

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ISABELA RAMOS MARIANO

**GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) REDUZ A GORDURA VISCERAL E A  
INFLAMAÇÃO HEPÁTICA E INTESTINAL DE RATOS OBESOS**

Maringá  
2023

ISABELA RAMOS MARIANO

**GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) REDUZ A GORDURA VISCERAL E A  
INFLAMAÇÃO HEPÁTICA E INTESTINAL DE RATOS OBESOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Montserrat Diaz Pedrosa

Maringá  
2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M333g

Mariano, Isabela Ramos

Goji Berry (*Lycium barbarum*) reduz a gordura visceral e a inflamação hepática e intestinal de ratos obesos / Isabela Ramos Mariano. -- Maringá, PR, 2023.  
48 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali.

Coorientadora: Profa. Maria Montserrat Diaz Pedrosa.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2023.

1. Obesidade. 2. Inflamação hepática. 3. Inflamação intestinal. 4. Goji Berry (*Lycium barbarum*). I. Natali, Maria Raquel Marçal, orient. II. Pedrosa, Maria Montserrat Diaz, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 572.4

ISABELA RAMOS MARIANO

**GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) REDUZ A GORDURA VISCERAL E A INFLAMAÇÃO HEPÁTICA E INTESTINAL DE RATOS OBESOS**

Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**COMISSÃO JULGADORA**

---

Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali (PBC/DCM -UEM)

---

Prof. Dr. Jean Carlos Fernando Besson (UniCesumar)

---

Profa. Dra. Rosângela Fernandes Garcia (PFS/DFS -UEM)

---

Profa. Dra. Fernanda Losi Alves de Almeida (PBC/DCM-UEM)

---

Profa. Dra. Marcia do Nascimento Brito (PFS/DFS -UEM)

## BIOGRAFIA

**Isabela Ramos Mariano** nasceu em 06 de novembro de 1994 e, desde jovem, ama estar em aprendizado. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2016) e Mestrado em Ciências Fisiológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PFS/UEM, 2019). Atualmente, é doutoranda em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (UEM). Participante do Grupo de Pesquisa - Fisiologia Integrativa e Metabolismo Hepático (DFS/UEM) e do Grupo de Pesquisa/CNPq - Neurônios Entéricos: Filogênese, Ontogênese e Doenças Carenciais (a partir de 2019). Além disso, está cursando o último semestre de Nutrição, na Universidade Cesumar e atua como revisora na revista *Frontiers in Public Health*.

## AGRADECIMENTO

A CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro e a todos que estiveram comigo e trouxeram à tona a melhor versão de mim.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta por dois capítulos. O capítulo I compreende um artigo sobre os efeitos do goji berry sobre a morfofisiologia do intestino delgado de ratos obesos. Esse artigo foi intitulado “**Goji berry (*Lycium barbarum*) decreases body mass and the gene expression of intestinal pro-inflammatory cytokines in obese rats**”. O segundo capítulo trata-se de um artigo sobre os efeitos do goji berry sobre a morfofisiologia do fígado de ratos obesos e é intitulado “**Goji berry (*Lycium barbarum*) reduz a inflamação hepática e a intolerância à glicose em ratos obesos**”. De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PBC), os artigos foram redigidos seguindo as normas das revistas as quais serão submetidos, conforme descrito abaixo:

Capítulo I – Isabela Ramos Mariano Furlan, Samara Cristina Dossena, Ana Luiza Russo Duarte, Maria Montserrat Diaz Pedrosa, Laureane Nunes Masi, Maria Raquel Marçal Natali. Goji berry (*Lycium barbarum*) decreases body mass and the gene expression of intestinal pro-inflammatory cytokines in obese rats. Foi submetido ao Periódico Journal of Functional Foods (fator de impacto: 5.4) e se encontra em fase de análise.

Capítulo II – Isabela Ramos Mariano Furlan, Ana Luiza Russo Duarte, Samara Cristina Dossena, Maria Montserrat Diaz Pedrosa, Laureane Nunes Masi e Maria Raquel Marçal Natali. Goji berry (*Lycium barbarum*) reduz a inflamação hepática e a intolerância à glicose em ratos obesos. Será submetido ao Periódico Nutrients (fator de impacto: 5.9).

## RESUMO GERAL

O *Lycium barbarum*, conhecido como Goji berry (GB), um alimento bioativo, merece destaque por seus efeitos anti-obesogênicos e anti-inflamatórios em modelos animais e em seres humanos. A obesidade está associada a um estado inflamatório crônico de baixo grau, onde há aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e a interleucina-6 (IL-6). Alterações morfofisiológicas decorrentes da obesidade são descritas para intestino e fígado de roedores. Por isso, esse estudo investigou os efeitos do GB na prevenção e tratamento da obesidade, bem como na morfofisiologia e inflamação do jejuno e fígado. Ratos Wistar machos foram alimentados com dieta padrão para roedores ou rica em carboidratos simples e receberam administração intragástrica de água ou GB (250 mg/kg) por 109 ou 70 dias. Avaliou-se a massa corporal e de órgãos, índice de massa corporal, índice de Lee, ganho de massa durante o protocolo experimental, além de análises histológicas e histoquímicas no jejuno e fígado dos ratos. *In vivo*, foram realizados os testes de tolerância à glicose e insulina e tempo de trânsito gastrointestinal. A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para avaliar a expressão relativa de citocinas pró e anti-inflamatórias tanto no jejuno quanto no fígado dos animais. O GB reduziu significativamente o ganho de massa, o índice de Lee, de massa corporal e reestabeleceu os parâmetros morfométricos intestinais que foram alterados pela obesidade. O GB também diminuiu a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e aumentou a de citocinas anti-inflamatórias no jejuno, reforçando seu potencial anti-inflamatório. Ademais, o GB também melhorou a tolerância à glicose, atenuou o aumento dos hepatócitos que fora induzido pela dieta rica em carboidratos simples e reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias no fígado. Todos esses resultados servem de base para futuras pesquisas e destacam o Goji berry como um candidato promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a obesidade e suas complicações metabólicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** citocinas, dieta rica em carboidratos, fígado, intestino delgado, obesidade



## ABSTRACT

*Lycium barbarum*, known as Goji berry (GB), a bioactive food, is noteworthy for its anti-obesogenic and anti-inflammatory effects in animal models and humans. Obesity is associated with a low-grade chronic inflammatory state, where there is increased secretion of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6). Morphophysiological alterations resulting from obesity are described for the intestine and liver of rodents. Therefore, this study investigated the effects of GB in the prevention and treatment of obesity, as well as in the morphophysiology and inflammation of the jejunum and liver. Male Wistar rats were fed standard rodent diet or diet rich in simple carbohydrates and received intragastric administration of water or GB (250 mg/kg) for 109 or 70 days. Body and organ mass, body mass index, Lee index, mass gain during the experimental protocol were evaluated, in addition to histological and histochemical analyzes in the jejunum and liver of rats. In vivo, glucose and insulin tolerance tests and gastrointestinal transit time were performed. The real-time PCR technique was used to evaluate the relative expression of pro and anti-inflammatory cytokines both in the jejunum and in the liver of the animals. GB significantly reduced mass gain, Lee's index, body mass and reestablished intestinal morphometric parameters that were altered by obesity. GB also decreased the gene expression of pro-inflammatory cytokines and increased that of anti-inflammatory cytokines in the jejunum, reinforcing its anti-inflammatory potential. Furthermore, GB also improved glucose tolerance, attenuated the increase in hepatocytes that was induced by the diet rich in simple carbohydrates, and reduced the expression of pro-inflammatory cytokines in the liver. All these results serve as a basis for future research and highlight the Goji berry as a promising candidate for the development of therapeutic strategies against obesity and its metabolic complications.

**KEYWORDS:** cytokines, high carbohydrate diet, liver, small intestine, obesity

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I: GOJI BERRY (<i>Lycium barbarum</i>) DECREASES BODY MASS AND THE GENE EXPRESSION OF INTESTINAL PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN OBESE RATS.....</b>	<b>10</b>
Introduction.....	12
Material and methods .....	13
Results and discussion.....	18
Conclusion.....	28
<b>CAPÍTULO II: GOJI BERRY (<i>Lycium barbarum</i>) REDUZ A INFLAMAÇÃO HEPÁTICA E A INTOLERÂNCIA À GLICOSE EM RATOS OBESOS.....</b>	<b>34</b>
Introdução .....	35
Metodologia .....	36
Resultados.....	38
Discussão.....	42
Conclusão.....	45

CAPÍTULO I

**GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) DECREASES BODY MASS AND  
THE GENE EXPRESSION OF INTESTINAL PRO-  
INFLAMMATORY CYTOKINES IN OBESE RATS**

Esse artigo foi submetido ao Periódico Journal of Functional Foods e está em processo  
de revisão

# **GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) DECREASES BODY MASS AND THE GENE EXPRESSION OF INTESTINAL PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN OBESE RATS**

Isabela Ramos Mariano Furlan<sup>1</sup>, Samara Cristina Dossena<sup>1</sup>, Ana Luiza Russo Duarte<sup>1</sup>, Maria Montserrat Diaz Pedrosa<sup>2</sup>, Laureane Nunes Masi<sup>3</sup>, Maria Raquel Marçal Natali<sup>4</sup>

<sup>1</sup>State University of Maringá, Program of Graduate Studies in Biological Sciences. Av. Colombo, 5790, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil

<sup>2</sup>State University of Maringá, Center of Biological Sciences, Department of Physiological Sciences. Av. Colombo, 5790, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil

<sup>3</sup>Federal University of Santa Catarina, Center of Physiological Sciences, Department of Physiological Sciences. R. Eng. Agrônomo Andrei Cristian Ferreira Trindade, 88036-700 – Florianópolis, SC – Brasil

<sup>4</sup>State University of Maringá, Center of Biological Sciences, Department of Morphological Sciences. Av. Colombo, 5790, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil

## **Highlights**

Goji berry has anti-obesogenic and anti-inflammatory properties.

Intestinal tissues are a potential target of the beneficial effects of Goji berry.

Intestinal morphology was preserved by Goji berry in diet-induced obese rats.

Goji berry decreased IL-1 $\beta$  and TGF- $\alpha$  and increased IL-10 cytokines in the jejunum.

## **Abstract**

*Lycium barbarum*, known as Goji berry (GB), a bioactive food, has anti-obesogenic and anti-inflammatory properties in animal models and humans. As obesity leads to a low-grade inflammatory state and to changes in intestinal morphology, this study investigated the effects of GB on the prevention and treatment of obesity, as well as on the morphology and inflammation of the jejunum. Wistar rats were fed either with rodent standard diet or diet enriched with simple carbohydrates since weaning and were given intragastric administration of water of GB for 109 or 70 days. GB decreased body mass gain and fat mass and reestablished the intestinal morphometric parameters that were altered by

obesity. GB also decreased the gene expression of pro-inflammatory and increased that of anti-inflammatory cytokines in the jejunum, confirming its anti-inflammatory potential. Therefore, the use of GB seems promising for the prevention or treatment of the effects of obesity on the intestinal tissues.

