. 280, p. 1596-1600, 1998.

HIMES, R. W.; SMITH, C. W. Tlr2 is critical for diet induced metabolic syndrome in a murine model. **FASEB Journal**, v. 24, n. 3, p. 731-739, 2010.

HIROSUMI, J. et al. A central, role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-336, 2002.

HORRIGAN, L. A. et al. Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. **International Immunopharmacology**, v. 200, n. 4, p. 1409-17, 2004.

HORRIGAN, L. A. et al. Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 877-892, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2409-2419, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α -and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n.5249, p. 665-668, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860-867, 2006.

HOTTA, K. et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 6, p. 1595-1599, 2000.

HU, Y. et al. Bioactive components from the tea polyphenols influence on endogenous antioxidant defense system and modulate inflammatory cytokines after total-body irradiation in mice. **Phytomedicine**, v. 18, n. 11, p. 970-5, 2011.

HWANG, L. et al. Prevalence of obesity and metabolic syndrome in Taiwan. **Journal of Formosan Medical Association**, v. 105, n. 8, p. 626-635, 2006.

IKEDA, I. et al. Dietary gallate esters of tea catechins reduce deposition of visceral fat, hepatic triacylglycerol, and activities of hepatic enzymes related to fatty acid synthesis in rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 1049-1053, 2005.

INOUE, K. E. et al. Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2242-2250, 2007.

IOZZO, P. Viewpoints on the Way to the Consensus Session Where does insulin resistance start? The adipose tissue. **Diabetes Care**, v.32, n.2, p. 32-35, 2009.

JACOBS, D. R.; TAPSELL, L. C. Food, not nutrients, is the fundamental unit in nutrition. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 10, p. 439-50, 2007.

JANSSEN, I. et al. Body mass index and waist circumference independently contribute to the prediction of nonabdominal, abdominal subcutaneous, and visceral fat. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 683-688, 2002.

JIMOH, F. O. et al. Antioxidant properties of the methanol extracts from the leaves of *Paullinia pinnata*. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 707-11, 2007.

JIPPO, T. et al. Inhibitory effects of guarana seed extract on passive cutaneous anaphylaxis and mast cell degranulation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, p. 2110-2112, 2009.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAHN, C. R. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Annual Reviews of Medicine**, v. 36, p. 429-51, 1985.

KAMINUMA, O. et al. Cyclic AMP suppresses interleukin-5 synthesis by human helper T cells via the downregulation of the calcium mobilization pathway. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 2, p. 521-529, 1999.

KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006.

KANEMAKI, T. et al. Interleukin 1 β and interleukin 6, but not tumor necrosis factor α , inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. **Hepatology**, v. 27, n. 5, p. 1296-1303, 1998.

KANETO, H. et al. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory Peptide. **Nature Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1128-1132, 2004.

KAPTOGE, S. et al. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta analysis. **Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 132-140, 2010.

KASUGA, M. et al. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, v. 215, p.185-187, 1982.

KATHLEEN, M. E. Dysfunctional Hormonal Regulation of Metabolism in Obesity **South Dakota's Medicine**, special issue, 2011.

KAZUMI, T. et al. Serum adiponectin is associated with high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and low-density lipoprotein particle size in young healthy men. **Metabolism**, v. 53, n. 5, p. 589-593, 2004.

KENNEDY, D. O. et al. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 79, p. 401-11, 2004.

KEZHONG, Z.; RANDAL, J. K. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 455-462, 2008.

KIRK, E. A. et al. Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue. **Diabetes**, v. 57, n. 5, p. 1254-1261, 2008.

KLAUS, S. Adipose tissue as a regulator of energy balance. **Current Drug Targets**, v. 5, p. 1-10, 2004.

KLOVER, P. J. et al. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. **Diabetes**, v. 52, n. 11, p. 2784-2789, 2003.

KUCZMARSKI, R. J. et al. Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991, **JAMA**, v. 272, p. 205-211, 1994.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Reviews of Immunology**, v. 1, p. 335-359, 1983.

LASKA, E. M. et al. Caffeine as an analgesic adjuvant. **Journal of the American Medical Association**, v. 251, n. 13, p.1711-1718, 1984.

LECLERC, V.; REICHHART, J. M. The immune response of *Drosophila melanogaster*. **Immunology Review**, v. 198, p. 59-71, 2004.

LIMA, W. P. et al. Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 1019-28, 2005.

LINDSKOG, M. et al. Involvement of DARPP-32 phosphorylation in the stimulant action of caffeine. **Nature**, v. 415, n. 418, p.774-778, 2002.

LIU, J. et al. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells educe diet-induced obesity and diabetes in mice. **Nature Medicine**, v.15, n. 8, p. 940-945, 2009.

