

EXPLORANDO O POTENCIAL HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO AQUOSO DE *Ilex paraguariensis*: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR E INTERAÇÕES DO ÁCIDO CLOROGÊNICO COM HMG COA REDUTASE E LIPASE DE TRIACILGLICEROL DO ADIPÓCITO ATRAVÉS DO DOCKING MOLECULAR

RAPHAELA CASSOL PICCOLI¹; ANITA AVILA DE SOUZA²; KELEN CRISTIANE MACHADO GOULARTE³; DANIELA VOLCAN ALMEIDA⁴; REJANE GIACOMELLI TAVARES⁵; ROSELIA MARIA SPANEVELLO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – raphaelacassol@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – anita_a_avila@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – kelenqf@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – danivolcan@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – tavares.rejane@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rspanevello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As dislipidemias, que representam alterações no metabolismo lipídico, são consideradas um fator de risco significativo para o desenvolvimento de doenças crônicas e suas complicações cardiometabólicas. (BEBERICH & HEGELE, 2022). A enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMGR) exerce um papel central na regulação do metabolismo lipídico, atuando como uma enzima limitante na biossíntese de colesterol no fígado, ao catalisar a conversão de HMG-CoA em mevalonato. Dessa forma, a HMGR é considerada um alvo terapêutico para fármacos anti-hiperlipídicos, notadamente a classe das estatinas, que atuam por meio da inibição dessa enzima (KANU *et al.*, 2024). Recentemente, a lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) tem sido associada às dislipidemias, uma vez que é altamente expressa no tecido adiposo e é responsável pela catalisação da lipólise nos tecidos adiposos branco e marrom, promovendo a liberação de ácidos graxos livres na circulação (SCHREIBER, XIE & SCHWEIGER, 2019).

Diante disso, a busca por alternativas terapêuticas naturais que minimizem os efeitos da dislipidemia, sem os efeitos adversos dos fármacos, tem sido uma prioridade para a comunidade científica. Nesse contexto, a *Ilex paraguariensis* A.St-Hill. (família Aquifoliaceae), popularmente conhecida como erva-mate, destaca-se por suas propriedades hipolipemiantes, antioxidantes, anti-inflamatórias e diuréticas. Entre os compostos predominantes na *Ilex paraguariensis*, destaca-se o ácido clorogênico, que é um ácido fenólico caracterizado como um éster do ácido cafeico e do ácido quínico (BLUM-SILVA *et al.*, 2016). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial hipolipidêmico do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* em um modelo experimental de dislipidemia, além de investigar a interação molecular *in silico* entre o ácido clorogênico e sua afinidade de ligação às enzimas ATGL e HMGR.

2. METODOLOGIA

O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (folhas secas e moídas) foi preparado de acordo com FELLIPI *et al.* (2005) com pequenas modificações. A dieta hiperlipídica (DHL) foi preparada de acordo com ESTADELLA *et al.* (2004). O protocolo de indução experimental de dislipidemia contou com a administração de DHL durante 30 dias, seguida pelo tratamento com extrato de *Ilex paraguariensis* por via intragástrica durante 15 dias (90 mg/kg). Foram utilizados

24 ratos Wistar machos adultos divididos aleatoriamente em 4 grupos distintos: A - controle, B - dieta controle + extrato de *Ilex paraguariensis* (90 mg/kg), C- DHL + água, D - DHL + extrato de *Ilex paraguariensis* (90 mg/kg). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Feevale (parecer n°2.08.03.07.912). Ao final do período experimental os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para separação do soro, o qual foi utilizado para avaliação dos níveis de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade(HDL)-colesterol utilizando kits comerciais. Os valores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram calculados pela fórmula de Friedwald.

A análise dos dados foi efetuada no programa estatístico GraphPad Prism 8.0.1 por ANOVA de uma via, seguida do Teste *post hoc* de Tukey, considerando $P<0,05$ como diferença significativa. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M).

Para observar a interação do ácido clorogênico (PubChem CID 1794427) com as enzimas ATGL e HMGR, foi utilizado o software AutoDock 4.2.6. A estrutura cristalina da HMGR (ID PDB: 1HWL) foi obtida do Protein Data Bank (PDB). Para a ATGL, a estrutura proteica predita foi obtida a partir do SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) utilizando a sequência FASTA da ATGL (ID UniProt: Q96AD5) recuperada do UniProt (<https://www.uniprot.org>). Após as simulações de docking, as Energias de Ligação e os Constantes de Inibição (Ki) dos compostos selecionados foram calculados para as enzimas HMGR e ATGL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir das análises bioquímicas demonstram que o protocolo de indução experimental de dislipidemia ocasionou um aumento significativo nos níveis de TG (Fig 1A) ($P<0,05$), CT (Fig 1B) ($P<0,05$) e LDL-colesterol (Fig 1 C)($P<0,05$) no grupo DHL quando comparados com o grupo controle. A administração do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* *per se* associado a uma dieta padrão demonstrou significativa diminuição nos níveis de TG ($P<0,001$). De maneira importante, foi possível observar que a administração de DHL associada ao extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* demonstrou significativo potencial de proteção frente ao aumento nos níveis de CT ($P<0,001$), TG ($P<0,05$) e LDL-colesterol ($P<0,01$) quando comparado ao grupo DHL. Por fim, em relação aos níveis de colesterol-HDL, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$).