**Keywords:** obesity, jejunum, inflammation.

## 1. Introduction

The World Health Organization (WHO) defines obesity as an excess of body fat relative to the lean mass, where the body mass index (BMI) is equal or higher than 30, which represents a health risk (WHO, 2022). Obesity is markedly associated with the development of chronic diseases such as insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, hypertension, cardiovascular diseases, dyslipidemias, non-alcoholic fatty liver disease, obstructive sleep apnea, hypoventilation syndrome and mood disorders (Schetz et al., 2019).

In the last two decades, it was recognized that obesity is associated with a low-grade inflammatory state, because there is an increased release of pro-inflammatory cytokines by adipocytes, both locally and systemically (Kawai et al., 2021). Some of these pro-inflammatory cytokines are tumor necrosis factor alfa (TNF-  $\alpha$ ) and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Although obesity-linked inflammation is mainly located in white adipose tissue, other tissues also exhibit an increase in inflammation, including liver, pancreas, brain and intestine (Wu, Ballantyne, 2020).

In the intestine, inflammation compromises the functions of the intestinal barrier, resulting in increased permeability (Ma et al., 2022) and favoring the translocation of lipopolysaccharides (LPS) from the microbiota to the blood (Bona et al., 2022). In addition, there is an hyperactivation of the mucosal immune system and further release of intestinal pro-inflammatory cytokines (Amoroso et al., 2020), boosting the chronic inflammation of obesity.

*Lycium barbarum*, or Goji berry (GB), is a fruit from China widely known for its bioactive properties (Teixeira et al., 2023): GB is rich in nutrients such as polysaccharides, fibers, carotenoids, vitamins, amino acids, minerals and phenolic compounds. Its polysaccharides are considered primary active compounds of GB, with several pharmacological properties (Cheng et al., 2015). Antioxidant, prebiotic, antimicrobial, immunomodulatory and anti-inflammatory actions can be cited (Zhao, Shi, 2022).

Many studies highlight the anti-inflammatory effects of GB on skin lesions (Bak et al., 2022), central nervous system (Huang et al., 2023) and gastric cells (Liu et al., 2022). This potent effect is partially due to the ability of GB to decrease the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Huang et al., 2023).

Given that obesity leads to a low-grade inflammation that can reach the intestine (Kawai et al., 2021; Wu, Ballantyne, 2020) and that GB has a substantial anti-inflammatory potential (Huang et al., 2023; Bak et al., 2022; Liu et al., 2022; Zhao, Shi, 2022) this work hypothesized that GB could have beneficial effects on the intestinal inflammatory process. The purpose was to assess the effects of the prevention and treatment with GB on the jejunal inflammation of Wistar rats with obesity induced by diet enriched with simple carbohydrates (DESC).

## **2. Materials and methods**

The experimental procedures were approved by the Ethics Commission on the Use of Animals (CEUA) of the State University of Maringá (UEM) under the protocol 2072240419.

### *2.1. Experimental design*

Forty male *Rattus norvegicus* from the Wistar strain were used. The rats were supplied by the Central Animal House of the institution at weaning (21 days of age) with

an average body mass of 60 g. The following experimental groups were established: CA (control): animals fed with standard rodent chow from weaning to 130 days of age that were given daily intragastric administration of water from 70 to 130 days of age; OA (obese): animals fed with DESC from weaning to 130 days of age that were given daily intragastric administration of water from 70 to 130 days of age; OGB (obese treated with GB): animals fed with DESC from weaning to 130 days of age that were given daily intragastric administration of GB (250 mg/kg body mass) from 70 to 130 days of age; OPR (obese preventive with GB): animals fed with DESC from weaning to 130 days of age that were given daily intragastric administration of GB (250 mg/kg body mass) from 21 to 130 days of age.

## *2.2. Obesity induction*

Since the age of 21 days, the rats from the obese groups were fed with DESC as describe by Crepaldi et al., 2018 and Lima et al., 2008. The diet was prepared with grinded commercial rodent chow (Nuvilab, Curitiba, Parana, Brazil), condensed milk (Nestlé, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil), cristalized sugar (Alto Alegre, São Paulo, São Paulo, Brazil) and water. The DESC was prepared every week and kept under refrigeration. The animals had free access to chow and water.

## *2.3. Preparation of Goji Berry and follow-up of the groups*

The powder extract of the GB fruit from China had 40.81% of polysaccharides. The analysis and approval of the product were carried out by Quimer® São Paulo, São Paulo, Brazil) using physico-chemical methods (Crepaldi et al., 2018). The GB extract was prepared in a manipulation pharmacy (Medicinal –Maringá, Paraná, Brazil), diluted in water (250 mg/2 mL) and administered to the rats every day by intragastric gavage (0.2 mL/100

g body mass). The dose used (250 mg/kg body mass) was established according to the efficacy tests described by Luo et al. (2004).

Diet ingestion of the animals as well as body mass, were recorded once a week. At the age of 130 days, the rats were weighed and the nasoanal length (NAL) was measured to calculate the Lee Index (Bernardis, Patterson, 1968:  $\sqrt[3]{\text{body mass in g/NAL in cm}}$ ) and body mass gain (body mass at 130 days minus that at 21 days).

#### *2.4. Time of gastrointestinal transit*

At 127 days of age, the rats were given by intragastric administration 0.3 mL of a solution of 3% Carmin hydro 52% and 0.5% liquid ethyl cellulose (Corantec – São Paulo, São Paulo, Brazil). The animals were placed in individual boxes without bedding in a room with controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C) and free supply of water. They were kept under these conditions for a maximum of 12 hours since the administration of the solution and observed each 15 minutes. The time of the administration and of the elimination of the first stained fecal pellet was recorded and the difference, corresponding to the time of intestinal transit, was expressed in minutes.

#### *2.5. Collection of biological material*

At 130 days of age, the animals were euthanized by anesthetic overload (sodium thiopental 120 mg/kg body mass plus lidocaine 5 mg/kg body mass, intraperitoneal) after nocturnal food deprivation for removal of the small intestine and white retroperitoneal and mesenteric adipose tissues.



## *2.6. Preparation of jejunal samples*

After being removed, the small intestine was measured (length and width), washed in saline phosphate buffer (PBS 0.1 M pH 7.4) and samples of jejunum were measured and fixed for further histological processing.

The samples were open at the mesenteric border, fixed in 4% paraformaldehyde for 6 hours, dehydrated in ascending series of ethanol (80%, 90% and 100%), cleared in xylene and included in paraffin. Later, semi-serial 6  $\mu\text{m}$ -thick histological sections were made in a Leica® RM2145 (Leica – Barra Funda, São Paulo, Brazil) microtome. Some of these were stained with Hematoxylin-Eosin for morphologic and morphometric analyses, while others were subjected to histochemical reactions for acid and neutral mucines.

## *2.7. Morphometric analysis*

The morphometric analysis was carried out by sampling of images captured under 10X objective in an Olympus light microscope coupled to a image capturing kit Axioscop 2 Plus® (Zeiss – Oberkochen, Germany). Thickness of intestinal wall, mucosa, submucosa and external muscle layers, in addition to villus height and crypt depth, were estimated through the measurement of 10 random points per section, totaling 100 measurements per animal per group for each of these parameters. Measurements were made with image analysis system Image Pro-Plus® 4.5 (Paraiso, São Paulo, Brazil), with results expressed as  $\mu\text{m}$ .

## *2.8. Acid and neutral mucine-producing cells*

After deparaffinization with xylene, the sections were hydrated in decreasing alcohols. Then, it was used Alcian Blue (pH 1.0 and 2.5) for 40 minutes and counter-staining with Meyer's Hematoxylin for 30 seconds to stain acid mucine-producing cells.

To stain neutral mucine-producing cells, the sections were oxidized with 1% Periodic Acid for five minutes. Next, they were stained with Schiff's Reactive for 15 minutes, followed by three baths in sulfurous water. Counter-staining was made with Hematoxylin for one minute.

After staining, the sections were dehydrated in ascending series of alcohol followed by clearing in xylene and were mounted under coverslip with Permount® synthetic resin.

The number of caliciform stained by these methods was quantified in 2,500 cells in whole and longitudinally oriented villi with the aid of an optical microscope Olympus 43 BX41 (Evident Headquarters – Shinjuku-ku, Tokyo, Japan) under 40X objective. The ratio between the number of caliciform cells and the number of enterocytes was defined as the percentage of caliciform cells, being % caliciform cells = (number of caliciform cells / total number of cells in the villus) x 100.

### *2.9. Quantitative PCR of jejunal pro-and anti-inflammatory cytokines*

Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Waltham, MA, USA) and reverse-transcribed to cDNA (High-Capacity cDNA kit, Applied Biosystems, Foster USA, Waltham, MA, USA). Gene expression was evaluated by real-time PCR using SYBR Green as the fluorescent dye (Invitrogen Life Technologies, Waltham, MA, USA). We performed gene expression analysis using the ribosomal protein lateral stalk subunit P0 gene (Rplp0) as the internal control. The primer sequence was IL-1 $\beta$  (NM\_008361.4) sense GGCAGCTACCTGTGTCTTTCCC, antisense AT-ATGGGTCCGACAGCACGAG, TNF- $\alpha$  (NM\_001278601.1) sense TCTTCTCATTCCCTGCTTGTGGC, antisense CACTTGGTGGTTTGCTACGACG, IL-10 (NM\_010548.2) sense TGCCAAGCCTTATCGGAAATG, antisense AAATCGATGACAGCGCCTCAG.

## 2.10. Statistics

All the data sets were expressed as mean±standard deviation (SD) and subjected to Shapiro-Wilk normality test. Nonparametric data were analyzed through Kruskal-Wallis followed by Dunns post hoc. Parametric data were compared through one-way ANOVA followed by Tukey post hoc. The significance level adopted was 5%. Statistics and graphs were made on Prism 5.0 (GraphPad - San Diego, CA, USA).

## 3. Results and discussion

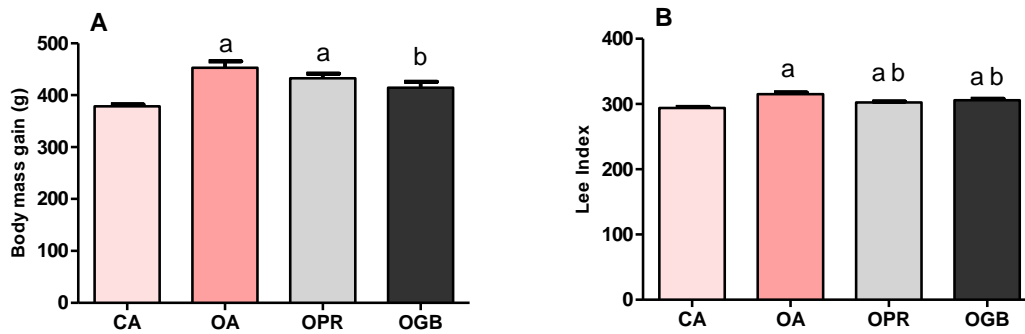
### 3.1. Prevention and especially treatment with GB decrease body mass gain and adiposity

In order to cause obesity, the animals from groups OA, OPR and OGB were fed with diet enriched with simple carbohydrates (DESC). This diet increased body mass gain by 20% (Fig. 1A) in group OA compared to CA, which were fed with standard rodent chow. Similar results were described by others (Crepaldi et al., 2018; Lima et al., 2008) using DESC, which showed the efficacy of this model of diet-induced obesity.