LOPEZ-GARCIA, E. et al. Coffee consumption and mortality in women with cardiovascular disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 218-224, 2006.

LORD, G. M. et al. Leptin modulates the Tcell immune response and reverses starvation- induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 897-901, 1998.

LOWELL, B. B.; SHULMAN, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 384-387, 2005.

LUMENG, C. N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

MANCUSO, P. et al. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 8, p. 4018-4024, 2002.

MARAVALHA, N. Teofilina e teobromina, metil-purinas constantes nas plantas produtoras de cafeína. In: **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)**. Estudos sobre o guaraná e outras plantas produtoras de cafeína (Manaus), 17-25, 1965.

MATSUBARA, M. et al. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2764-2769, 2002.

MATTEI, R. et al. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-116, 1998.

MCARDLE, W. D. et al. Functional capacity of the cardiovascular system. Baltimore, MD: William and Wilkins 1996. In **Exercise Physiology**, 4th ed., pp. 296 –312

MERTENS, I.; VAN GAAL, L. F., Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. **Obesity Reviews**, v. 3, n. 2, p. 85-101, 2002.

MISRA, A.; KHURANA, L. Obesity and the Metabolic Syndrome in Developing Countries. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 11, p. S9-S29, 2008.

MIURA, T. et al. Effect of guarana on exercise in normal and epinephrine-induced glycogenolytic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 6, p. 646-648, 1998.

MOHAMED-ALI, V. et al. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Diseases**, v. 22, n. 12, p. 1145-1158, 1998.

MONTEIRO, R.; AZEVEDO I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. **Mediators of Inflammation** [on-line]., 2010, janeiro 2010. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913796/>

MORELLI, V.; ZOOROB, R. J. Alternative therapies: Part I. Depression, diabetes, obesity. **American Family Physician**, v. 62, n. 5, p. 1051-60, 2000.

MURASE, T. et al. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 26, p. 1459-1464, 2002.

NIH-National Institutes of Health National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) **Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III)**. NIH Publication. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2001

NEYESTANI, T. R. et al. Selective effects of tea extract and its phenolic compounds on human peripheral blood mononuclear cell cytokine secretions. **International Journal of Food Science Nutrition**, v. 1, p. 79-88, 2009.

NISHIMURA, S. et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**, v. 15, n.8, p. 914-920, 2009.

NKOBOLÉ, N. et al. Antidiabetic activity of terminalia sericea constituents. **Natural Products Communications**, v. 6, n. 11, p.1585-8, 2011.

NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. **Cancer Letters**, v. 277, n. 2, p. 121-5, 2009.

OGSTON, D., MCANDREW, G. M. Fibrinolysis in Obesity. **Lancet**, v. 2, n. 7371, p. 1205-1207, 1964.

OHMURA, K. et al. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 2, p. 193-199, 2010.

OPALA, T. et al. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. **European Journal of Medical Research**, v. 11, n. 8, p. 343-350, 2006.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, p. 457-461, 2004.

PAPANICOLAOU, D. A. et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, n. 2, p. 127-137, 1998.

PERCIK, R.; STUMVOLL, M. Obesity and cancer, **Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes**, v. 117, p. 563-566, 2009.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 165-9, 2000.

PINHEIRO, C. E. et al. Efeito dos extratos de guaraná e de Stévia Rebaudiana Bertoni (folhas), e do esteviosídeo, sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 4, p. 9-13, 1987.

POULAIN-GODEFROY, O. et al. Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue. **Medical Inflammation**, v. 2010, p. 8234-8286, 2010.

PROCÓPIO, D. O. et al. Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF- α and IL-12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1195–1205, 1999.

RANKINEN, T. et al. The human obesity gene map: the 2005 update. **Obesity**, v. 14, n. 4, p. 529-644, 2006.

RAU, J. C. et al. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemoptysis**, v. 5, n.1, p.102-115, 2007.

RAVI, R. et al. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). **International Journal of Vitamin Nutrition Research**, v. 78, p. 96-101, 2008.

RIDKER, P. M. et al. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 12, p. 836-843, 2000.

RIEUSSET, J. et al. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 53, p. 2232-2241, 2004.

ROBERTS, C. K. et al. Oxidative Stress and dysregulation of NADP(H) oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. **Metabolism**, v. 55, p. 928-934, 2006.

ROCHA, V. Z.; FOLCO, E. Inflammatory Concepts of Obesity. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, p. 1-14, 2011.

ROSA, F. T. et al. Bioactive compounds with effects on inflammation markers in humans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition** [on-line]., 2012, janeiro, 2012. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22248031>

ROSSO, A. et al. Caffeine: neuroprotective functions in cognition and Alzheimer's disease. **American Journal of Alzheimers Disorders and Other Demencies**, v. 23, n. 5, p. 417-22, 2008.