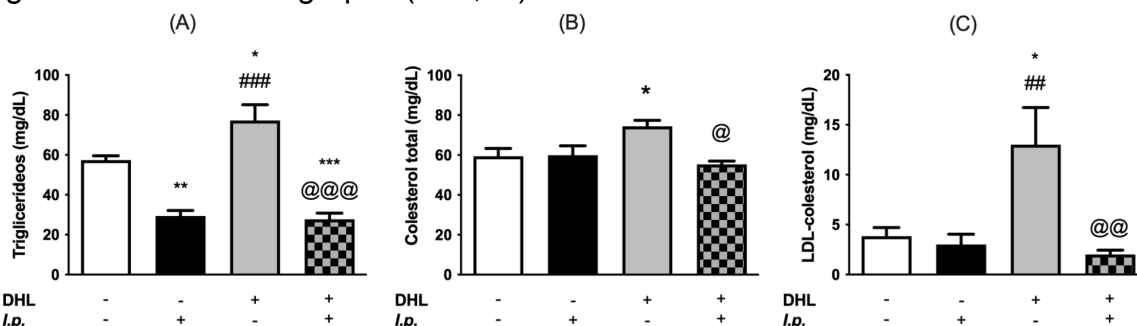


Figura 2: Efeitos do tratamento com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* nos níveis séricos de triglicerídeos (A), colesterol total (B) e LDL-colesterol (C) em ratos Wistar machos adultos submetidos a um protocolo de indução experimental de dislipidemia. Os dados estão representados como média \pm erro padrão,

analisados por ANOVA, seguido do teste de Tukey. (n =6). *** representa $P < 0,001$, ** representa $P < 0,01$, e * representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo A. #### representa $P < 0,001$ e ## representa $P < 0,01$ quando comparado ao grupo B. @@@ representa $P < 0,001$, @@ representa $P < 0,01$, e @ representa $P < 0,05$ quando comparado ao grupo A. DHL, dieta hiperlipídica; *I.p.*, *Ilex paraguariensis*; LDL, lipoproteína de baixa densidade.

Em relação às simulações de docking molecular (Fig. 2), o ácido clorogênico demonstrou a notável afinidade de ligação com ambas as enzimas, conforme indicado pelas energias de ligação: -13,65 kcal/mol para a ATGL e -9,14 kcal/mol para a HMGR, juntamente com constantes de inibição (98,50 pM e 198,27 nM, respectivamente), sugerindo sua capacidade de penetrar a membrana, uma vez que a HMGR está ligada à membrana endoplasmática do retículo. Nesse sentido, o ácido clorogênico emerge como um promissor inibidor para ambas as enzimas, especialmente para a ATGL. Tais resultados podem ser associados aos efeitos protetores das alterações lipídicas séricas observadas nos ensaios *in vivo*, através da potencial inibição da liberação de AG livres e biossíntese de colesterol.

A análise detalhada das interações entre aminoácidos revela que, para a ATGL, o ácido clorogênico mostra interações fortes com LEU90 e GLY16 por meio de ligações de hidrogênio, além de interações hidrofóbicas envolvendo PHE69, PHE97 e outros resíduos como ILE94, ALA65 e LEU51, aumentando sua afinidade de ligação geral. Para a HMGR, o ácido clorogênico exibe um perfil de interação robusto com ASP767, MET655, LYS735, ALA751, ARG590, ASN755 e GLU559, apresentando várias ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, especialmente com ASP767, MET655 e GLU559, proporcionando alta estabilidade ao complexo enzima-ligante.