In addition to having a higher caloric content, which by itself increases the daily caloric intake and, consequently, body mass gain, DESC also contains a lower protein content, which decreases the lean body mass (Crepaldi et al., 2018; Dos Santos et al., 2016). It is known that 1 kg of skeletal muscle mass spends 13 kcal per day, while 1 kg of fat spends only 4.5 kcal per day (Mcclave & Snider, 2001). Under this perspective, the total energy consumption decreases as lean mass diminishes, and this may have contributed to the body mass gain of group OA.

GB prevention (group OPR) did not affect body mass gain (Fig. 1A), while GB treatment (group OGB) was effective in decreasing it by 10% when compared with the non-treated obese group (OA). As for the Lee Index (Fig. 1B), a measure of obesity equivalent to the body mass index (BMI) of humans, it was noticed that it was increased by

DESC in group OA compared with CA. Both the prevention and the treatment with GB were effective in reducing the Lee Index by 5% and 4%, respectively,



**Fig. 1.** Body mass gain (A) and Lee Index (B) of rats from groups control + water (CA), obese + water (OA), obese preventive with Goji berry (OPR) and obese treated with Goji berry (OGB) at the age of 130 days. Data presented as mean  $\pm$  SD; a  $p < 0,05$  vs CA; b  $p < 0,05$  vs OA; one-way ANOVA/Tukey; n=10 per group.

The lower body mass gain and Lee Index can be attributed to the polysaccharides of GB, which are the major compounds with anti-obesogenic activity of this fruit (Jiang et al., 2021). Studies have shown that the administration of polysaccharides from GB (PGB) decreases visceral adiposity (Crepaldi et al., 2018; Amagase & Nance, 2011) and, therefore, total body mass (Crepaldi et al., 2018; Zhang et al., 2002). To check the effects of GB prevention and treatment on fat mass, the retroperitoneal and mesenteric fats were removed and weighed. The relative mass of these fats is presented in Table 2.

**Table 2**

Relative mass (g/100 g) of the retroperitoneal and mesenteric fats of rats from groups control + water (CA), obese + water (OA), obese preventive with Goji berry (POR) and obese treated with Goji berry (OGB) at the age of 130 days.

	CA	OA	OPR	OGB
Retroperitoneal fat (g/100 g) <sup>1</sup>	1.63 $\pm$ 0.33	2.79 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	2.07 $\pm$ 0.20	2.27 $\pm$ 0.51
Mesentérica fat (g/100 g) <sup>2</sup>	1.47 $\pm$ 0.35	2.30 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	1.84 $\pm$ 0.26	1.54 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>

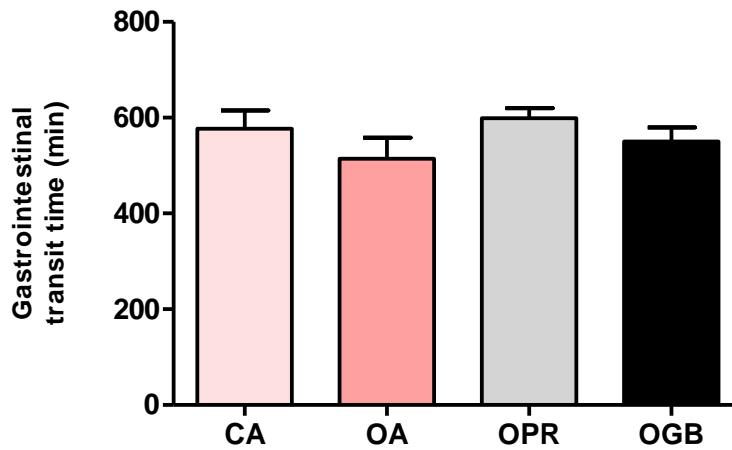
Data presented as mean  $\pm$  SD; a  $p < 0,05$  vs CA; b  $p < 0,05$  vs OA.<sup>1</sup> Kruskal-Wallis/Dunns; <sup>2</sup>one way ANOVA/Tukey; n=10 per group.

Both fats were larger in group OA when compared with CA, showing once more the efficacy of DESC in causing obesity. Prevention with GB (group OPR) maintained these fats similar to those of the control group, although still not different from group OA. On the other hand, the treatment with GB (group OGB) reduced these fats to values similar to group CA and the mesenteric fat to values lower than group OA.

This result showed the efficacy of the prevention and especially the treatment with GB in decreasing visceral fat. There are some hypotheses to explain this outcome: the first is the fact that PGBs are capable of decreasing the liver expression of SRBP-1c through activation of AMPK, thus directly affecting liver accumulation (Li et al., 2014); the second is that GB also increases caloric expenditure possibly by modulating the adrenocortical steroids that contribute to energy regulation and obesity control (Amagase & Nance, 2011); and finally, GB is capable of improving the intestinal dysbiosis, which is directly related to the development of obesity (Yang et al., 2021).

### *3.2. DESC and GB did not affect gastrointestinal transit time*

The gastrointestinal tract (GIT) plays an essential role in the control of food intake, digestion, and absorption of nutrients. The accomplishment of these tasks depends on an intact and well-coordinated intestinal motility, as it determines the ordered digestion of food, the appropriate absorption of nutrients and the opportune excretion of the residues (Zheng et al., 2022). It is known that an accelerated intestinal transit can reduce the absorption of nutrients and decrease body mass, while a retarded transit time can enhance absorption and body mass gain. In obese humans, the observed alterations in GIT motility may contribute to the development and maintenance of obesity and to changes in feeding behavior (Xing & Chen, 2004). The test of gastrointestinal transit time (Fig. 2) was carried out to check if this parameter was affected by the DESC-induced obesity and by GB prevention and treatment.



**Fig. 2.** Gastrointestinal transit time of rats from groups control + water (CA), obese + water (OA), obese preventive with Goji berry (OPR) and obese treated with Goji berry (OGB) at the age of 130 days. Data presented as mean  $\pm$  SD; one-way ANOVA/Tukey; n=10 per group.

DESC did not affect gastrointestinal transit time, suggesting that gastrointestinal motility was not altered in the rats. Similar results were described by Kunz et al., (2019) and Beraldi et al., (2019) in mice with high fat diet-induced obesity. Neither prevention nor treatment with GB had significant effects on the transit time.

### 3.3. GB decreases the morphometric alterations of the jejunal wall caused by DESC

It is known that obesity, especially when caused by hypercaloric and/or hyperlipidic diets, can affect the components of the intestinal wall. For instance, rats fed an hyperlipidic diet (HFD) have increased small intestine length, villi height, crypt depth and total wall thickness, in addition to decreased number of calciform cells (Soares et al., 2015). Therefore, samples of jejunum were analyzed morphometrically to investigate the effects of DESC and GB on the morphology of the small intestine.

The diet reduced the small intestine length in 15%, 25% and 22% in groups OA, OPR and OGB, respectively (Table 3). DESC is considered hypoproteic compared with standard rodent chow, as it contains 14% less protein (Lima et al., 2008). Azevedo et al.

(2007) also recorded a decreased small intestine length in rats subjected to hypoproteic diet. Jejunal width was not affected by DESC or GB.

**Table 3**

Morphometry of the jejunal wall of rats from groups control + water (CA), obese + water (OA), obese preventive with Goji berry (OPR) and obese treated with Goji berry (OGB) at the age of 130 days.

	CA	OA	OPR	OGB
IL (cm) <sup>1</sup>	106 ± 13.62	90.6 ± 8.90 <sup>a</sup>	80 ± 7.51 <sup>a</sup>	82.60 ± 11.72 <sup>a</sup>
JW (cm) <sup>2</sup>	0.96 ± 0.15	1.02 ± 0.12	1.08 ± 0.22	1.20 ± 0.43
WT (µm) <sup>2</sup>	516.7 ± 18.71	660.9 ± 20.7 <sup>a</sup>	586 ± 19.63 <sup>ab</sup>	544.4 ± 19.44 <sup>ab</sup>
MT (µm) <sup>2</sup>	429 ± 18.59	491.7 ± 27.31 <sup>a</sup>	475.8 ± 21.93 <sup>ab</sup>	448.1 ± 21.93 <sup>ab</sup>
SMT (µm) <sup>2</sup>	19.69 ± 1.35	21.11 ± 1.56 <sup>a</sup>	21.19 ± 1.23 <sup>a</sup>	18.99 ± 1.53 <sup>ab</sup>
EMT (µm) <sup>2</sup>	61.01 ± 4.53	68.73 ± 2.74 <sup>a</sup>	66.16 ± 4.14 <sup>a</sup>	56.52 ± 2.41 <sup>ab</sup>
VH (µm) <sup>1</sup>	306.2 ± 13.75	348.1 ± 17.97 <sup>a</sup>	353.1 ± 17.94 <sup>a</sup>	330.5 ± 13.09 <sup>ab</sup>
CD (µm) <sup>1</sup>	140.9 ± 7.26	166.5 ± 5.80 <sup>a</sup>	149.3 ± 6.95 <sup>ab</sup>	138.6 ± 6.37 <sup>b</sup>

Small intestine length (IL), jejunal width (JW), total wall thickness (WT), mucosal tunica (MT), submucosal tunica (SMT), external muscle tunica (EMT), villi height (VH) and crypt depth (CD). Data presented as mean ± SD; a p<0,05 vs CA; b p<0,05 vs OA. <sup>1</sup> one-way ANOVA/Tukey; <sup>2</sup> Kruskal-Wallis/Dunns; n=7 per group.

The intestinal wall is organized into four tunicas: mucosa, submucosa, external muscle and serosa (Kierszenbaum, 2016). All the rats fed with DESC showed a significant increase in total wall thickness, mucosa, submucosa and external muscle tunicas, villi height and crypt depth of the jejunum compared with control rats, observations that are similar to those in cafeteria-diet obese rodents (Scoaris et al., 2010; Soares et al., 2015). As DESC has a 9% higher caloric content, it is possible to consider that there was an adaptive response of the intestine (Pluske et al., 1997) manifested as an increase of absorptive surface and total wall, which is very common in instances of food overload (Stenkam-Strahm et al., 2013).

In comparison with group OA, prevention and treatment with GB (groups OPR and OGB) were effective in decreasing total wall thickness, mucosal tunica and crypt depth. In addition, GB treatment reduced the thickness of external muscle and submucosal tunica and the height of the villi. Tian et al. (2021) assessed the effects of *Lycium ruthenicum*, another member of the Solenaceae family, known as black Goji berry, on intestinal parameters of HFD-fed mice. In that study, as in the present one, it was observed

that the morphologic aspect, the organization of the tunicas and their elements were preserved in the animals treated with GB.

This can be explained by the fact that GB is rich in polysaccharides, the major components of alimentary fibers: 3.63 g of fibers are found in 100 g of GB fruit (Ilic et al., 2020). Alimentary fibers improve gastrointestinal motility, reducing the food overload (Hurtado & Caliari, 2010). The reduced food overload takes place because the ingestion of fibers is capable of decreasing the caloric content of the ingested foods by quelating a certain amount of fat and diminishing its intestinal absorption (Da-Silva et al., 1997).