SABATE, J. The contribution of vegetarian diets to health and disease: a paradigm shift? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 502S-7S, 2003.

SAKKINEN, P. A. et al. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 10, p. 897–907, 2000.

SALAROLI, L. B. et al. Prevalência de síndrome metabólica em estudo de base populacional, Vitória, ES – Brasil. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 7, p. 1143-1152, 2007.

SCHENK, S. et al. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 9, p. 2992-3002, 2008.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 3015-3025, 2006.

SHOELSON, S. E. et al. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity and diet-induced insulin resistance. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Diseases**, v. 24, n. 3, p. S49-S52, 2003.

SHOELSON, S. E. et al. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

SIMS, E. A. H. et al. Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. **Recent Progress in Hormone Research**, v.29, p.457–496, 1973.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guaraná's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evidence based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 279-282, 2007.

SOLINAS, G. et al. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 5, p. 386-397, 2007.

SOUSA, S. A. et al. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 3, p. 23-29, 2010.

STAPLES, K. J. et al. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-dependent inhibition of IL-5 from human T lymphocytes is not mediated by the cAMPdependent protein kinase A. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 2074–2080, 2001.

SUN, X. J. et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, v. 352, p.73-77, 1991.

TAUBERT, D. et al. Effect of Cocoa and Tea Intake on Blood Pressure. **Archives of International Medicine**, v. 167, n. 7, p. 626-634, 2007.

TEE, A. K. et al. Long-acting beta2-agonists versus theophylline for maintenance treatment of asthma. **Cochrane Database Systems Reviews**, v. 18, n. 3, p. 23-35, 2008.

THIELECKE, F.; BOSCHMANN, M. The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome– a review. **Phytochemistry**, v. 70, p. 11-24, 2009.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of White adipose tissue. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 92, p. 347-55, 2004.

UNGER, R. H. et al. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1801, p. 209-214, 2010.

UYSAL, K. et al. Protection from obesity induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature**, v. 389, p. 610-614, 1997.

VAN GAAL, L. F. et al. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 875-880, 2006.

VENTRE, J. et al. Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene — metabolic consequences in obese and non obese mice. **Diabetes**, v. 46, p. 1526-1531, 2009.

VIGOUROUX, C. et al. Major insulin resistance syndromes: clinical and physiopathological aspects. **Journal of the Society of Biology**, v. 195, n. 3, p. 249-257, 2011.

WALLENIUS, V. et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nature Medicine**, v. 8, n. 1, p. 75-79, 2002.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1796-1808, 2003.

WEISBERG, S. P. et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 115-124, 2006.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 1111-1119, 2005.

WELLS, J. et al. Phosphodiesterases from porcine coronary arteries: inhibition of separated forms by xanthines, papaverine, and cyclic nucleotides. **Molecular Pharmacology**, v. 11, p. 775-783, 1975.

WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signaling system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 1-4, 1994.

WHO, World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser.** 2000; 894: i-xii, 1-253.

WHO, World Health Organization. Stop the global epidemic of chronic disease. Report of a WHO Global InfoBase. **World Health Organ Tech Rep Ser.** 2011; disponível em :<https://apps.who.int/infobase/>

WOLF, H. K. et al. Blood pressure levels in the 41 populations of the WHO MONICA project. **Journal of Human Hypertension**, v. 11, p. 733-742, 1997.

WOLFRAN, S. et al. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, p.176-187, 2006.

WOLFRAN, S. et al. TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. **Annual Nutrition and Metabolism**, v. 49, p. 54-63, 2005.

WU, C. H. et al. Relationship among habitual tea consumption, percent body fat, and body fat distribution. **Obesity Research**, v.11, p.1088-1095, 2003.

WU, D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 332, n. 6026, p. 243–247, 2011

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1821-1830, 2003.

XU, H. et al. Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 167, n. 2, p. 475-481, 2010.

YAMAUCHI, T. et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. **Nature Medicine**, v. 13, n. 3, p. 332-339, 2007.

YANG, C.; LANDAU, J. Effects of tea consumption on nutrition and health. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2409-2412, 2000.

YANG, W. et al. The effect of providing power mobility on body weight change. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 68, n. 9, p. 746-753, 2007.

YANG, H. Y. Beneficial effects of catechin-rich green tea and inulin on the body composition of overweight adults. **Journal of Nutrition**, v. 107, n. 5, p. 749-54, 2011.

YUAN, M. et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . **Science**, v. 293, n. 5535, p. 1673-1677, 2001.

YUN, J. P. et al. Diet-induced obesity accelerates acute lymphoblastic leukemia progression in two murine models. **Cancer Previous Research**, v. 3, n. 10, p.1259-1264, 2010.

ZIMMET, P. et al. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782-787, 2001.