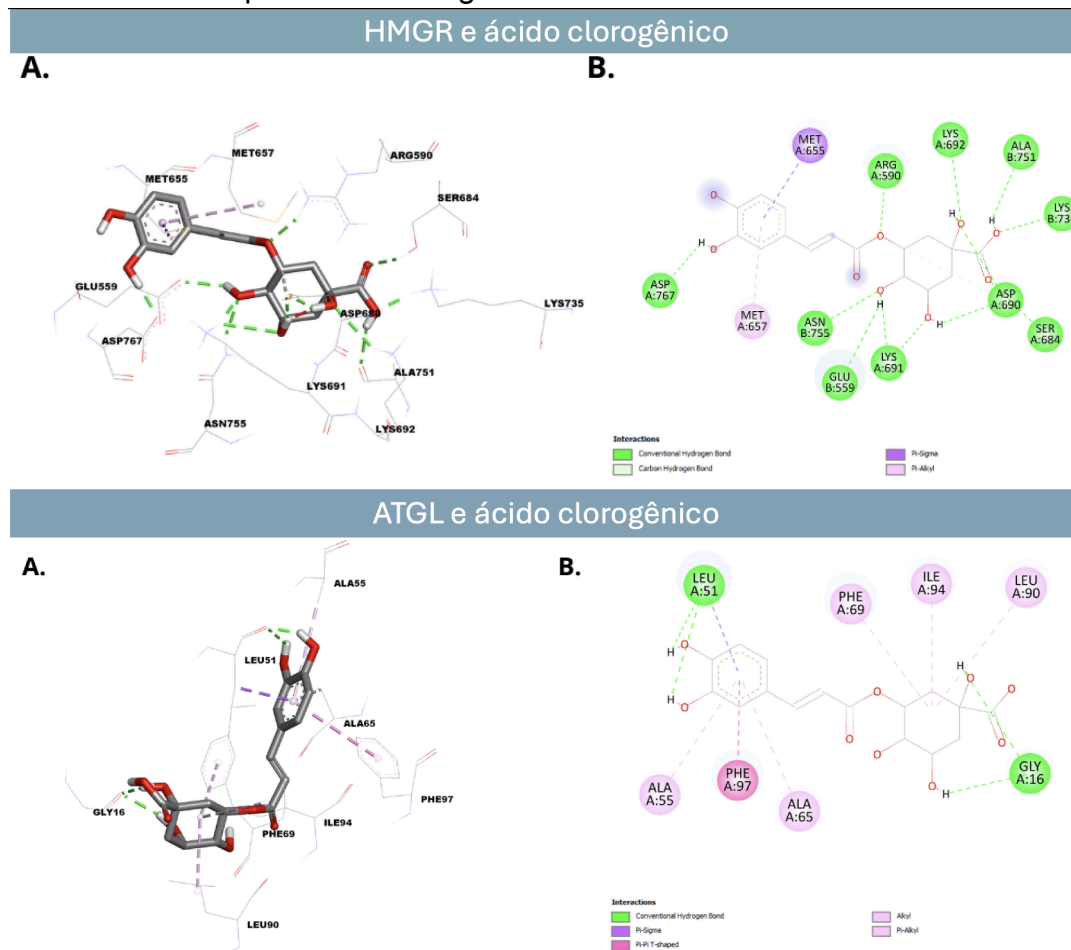


Figura 2: Previsão de afinidade de ligação e interação ligante-proteína do ácido clorogênico na HMGR e ATGL.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com achados prévios da literatura que já relataram o potencial hipolipidêmico do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* atribuído a sua composição bioativa (MASSON *et al.*, 2022). Nesse contexto, o ácido clorogênico se destaca por suas diversas atividades biológicas que podem influenciar o metabolismo lipídico, corroborando os achados do presente estudo. Ele promove uma inibição significativa da expressão de mRNA relacionado à síntese de ácidos graxos livres e da acetil-CoA (LIU *et al.*, 2023), além de afetar a atividade da enzima ATGL, resultando em uma diminuição da biodisponibilidade, bem como da lipogênese hepática e adipogênese, ao mesmo tempo em que ativa a lipólise, além de limitar a digestão e a absorção de lipídios da dieta ao se complexar com os lipídios (DZAH *et al.*, 2023).

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados deste estudo evidenciam que o extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* possui a capacidade de modular as alterações lipídicas séricas em um modelo experimental de dislipidemia induzido pelo consumo de uma DHL. Adicionalmente, evidências obtidas por meio de simulações *in silico* indicam que o ácido clorogênico, um de seus componentes majoritários, é capaz de regular enzimas essenciais do metabolismo lipídico. Dessa forma, o extrato se apresenta como uma alternativa terapêutica promissora para a redução dos riscos associados ao consumo de DHL e desenvolvimento de dislipidemia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERBERICH, A.J.; HEGELE, R.A. A Modern Approach to Dyslipidemia. **Endocr Rev.** V. 43, n.4, p. 611–653, 2022.
- KANU, V.R. *et al.* Anti-atherogenic role of green tea (*Camellia sinensis*) in South Indian smokers. **J Ethnopharmacol**, v. 332, n.118298, 2024.
- SCHREIBER, R.; XIE, H.; SCHWEIGER, M. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). **Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids**. V.1864, N.6, p.880–899, 2019.
- BLUM-SILVA, C.H. *et al.* Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. **Data in Brief**. v.20, n.8, p.295-299, 2016.
- FELIPPI, R. **Efeito do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na reatividade vascular: enfoque na aterosclerose experimental**. 2005. 120p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina.
- ESTADELLA, D. *et al.* Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**. v.20, n.2, p.218-224, 2004.
- MASSON, W. *et al.* Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) on Lipid Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 77, p.353–366, 2022.
- LIU, L. *et al.* Effect of chlorogenic acid on lipid metabolism in 3T3-L1 cells induced by oxidative stress, **Food Bioscience**, v.51, n. 102330, 2023.
- DZAH *et al.* Dietary Polyphenols and Obesity: A Review of Polyphenol Effects on Lipid and Glucose Metabolism, Mitochondrial Homeostasis, and Starch Digestibility and Absorption, **Plant Foods Hum Nutr**, v.78, n.1,p.1-12, 2023.