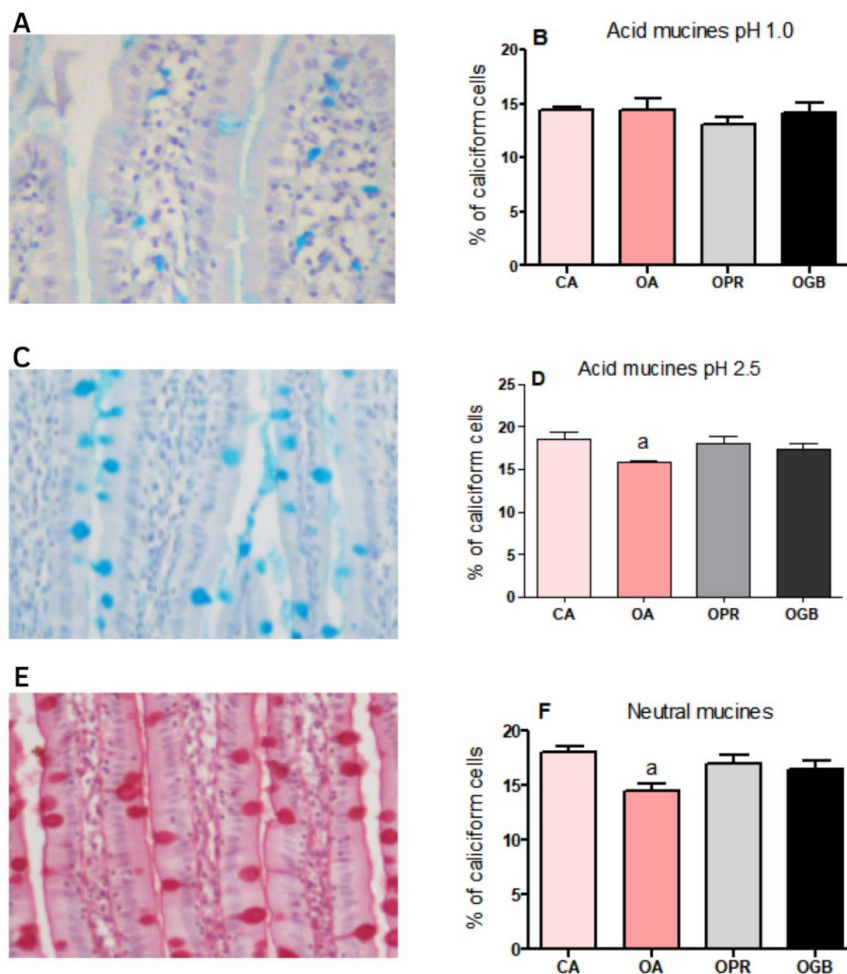
#### *3.4. GB preserves the jejunal caliciform cells*

The most frequently ingested food and the composition of the intestinal microbiota are directly related to each other, reflecting on the functioning of the epithelial cells of the intestine through the regulation of the caliciform cells and their numbers (Sharma & Schumacher, 1995; Bona et al., 2022). The caliciform cells are responsible for the synthesis and release of acid and neutral mucines. Acid mucines are composed of sialomucines and sulphomucines. The former responsible for the elimination of hydroxyl radicals, while the latter protect the intestine from bacterial translocation. The neutral mucines, in turn, are essential to buffer acidic environments, such as that of the stomach (Truter et al., 2016).

Alcian Blue pH 1 and pH 2.5 (Fig. 4A and 4C) stains the sulphomucine (AB+ pH 1.0) and sialomucine and sulphomucine (AB+ pH 2.5) caliciform cells. There were no significant differences in the percentage of sulphomucine-producing caliciform cells (AB+ pH .0) across the groups (Fig. 4B). On the other hand, there was a significant 3% decrease in the sialomucine- and sulphomucine-producing caliciform cells (AB+ pH 2.5) in rats from group OA (Fig. 4D). Both the prevention and the treatment with GB prevented this observation, so that the percentage of AB+ pH 2.5 caliciform cells was not different between the groups CA, OPR and OGB.



The results on the neutral mucine-producing cells (Fig. 4E) evidenced by PAS histochemistry showed that there was a significant decrease of these cells in group OA compared with CA. Truter et al. (2017) and Soares et al. (2015) also recorded a decreased number of caliciform cells in obese rats. The percentage of neutral mucine-producing cells did not differ across groups OPR, OGB and CA, demonstrating that both the prevention and the treatment with GB were effective in preventing the decrease of these



cells.

**Fig. 4.** Histochemistry of cells producing acid mucines at jejunum AB<sup>+</sup> pH 1.0 (A) and pH 2.5 (C) and neutral mucines PAS<sup>+</sup> (E). Magnification of 40x. In B, D and F, percentagem of caliciform cells of rats from groups control + water (CA), obese + water (OA), obese preventive with Goji berry (OPR) and obese treated with Goji berry (OGB) at the age of 130 days. Data presented as mean ± SD; a p<0,05 vs CA; one-way ANOVA/Tukey; n = 7 per group.

PGBs can modulate the intestinal microbiota and favor the growth of beneficial bacteria, such as those producing short-chain fatty acids (Ding et al., 2019). Tian et al. (2021) noticed that the presence of GB in the diet was capable of increasing the presence of these bacteria in the large intestine of rats, leading to an increased expression of occlusion junction proteins and of mucines. This improved the composition of the microbiota, reduced intestinal permeability and enhanced the mucosal barrier. The results described here agree with this recent report, given that both the prevention and the treatment with GB prevented the decreased percentage of caliciform cells (AB+ pH 2.5 and PAS) caused by obesity alone (group OA) and that this could be attributed to a more efficient mucosal barrier (Ding et al., 2021).

In general, the diminished caliciform cells is linked to a diminished mucus release. This can impact on the intestinal homeostasis because an impaired mucosal protection is, most probably, an event preceding the development of inflammatory conditions. The increased bacterial penetration in the mucus and the increased interactions between the microbiota and the intestinal epithelium is what triggers inflammation in mice (Gustafsson & Johansson, 2022).

### *3.5. DESC increases pro-inflammatory cytokines in the jejunum, an effect reversed by GB*

Fig. 5 presents the gene expression of pro- (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in jejunal samples from rats of groups CA, OA, OPR and OGB. DESC-induced obesity increased the expression of IL-1 $\beta$  in group OA 5 times compared with CA (Fig. 5A). Both the prevention and the treatment with GB were capable of reducing this cytokine to levels similar to the control group. A similar result was noticed for the expression of TNF- $\alpha$  (Fig. 5B): DESC increased it 6 times, while GB (prevention and treatment) brought this pro-inflammatory cytokine to control levels.

IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was not affected by DESC, so that there was no difference between groups CA and OA (Fig. 5C). Still, prevention and treatment with GB could increase the relative expression of this cytokine 31 and 24 times, respectively.

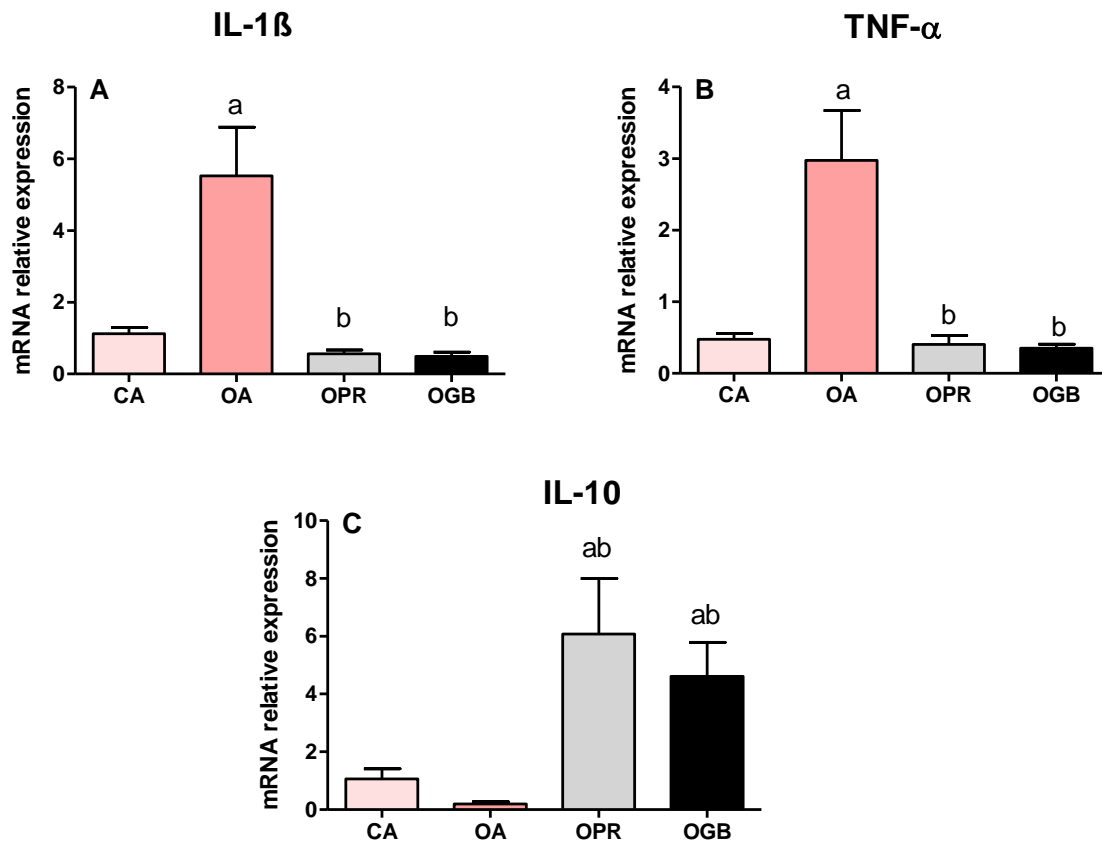
The potential contribution of chronic inflammation for the development of metabolic diseases was put forward many years ago. For instance, Feingold et al. (1989) highlighted that TNF- $\alpha$  makes rodents glucose intolerant. The observation that, in obesity, adipose tissue expresses high levels of TNF- $\alpha$  and that its neutralization improves insulin sensitivity and glucose tolerance were key findings to establish the association between immune cells and metabolic impairments (Yuan et al., 2001).

Pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), can activate many cell signaling molecules, such as the inhibitory protein of nuclear factor kappa  $\beta$  (IKK  $\beta$ ), which is an essential component of the inflammation signaling system. The activation of this pathway increases the expression of inflammatory mediators, such as cytokines, and therefore setting an inflammatory positive feedback cycle (Rohm et al., 2022). In addition, the excessive body fat decreases the release of anti-inflammatory cytokines such as interleukin-10 (IL-10) (Saltiel & Olesky, 2017).

Although adipose tissue and liver are considered targets of the metabolic inflammation of obesity (Tilg et al., 2020), several studies on animal models of HFD-induced obesity pointed to increased intestinal permeability, impairment of the intestinal epithelial barrier and inflammation of the gastrointestinal tract (Bona et al., 2022; La Serre et al., 2010; Li et al., 2008).

Increased permeability is a sign of intestinal barrier dysfunction that can disturb the immune homeostasis and stimulate inflammation and tissue damage (Chang et al., 2017). This is because as intestinal permeability increases there is an increased translocation of microbiota-derived lipopolysaccharides (LPS) to the bloodstream. The outcome is serum LPS 2-3 times higher in response to non-infectious stimuli, which is known as endotoxemia (Bellenger et al., 2019). This condition can be the trigger for the

inflammatory activation mediated by Toll-like receptors, causing a low-grade chronic inflammation and oxidative stress (Bona et al., 2022).



**Fig. 5.** Relative gene expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in the jejunum of rats from groups control + water (CA), obese + water (OA), obese preventive with Goji berry (OPR) and obese treated with Goji berry (OGB) at the age of 130 days. Interleukin 1 $\beta$  (A), tumor necrosis factor  $\alpha$  (B) and interleukin 10 (C). Data presented as mean  $\pm$  SD; a  $p < 0,05$  vs CA; b  $p < 0,05$  vs OA; *one-way* ANOVA/Tukey;  $n = 8$  per group

The results described here reinforce that GB has anti-inflammatory properties, as it decreased the intestinal expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  and increase the anti-inflammatory cytokine IL-10. The anti-inflammatory actions of GB in the intestine can be attributed as well to the PGBs acting as prebiotics, improving intestinal microbiota, especially by the large increase of beneficial bacteria, such as bifidobacteria and butyrate-producing bacteria (Tian et al., 2021).

Bifidobacteria are regarded as key elements of the animal-bacteria interaction, playing an essential role in the maintenance of intestinal homeostasis by fermenting carbohydrates and producing short-chain fatty acids (Zheng et al., 2022). Butyrate, one of these short-chain fatty acids, is the preferential energy source for the intestinal cells, its deficiency being directly related to conditions of intestinal inflammation and colitis. This suggests that the microbiota metabolites have a fundamental role on the beneficial effects of GB against intestinal inflammation (Wang et al., 2019).

In addition to reducing inflammation by improvement of the microbiota, GB is also capable of increasing the expression of proteins from the occlusion junction, such as occludine and claudine, and thus reduce intestinal permeability (Tian et al., 2021). A more efficient intestinal barrier may imply that there is less LPS migration to the bloodstream and less activation of the Toll-like receptor-mediated inflammatory pathway.

#### **4. Conclusion**

In this model of diet-induced obesity in rats, the efficacy of prevention and especially treatment with GB in preserving the morphofunctional integrity and decreasing the inflammatory process of the intestine was demonstrated, as well as the effects of GB on whole body mass and composition. The importance of these results lies on the central role of the gastrointestinal tract in obesity and its collateral damaging effects.

#### **Acknowledgments**

The authors thank CNPq and CAPES for their financial support and Professor Dr. Rui Curi for kindly providing space and reagents for the RT-PCR.

## References

- Amagase, H., & Farnsworth, N. R. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, 44(7), 1702-1717.
- Amagase, H., & Nance, D. M. (2008). A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized *Lycium barbarum* (Goji) juice, GoChi™. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 14(4), 403-412.
- Amoroso, C., Perillo, F., Strati, F., Fantini, M., Caprioli, F., & Facciotti, F. (2020). The role of gut microbiota biomodulators on mucosal immunity and intestinal inflammation. *Cells*, 9(5), 1234.
- Azevedo, J. F., Hermes, C., Manzano, M. A., Araújo, E. J. D. A., & Sant'Ana, D. D. M. G. (2007). Análise morfológica da parede intestinal do íleo de ratos submetidos a intensa carência de proteínas. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia Unipar*, 10(2), 85-90.
- Bak, S. G., Hyung-Jin, L., Won, Y. S., Lee, S., Cheong, S. H., Lee, S. J. & Rho, M. C. (2022). Regulatory effects of *Lycium barbarum* extract and isolated scopoletin on atopic dermatitis-like skin inflammation. *BioMed Research International*, 2022, 2475699.
- Beraldi, E. J., Soares, A., Borges, S. C., de Souza, A. C. D. S., Natali, M. R. M., Bazotte, R. B., & Buttow, N. C. (2015). High-fat diet promotes neuronal loss in the myenteric plexus of the large intestine in mice. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(4), 841-849.
- Bernardis, L. L., & Patterson, B. D. (1968). Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*, 40(4), 527-528.
- Bona, M. D., Torres, C. H. D. M., Lima, S. C. V. C., Morais, A. H. D. A., Lima, A. Â. M., & Maciel, B. L. L. (2022). Intestinal barrier permeability in obese individuals with or without metabolic syndrome: a systematic review. *Nutrients*, 14(17), 3649.
- Chang, J., Leong, R. W., Wasinger, V. C., Yang, M., & Phan, T. G. (2017). Impaired intestinal permeability contributes to ongoing bowel symptoms in patients with inflammatory bowel disease and mucosal healing. *Gastroenterology*, 153(3), 723-731.
- Chang, R. C. C., & So, K. F. (2008). Use of anti-aging herbal medicine, *Lycium barbarum*, against aging-associated diseases. What do we know so far? *Cellular and Molecular Neurobiology*, 28(5), 643-652.
- Cheng, J., Zhou, Z. W., Sheng, H. P., He, L. J., Fan, X. W., He, Z. X., ... & Zhou, S. F. (2015). An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Drug design, development and therapy*, 9, 33-78
- Cildir, G., Akincilar, S. C., & Tergaonkar, V. (2013). Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends In Molecular Medicine*, 19(8), 487-500.
- Crepaldi, L. D., Mariano, I. R., Trondoli, A. J. P. C., Moreno, F. N., Piovan, S., Formigoni, M., Salgueiro-Pagadigorria, C. L., Godoi, V. A. F., Brito, M. N., & Garcia,

- R. F. (2018). Goji berry (*Lycium barbarum*) extract improves biometric, plasmatic and hepatic parameters of rats fed a high-carbohydrate diet. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 877-889.
- Da-Silva, R., Franco, C. M., & Gomes, E. (1997). Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(2), 249-260.
- Ding, Y., Chen, D., Yan, Y., Chen, G., Ran, L., Mi, J., Cao, Y. (2021). Effects of long-term consumption of polysaccharides from the fruit of *Lycium barbarum* on host's health. *Food Research International*, 139, 109913.
- Ding, Y., Yan, Y., Chen, D., Ran, L., Mi, J., Lu, L., Cao, Y. (2019). Modulating effects of polysaccharides from the fruits of *Lycium barbarum* on the immune response and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice. *Food & Function*, 10(6), 3671-3683.
- Dos Santos, M. P., Batistela, E., Pereira, M. P., Paula-Gomes, S., Zanon, N. M., do Carmo Kettelhut, I., Kawashita, N. H. (2016). Higher insulin sensitivity in EDL muscle of rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet inhibits the caspase-3 and ubiquitin-proteasome proteolytic systems but does not increase protein synthesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 34, 89-98.
- Feingold, K. R., Soued, M., Staprans, I., Gavin, L. A., Donahue, M. E., Huang, B. J., ... & Grunfeld, C. (1989). Effect of tumor necrosis factor (TNF) on lipid metabolism in the diabetic rat. Evidence that inhibition of adipose tissue lipoprotein lipase activity is not required for TNF-induced hyperlipidemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(4), 1116-1121.
- Gao, X., Xu, Z., Li, Z. (2000). Traditional Chinese Medicines. *People's Health Publish House*, 7-19.
- Huang, Y., Zhang, X., Chen, L., Ren, B. X., & Tang, F. R. (2023). *Lycium barbarum* ameliorates neural damage induced by experimental ischemic stroke and radiation exposure. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 28(2), 38.
- Hurtado, D. C., & Calliari, C. M. (2010). Fibras alimentares no controle da obesidade. *Inesul (Londrina)*, 15.
- Ilić, T., Dodevska, M., Marčetić, M., Božić, D., Kodranov, I., & Vidović, B. (2020). Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial properties of goji berries cultivated in Serbia. *Foods*, 9(11), 1614.
- Jiang, Y., Fang, Z., Leonard, W., & Zhang, P. (2021). Phenolic compounds in *Lycium* berry: Composition, health benefits and industrial applications. *Journal of Functional Foods*, 77, 104340.
- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 320(3), C375-C391.
- Kierszenbaum, A. L. (2016). *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Elsevier. Rio De Janeiro: Elsevier Science - Contents Direc.
- Kunz, R. I., Capelassi, A. N., Alegre-Maller, A. C. P., Bonfleur, M. L., Ribeiro, L. D. F. C., Costa, R. M., & Natali, M. R. M. (2019). Sericina como tratamento da obesidade:

efeitos morfofisiológicos de camundongos obesos por dieta hiperlipídica. *Einstein (São Paulo)*, 18:eAO4876.

La Serre, C. B., Ellis, C. L., Lee, J., Hartman, A. L., Rutledge, J. C., & Raybould, H. E. (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), G440-G448.

Li, H., Lelliott, C., Håkansson, P., Ploj, K., Tuneld, A., Verolin-Johansson, M., ... & Michaëlsson, E. (2008). Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism*, 57(12), 1704-1710.

Li, W., Li, Y., Wang, Q., & Yang, Y. (2014). Crude extracts from *Lycium barbarum* suppress SREBP-1c expression and prevent diet-induced fatty liver through AMPK activation *BioMed Research International*, 2014, 196-198.

Lima, D. C., Silveira, S. A., Haibara, A. S., & Coimbra, C. C. (2008). The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metabolic Brain Disease*, 23(4), 361-373.

Liu, Y. C., Chang, C. C., Matsui, H., & Chao, J. C. J. (2022). C-Phycocyanin and *Lycium barbarum* polysaccharides protect against aspirin-induced inflammation and apoptosis in gastric RGM-1 cells. *Nutrients*, 14(23), 5113.

Luo, Q., Cai, Y., Yan, J., Sun, M., & Corke, H. (2004). Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life sciences*, 76(2), 137-149.

Ma, X., Nan, F., Liang, H., Shu, P., Fan, X., Song, X. & Zhang, D. (2022). Excessive intake of sugar: an accomplice of inflammation. *Frontiers in Immunology*, 13, 988481.

McClave, S. A., & Snider, H. L. (2001). Dissecting the energy needs of the body. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 4(2), 143-147.

Pluske, J. R., Hampson, D. J., & Williams, I. H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, 51(1-3), 215-236.

Potterat, O. (2010). Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. *Planta Medica*, 76(01), 7-19.

Rohm, T. V., Meier, D. T., Olefsky, J. M., & Donath, M. Y. (2022). Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity*, 55(1), 31-55.

Saltiel, A. R., & Olefsky, J. M. (2017). Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 1-4.

Schetz, M., De Jong, A., Deane, A. M., Druml, W., Hemelaar, P., Pelosi, P., ... & Jaber, S. (2019). Obesity in the critically ill: a narrative review. *Intensive Care Medicine*, 45(6), 757-769.

Scoaris, C. R., Rizo, G. V., Roldi, L. P., de Moraes, S. M. F., de Proença, A. R. G., Peralta, R. M., & Natali, M. R. M. (2010). Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition*, 26(3), 312-320.



- Sharma, R., & Schumacher, U. (1995). Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 40(12), 2532-2539.
- Soares, A., Beraldi, E. J., Ferreira, P. E. B., Bazotte, R. B., & Buttow, N. C. (2015). Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. *BMC Gastroenterology*, 15(1), 1-9.
- Stenkamp-Strahm, C., Patterson, S., Boren, J., Gericke, M., & Balemba, O. (2013). High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine. *Autonomic Neuroscience*, 177(2), 199-210.
- Teixeira, F., Silva, A. M., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2023). *Lycium barbarum* berries (Solanaceae) as source of bioactive compounds for healthy purposes: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4777.
- Tian, B., Zhao, J., Zhang, M., Chen, Z., Ma, Q., Liu, H., ... & Li, J. (2021). *Lycium ruthenicum* Anthocyanins attenuate high-fat diet-induced colonic barrier dysfunction and inflammation in mice by modulating the gut microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(8), 2000745.
- Tilg, H., Zmora, N., Adolph, T. E., & Elinav, E. (2020). The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 40-54.
- Truter, D., Strijdom, H., Everson, F., & Kotzé, S. H. (2017). Mucin secreting cells in the stomach and colon are altered by combination antiretroviral treatment in an obese rat model. *Acta Histochemica*, 119(2), 122-128.
- Wang, H., Zhang, S., Shen, Q., & Zhu, M. J. (2019). A metabolomic explanation on beneficial effects of dietary Goji on intestine inflammation. *Journal of Functional Foods*, 53, 109-114.
- Wang, Y., Zhao, H., Sheng, X., Gambino, P. E., Costello, B., & Bojanowski, K. (2002). Protective effect of Fructus Lycii polysaccharides against time and hyperthermia-induced damage in cultured seminiferous epithelium. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2-3), 169-175.
- Who - World Health Organization. (2022). Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. *World Health Organization Technical Report Series*, 894, 1-253.
- Wu, H., & Ballantyne, C. M. (2020). Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity. *Circulation Research*, 126(11), 1549-1564.
- Xing, J., & Chen, J. D. (2004). Alterations of gastrointestinal motility in obesity. *Obesity Research*, 12(11), 1723-1732.
- Yang, Y., Chang, Y., Wu, Y., Liu, H., Liu, Q., Kang, Z., ... & Duan, J. (2021). A homogeneous polysaccharide from *Lycium barbarum*: Structural characterizations, anti-obesity effects and impacts on gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 2074-2087.
- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., & Shoelson, S. E. (2001). Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk $\beta$ . *Science*, 293(5535), 1673-1677.

Zhang, M., Wang, J., & Zhang, S. (2002). Study on the composition of *Lycium barbarum* polysaccharides and its effects on the growth of weanling mice. *Journal of Hygiene Research*, 31(2), 118-119.

Zhao W.-H., Shi Y.-P. Comprehensive analysis of phenolic compounds in four varieties of goji berries at different ripening stages by UPLC–MS/MS. *J. Food Compos. Anal.* 2022;106:104279.

Zheng, Z., Hu, Y., Tang, J., & Zhang, W. (2022). Role of gut microbiota-derived signals in the regulation of gastrointestinal motility. *Frontiers in Medicine*, 2173.

CAPÍTULO II

**GOJI BERRY (*Lycium barbarum*) REDUZ A INFLAMAÇÃO  
HEPÁTICA E A INTOLERÂNCIA À GLICOSE EM RATOS  
OBESOS**

Esse artigo será submetido ao Periódico Nutrients

# Goji berry (*Lycium barbarum*) reduz a inflamação hepática e a intolerância à glicose em ratos obesos

Isabela Ramos Mariano Furlan <sup>1,\*</sup>, Samara Cristina Dossena <sup>1</sup>, Ana Luiza Russo Duarte <sup>1</sup>, Maria Montserrat Diaz Pedrosa <sup>2</sup>, Laureane Nunes Masi <sup>3</sup> and Maria Raquel Marçal Natali <sup>4</sup>

- <sup>1</sup> Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil; isabelaramos94@gmail.com; samara.c.dossena@hotmail.com; anahluizah@outlook.com
- <sup>2</sup> Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas. Zona 07, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil; mmontserratpedrosa@gmail.com
- <sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Fisiológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas. Trindade, 88036700 – Florianópolis, SC – Brasil; laure\_masi@hotmail.com
- <sup>4</sup> Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Morfológicas. Zona 07, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil; mrmnatali@uem.br
- \* isabelaramos94@gmail.com

**Resumo:** Neste estudo, examinou-se os efeitos da prevenção e tratamento com Goji berry (GB) sobre a morfofisiologia e inflamação do fígado de ratos com obesidade induzida por dieta rica em carboidratos simples (DRCS). Os grupos experimentais foram CA (controle), OA (obeso), OGB (obeso tratado com GB) e OPR (obeso preventivo com GB). A DRCS foi administrada aos grupos obesos a partir dos 21 dias de idade. O GB foi administrado por gavagem intragástrica (250 mg/kg). Avaliou-se a massa corporal e de órgãos, índice de massa corporal, tolerância à glicose e insulina, morfologia hepática e expressão gênica de citocinas pró- e anti-inflamatórias hepáticas por PCR em tempo real. A DRCS aumentou a massa corporal e índice de massa corporal, enquanto o GB reduziu esses parâmetros e melhorou a tolerância à glicose. Não houve alteração significativa na tolerância à insulina. O GB também atenuou o aumento da área dos hepatócitos induzido pela DRCS e reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias no fígado. Esses resultados servem de base para futuras pesquisas e ressaltam o potencial do Goji berry como opção terapêutica contra a obesidade e suas complicações.

**Palavras-chave:** obesidade; fígado; inflamação.

**Citation:** To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



**Copyright:** © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introdução

Há milhares de anos, as plantas têm sido usadas como fonte de compostos para prevenir ou tratar problemas de saúde [1]. Atualmente, numerosas pesquisas destacaram a capacidade bioativa do Goji berry (GB) [2,3,4], em cultura de células [5], modelos animais [6] e em ensaios com humanos [7].

O *Lycium barbarum*, também conhecido como GB, é a espécie mais comum da família Solanaceae. Por milhares de anos, o GB tem sido usado na medicina tradicional dos países asiáticos, graças aos seus efeitos antioxidantes, hipoglicemiantes, hipolipemiantes, antimicrobianos, imunomodulatórios, anti-inflamatórios e anti-obesogênicos [4,8,9,10,11].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a obesidade é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde [12]. A obesidade alcançou proporções epidêmicas, sendo que 600 milhões de pessoas no mundo foram classificadas como obesas em 2020 [13]. Essa patologia está relacionada a severas doenças metabólicas, cardiovasculares e neurodegenerativas [14] e, também, a alguns tipos de câncer, como ovário, endométrio, rim, intestino grosso, próstata e mama em humanos [12].

A obesidade está associada a um estado inflamatório crônico de baixo grau, onde há aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e a interleucina-6 (IL-6), produzidas principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T [15]. Ao longo das últimas duas décadas, foi reconhecido que essa condição pode afetar numerosos tecidos e órgãos, como o próprio tecido adiposo, músculo esquelético, pâncreas, intestino, cérebro e o fígado, sendo o tecido adiposo e o fígado os principais focos da inflamação decorrente da obesidade [16]. Tanto células da resposta imune inata quanto adaptativa podem participar da ligação entre obesidade e inflamação, o que pode servir de ligação entre a obesidade, a resistência à insulina e o diabetes *mellitus* tipo 2 [17].

Do ponto de vista patológico, os mediadores inflamatórios estão associados aos danos hepáticos associados à obesidade [18,19]. Por exemplo, a IL-6 e o TNF- $\alpha$  estão associadas ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) [20]. A NAFLD inclui um espectro de doenças hepáticas crônicas variando de uma simples esteatose, em que o indivíduo tem apenas acúmulo de lipídeos, até uma esteato-hepatite não alcoólica. Nesse caso, além da concentração de lipídeos, há a presença de inflamação e de degeneração hepatocelular, podendo estar acompanhadas do aparecimento de fibrose e até mesmo evoluir para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular [21,22].

Estudo conduzido por Crepaldi et al. [6] identificou que ratos obesos alimentados com dieta rica em carboidratos simples têm aumento na quantidade de lipídeos totais no fígado, o que leva a aumento do estresse oxidativo e alteração do metabolismo hepático da glicose, e está correlacionado com maiores índices glicêmicos e insulinêmicos.

As observações de Crepaldi et al. [6] motivaram a investigação, neste estudo, dos efeitos do GB sobre a condição morfológica, funcional e inflamatória do fígado de ratos com obesidade induzida por dieta rica em carboidratos simples.

## 2. Metodologia

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob protocolo de nº 2072240419.

Foram utilizados 40 *Rattus norvegicus* machos da linhagem Wistar. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UEM ao desmame (21 dias de idade) com aproximadamente 60 g de massa corporal. Os grupos experimentais estabelecidos foram: CA (controle), animais alimentados com dieta padrão para roedores do desmame aos 130 dias de idade, que receberam administração intragástrica diária de água dos 70 aos 130 dias; OA (obeso), animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples (DRCS) do desmame aos 130 dias de idade, que receberam administração intragástrica diária de água dos 70 aos 130 dias; OGB (obeso tratado com GB), animais alimentados com DRCS do desmame aos 130 dias de idade, que receberam administração intragástrica diária de GB (250 mg/kg de massa corporal) dos 70 aos 130 dias; OPR (obeso preventivo com GB): animais alimentados com DRCS do desmame aos 130 dias de idade, que receberam administração intragástrica diária de GB (250 mg/kg de massa corporal) dos 21 aos 130 dias.

### 2.1. Indução à obesidade

A partir dos 21 dias, os animais pertencentes aos três grupos obesos foram alimentados com DRCS [6,23]. Para este preparo, foi utilizada ração comercial para roedores (Nuvilab, Curitiba, Brasil) triturada, com adição de leite condensado (Nestlé, Minas Gerais, Brasil), açúcar cristal (Alto Alegre, São Paulo, Br) e água. A ração foi preparada semanalmente e mantida sob refrigeração. Os animais tiveram acesso livre a água e alimento. Os valores nutricionais das dietas utilizadas estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores nutricionais da dieta padrão para roedores (informações do fabricante) e da DRCS [23].

Valores Nutricionais	Dieta padrão	DRCS
Carboidratos (%)	57,2	68
Proteínas (%)	30	16
Gorduras (%)	12,5	16
Água total (%)	12,5	27
Calorias (kcal/100 g de dieta)	292	318

### 2.2. Preparação do Goji Berry e acompanhamento dos grupos

O extrato em pó dos frutos de GB utilizado possuía 40,81% de polissacarídeos segundo as análises físico-químicas prévias realizadas pela Quimer® [6]. O extrato de GB foi preparado em farmácia de manipulação (Medicinal, Maringá, Brasil). Em seguida, cada 250 mg do extrato foram diluídos em 2 mL de água e, na sequência, administrados diariamente aos animais por gavagem intragástrica (0,2 mL/100 g de massa corporal). A dose utilizada (250 mg/kg de massa corporal) foi estabelecida de acordo com os testes de eficácia descritos por Luo et al. [24]. A massa corporal dos animais foi registrada uma vez por semana, para a análise da evolução da massa corporal. Aos 130 dias de idade, os ratos foram pesados novamente e o comprimento naso-anal (CNA) foi registrado para obtenção do IMC pela fórmula: massa corporal (g)/CNA(cm)<sup>2</sup>.

### 2.3. Teste de tolerância à glicose (GTT)

Aos 124 dias de idade, oito animais de cada grupo foram submetidos ao GTT. Após jejum noturno (aproximadamente 14 horas), os animais receberam gavagem intragástrica de glicose (1 g.kg de massa corporal<sup>-1</sup>) dissolvida em solução salina. Amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da gavagem de glicose (tempo 0) e nos tempos 5, 15, 30, 45 e 60 min. A glicose sanguínea foi determinada com tiras-teste e glicosímetro (Optium Exceed®; Abbott, São Paulo-SP, Brasil) e expressa como mg.dL<sup>-1</sup>. Finalizadas as coletas, os animais foram imediatamente realojados em suas caixas de origem e realimentados. Foi calculada a área sob a curva (AUC) da variação da glicemia ao longo dos 60 min de registro, considerando-se como linha da base a glicemia do tempo 0 de cada animal.

### 2.4. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Aos 128 dias de idade, os mesmos oito animais de cada grupo, com 6 horas de jejum, receberam injeção intraperitoneal de insulina (1U/kg de peso corporal<sup>-1</sup>; Novolin®; Novo Nordisk, Montes Claros-MG, Brasil) para o ITT (adaptado de Babata et al. [25]). Amostras de sangue foram coletadas por uma incisão na extremidade da cauda, nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min, sendo o tempo 0 imediatamente antes da administração da insulina. A glicemia foi determinada com tiras-teste e glicosímetro (e expressa como mg.dL<sup>-1</sup>). Finalizadas as coletas, os animais foram imediatamente realojados em suas caixas de origem e realimentados. Foi calculada a área sob a curva (AUC) da variação da glicemia ao longo de 60 minutos, considerando-se como linha de base 0 mg.dL<sup>-1</sup>.

### 2.5. Coleta de órgãos e tecidos

Aos 130 dias, os animais foram submetidos à eutanásia após jejum noturno por profundamento de anestesia (tiopental 120 mg/kg de massa corporal associado à lidocaína 5 mg/kg, intraperitoneal) para remoção do fígado, testículos, próstata, rins, coração e dos depósitos de gordura periepídídimal, inguinal e marrom escapular. Todas essas amostras foram pesadas. Na sequência, uma parte do fígado foi fixada em paraformaldeído 4% e a outra parte foi congelada a -80°C.

### 2.6. Histologia do fígado

Amostras de fígado foram fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas, sendo posteriormente transferidas para solução de álcool 70%. Em seguida, as amostras foram desidratadas por meio da utilização de álcool em concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Posteriormente foram realizados cortes histológicos transversais semi-seriados, de 5µm de espessura, com auxílio de micrótomo rotativo (Leica® RM2245).

**Análise morfológica:** para essa análise foram utilizados cortes corados com Hematoxilina e Eosina (H.E.). Foram capturadas imagens da região próxima à veia central, em microscópio óptico Olympus BX41® (objetiva de 20x) com câmera Olympus Q-Color® 3, acoplado a um computador com programa computacional Q-Capture®. Na análise morfológica foram mensurados 100 hepatócitos/animal, totalizando 600 hepatócitos/grupo (µm<sup>2</sup>), e foi avaliado o número de hepatócitos em 50 imagens/animal, totalizando 300 imagens/grupo (área total analisada: 27736,65µm<sup>2</sup>), realizadas por meio do programa Image Pró-Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Estados Unidos).

**Análise histoquímica:** para essa análise os cortes foram submetidos a reação histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.). Foram capturadas imagens da região próxima a veia central, em microscópio óptico Olympus BX41® (objetiva de 40x) com câmera Olympus Q-Color® 3, acoplado a um computador com programa computacional Q-Capture®. A análise histoquímica para avaliação do percentual de glicogênio tecidual foi feita pela mensuração da área total e área contendo glicogênio de 50 hepatócitos/imagem, em 300 imagens/animal, realizadas com auxílio do programa Image Pró-Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Estados Unidos).

## 2.7. PCR quantitativo de citocinas pró e anti-inflamatórias do fígado

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Waltham, MA, EUA) e transcrito reversamente para cDNA (kit de cDNA de alta capacidade, Applied Biosystems, Foster USA, Waltham, MA, EUA). A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real usando SYBR Green como corante fluorescente (Invitrogen Life Technologies, Waltham, MA, EUA). Foi realizada a análise de expressão gênica usando o gene P0 da subunidade lateral da proteína ribossômica (Rplp0) como controle interno. A sequência iniciadora foi: IL-1β (NM\_008361.4) sentido GGCAGCTACCTGTGTCTTTCCC, antisense ATATGGGTCCGACAGCAGCAG, IL-6 (NM\_001314054.1) sentido GGTAGCATC CATCATTTCTTTG, antisense, CGGAGAGGAGACTTCACAAGAG, TNF-α (NM\_001278601.1) sentido TCTTCTCATTCTGCTTGTGGC, anti-sentido CACTTGGTGGTTTGCTACGACG, IL-10 (NM\_010548.2) sentido TGCCAAGCCTTATCGGAAATG, anti-sentido AAATCGATGACAGCGCCTCAG.

## 2.8. Análise estatística

Todos os conjuntos de dados foram expressos como média±desvio padrão (DP) e submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns. Dados paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (*One-way* ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas usando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad, San Diego - CA, EUA).

## 3. Resultados

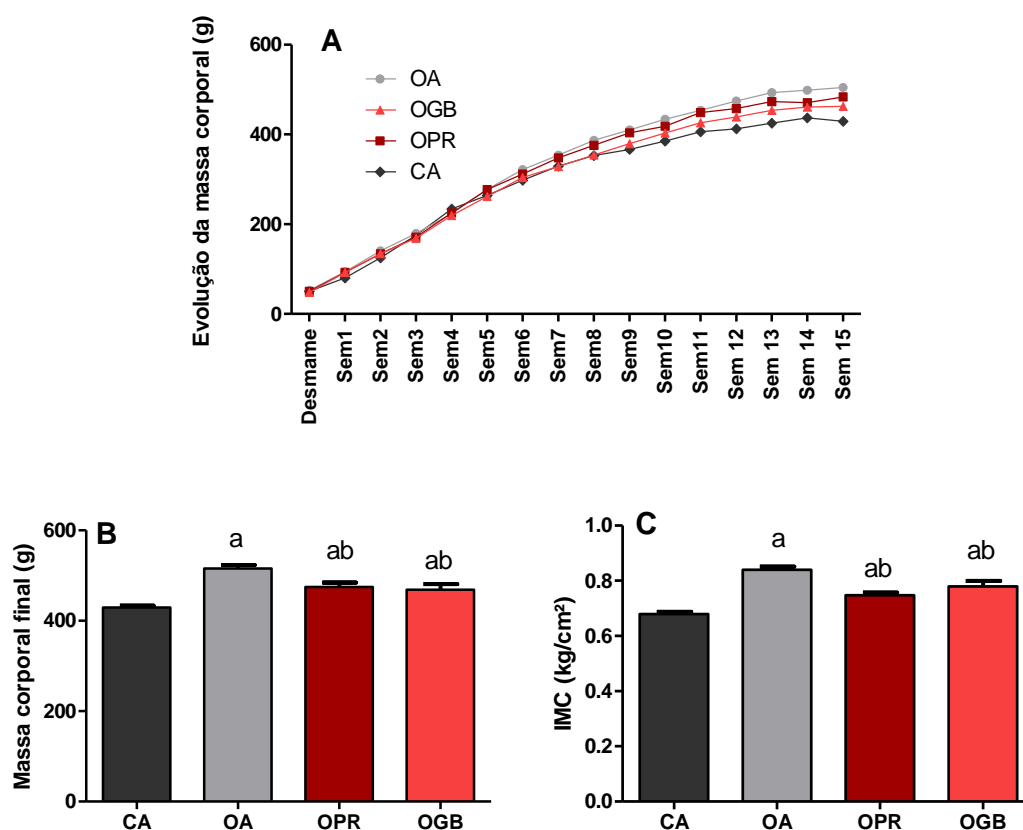
### 3.1. O Goji berry reduziu a massa corporal corporal final e a massa adiposa

Ao acompanhar a evolução da massa corporal (Figura 1A) nota-se que a partir da semana 8, os animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples (DRSC) (OA, OPR e OGB) começaram a apresentar massa corporal maior do que o grupo controle (CA).

Já na semana 9, a massa corporal dos animais alimentados com DRCS foi maior (Figura 1A) do que daqueles alimentados com dieta padrão, indicando que a obesidade já estava presente nos animais. 187  
188  
189

Aos 130 dias, na semana 15, a massa corporal final (Figura 1B) do grupo OA foi 20% maior do que a do CA. Tanto a prevenção (OPR) quanto o tratamento (OGB) com GB foram eficazes em reduzir esse parâmetro em relação ao grupo OA. 190  
191  
192

Ao avaliar o IMC (Figura 1C), o mesmo padrão foi repetido: aos 130 dias de idade, os animais do grupo OA tiveram IMC maior enquanto que nos grupos OPR e OGB essa variável foi menor. Nem a massa corporal final e nem o IMC se igualaram aos do grupo controle: o GB reduziu essas variáveis, mas não foi capaz de revertê-las totalmente. 193  
194  
195  
196



**Figura 1.** Evolução da massa corporal (A), massa corporal final (B) e IMC (C) de ratos dos grupos controle (CA), obeso (OA), obeso preventivo com Goji berry (OPR) e obeso tratado com Goji berry (OGB) aos 130 dias de idade. Dados apresentados como média  $\pm$  DP; a  $p < 0,05$  vs CA; b  $p < 0,05$  vs OA; one-way ANOVA/Tukey; n=10 por grupo. 197  
198  
199  
200  
201

Os valores das massas de dois depósitos de gordura branca, bem como de um depósito de gordura marrom e de alguns órgãos estão descritos na Tabela 2. A obesidade induzida por DRCS em ratos gerou depósitos de gordura maiores do que no grupo controle. 202  
203  
204

Os animais do grupo OA tiveram depósito de gordura periepídídima 40% maior quando comparados com o grupo CA. O tratamento com GB (grupo OGB) foi eficaz em reduzir significativamente esse depósito de gordura em relação aos animais do grupo OA. Além disso a ausência de diferenças entre o grupo CA e OGB indicaram reversão desse parâmetro. O depósito de gordura inguinal, por sua vez, foi 43% maior nos animais do grupo obeso (OA) quando comparados com o grupo controle. O tratamento e a prevenção com GB (grupos OPR e OGB) também foram eficazes em reduzir esse depósito de gordura. A gordura marrom escapular foi maior em todos os grupos alimentados com DRCS. Nem a prevenção e nem o tratamento com GB apresentaram efeitos sobre esse dado. 205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213



A massa do fígado foi 36% maior nos ratos do grupo OA em relação ao grupo controle. Tanto a prevenção quanto o tratamento com o GB (grupos OPR e OGB) foram eficientes em reduzir esse parâmetro, uma vez que a massa do fígado desses grupos foi menor do que a do grupo OA e semelhantes à do grupo CA. Por outro lado, a massa dos testículos e do coração foi 15% e 14% menor, respectivamente, nos animais do grupo OA. Tanto o tratamento quanto a prevenção com GB foram eficazes em normalizar a massa dos testículos e do coração. A massa dos rins também foi menor no grupo OA em relação ao grupo CA, mas o GB aumentou a massa desse órgão tanto no grupo OPR quanto no grupo OGB em relação ao grupo OA. A massa da próstata foi similar entre os grupos.

**Tabela 2.** Massas relativas de gorduras e órgãos de ratos dos grupos controle (CA), obeso (OA), obeso preventivo com GB (OPR) e obeso tratado com GB (OGB) aos 130 dias de idade.

g/100 g	CA	OA	OPR	OGB
Gordura periepídídima <sup>1</sup>	1,62 ± 0,31	2,28 ± 0,39 <sup>a</sup>	2,10 ± 0,24 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,42 <sup>b</sup>
Gordura inguinal <sup>2</sup>	1,21 ± 0,23	1,74 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,50 ± 0,16 <sup>b</sup>
Gordura marrom escapular <sup>2</sup>	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,009 <sup>a</sup>
Fígado <sup>1</sup>	3,02 ± 0,18	4,12 ± 1,007 <sup>a</sup>	3,29 ± 0,56	3,10 ± 0,33
Testículos <sup>1</sup>	0,70 ± 0,04	0,60 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,03	0,66 ± 0,06
Coração <sup>1</sup>	0,37 ± 0,02	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,01	0,34 ± 0,02
Rins <sup>1</sup>	0,59 ± 0,02	0,51 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,02 <sup>ab</sup>
Próstata <sup>1</sup>	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,02

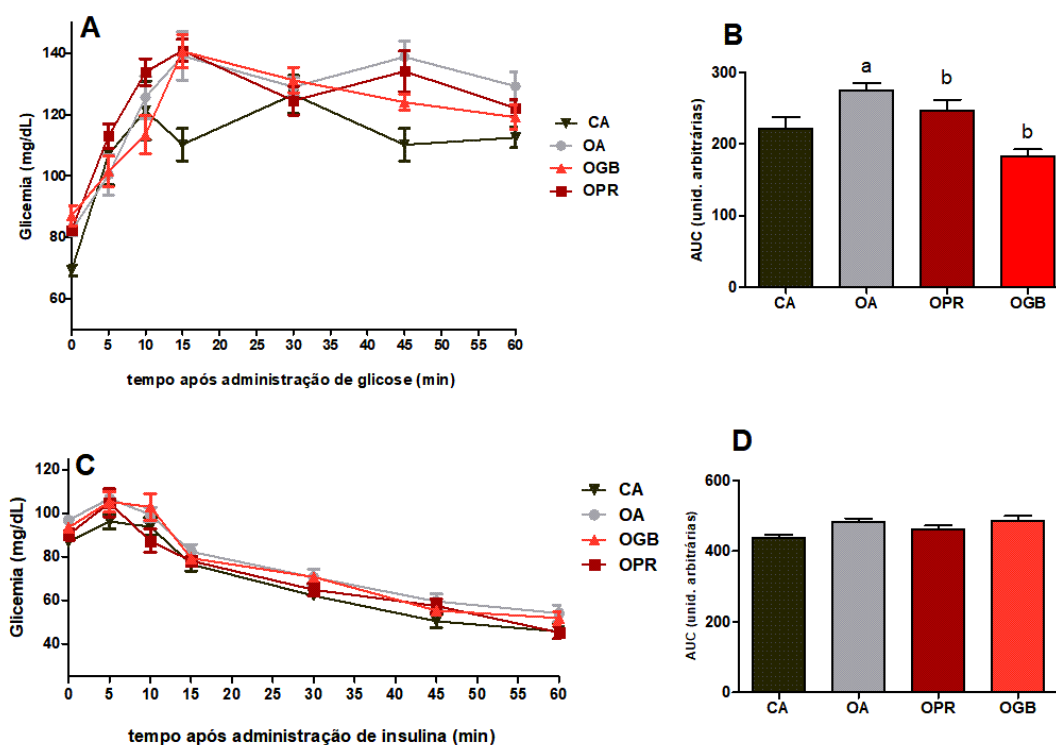
Dados apresentados como média ± DP; <sup>a</sup> p<0,05 vs CA; <sup>b</sup> p<0,05 vs OA; <sup>1</sup> Kruskal-Wallis/Dunn's; <sup>2</sup> one way ANOVA/Tukey; n=10 por grupo.

### 3.2. O GB melhorou a tolerância à glicose

Para avaliar o efeito do GB na tolerância à glicose e à insulina, os testes de GTT e ITT foram realizados. A figura 2A representa a curva glicêmica dos grupos após administração de glicose, enquanto que a 2C mostra a curva glicêmica dos grupos após injeção de insulina. As AUCs de ambas as curvas estão representadas nos quadros B e D da figura 2.

A glicemia em jejum dos grupos CA, OA, OPR e OGB foi, respectivamente: 69,20 ± 5,54, 83,44 ± 5,102, 82,40 ± 3,09 e 82,10 ± 7,27 mg/dL (média ± desvio padrão). A DRCS e/ou a suplementação com GB não afetaram a glicemia de jejum, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos.

Após a administração de glicose, o grupo OA apresentou AUC 10% maior do que o grupo CA. Tanto a prevenção quanto o tratamento com GB impediram esse resultado, dado que a AUC dos grupos OPR e OGB não diferiu do grupo CA. Em relação a tolerância à insulina, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, o que indicou que nem a DRCS nem a suplementação com GB afetaram a resposta à sobrecarga de insulina nos animais.



**Figura 2.** Curvas glicêmicas (A) e área sob a curva dos testes de tolerância à glicose (A,B) e de sensibilidade à insulina (C,D) de ratos dos grupos controle (CA), obeso (OA), obeso preventivo com Goji berry (OPR) e obeso tratado com Goji berry (OGB) aos 130 dias de idade. Dados apresentados como média  $\pm$  DP; a  $p < 0,05$  vs CA; b  $p < 0,05$  vs OA; one-way ANOVA/Tukey; n=8 por grupo.

### 3.3. O GB normalizou parcialmente a área dos hepatócitos

Para verificar se a DRCS alterava a morfometria ou o percentual de glicogênio dos hepatócitos e se o GB produzia algum efeito sobre isso, foi realizada a coloração de HE e a reação histoquímica PAS, respectivamente, com os resultados apresentados na Tabela 3.

A arquitetura tecidual hepática foi mantida independente do grupo experimental e não houve diferença estatística no número médio de hepatócitos entre os grupos. Ao avaliar a área dos hepatócitos, evidenciou-se o efeito da DRCS, uma vez que os animais dos grupos OA, OPR e OGB apresentaram área celular significativamente maior quando comparada com o grupo CA. Tanto o grupo preventivo (OPR) quanto o grupo tratado (OGB) influenciaram esse parâmetro, com menor área dos hepatócitos em relação ao grupo OA. Apesar disso, ela continuou sendo maior do que no grupo CA, sugerindo interferência parcial sobre esse parâmetro.

Não houve diferenças significativas no percentual de glicogênio tecidual entre os grupos, indicando que nem a DRCS nem o GB na dose administrada (250 mg/kg de massa corporal) por 70 ou 109 dias teve efeito sobre os estoques de glicogênio hepático.

**Tabela 3.** Número médio, área celular e percentual de glicogênio de hepatócitos de ratos dos grupos controle (CA), obeso (OA), obeso preventivo com GB (OPR) e obeso tratado com GB (OGB) aos 130 dias de idade.

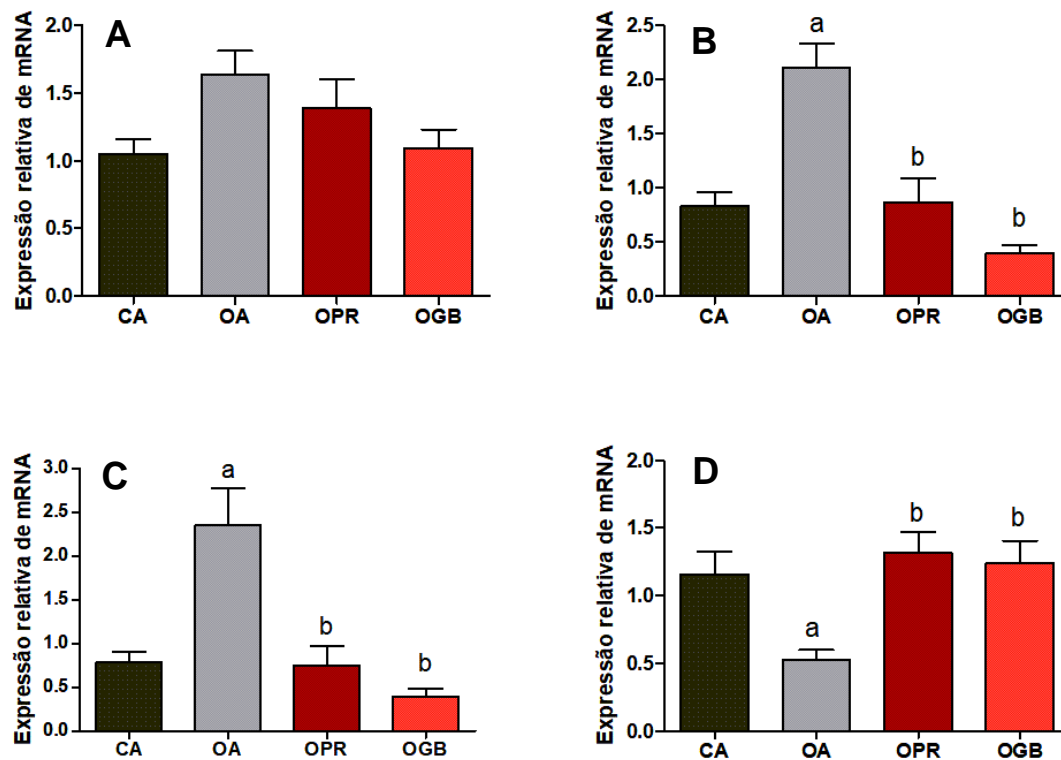
Grupos	Número médio de hepatócitos <sup>1</sup>	Área celular de hepatócitos ( $\mu\text{m}^2$ ) <sup>2</sup>	Percentual de glicogênio tecidual (%) <sup>1</sup>
CA	227,6 $\pm$ 13,93	31,78 $\pm$ 0,97	33,18 $\pm$ 9,08
OA	218,6 $\pm$ 9,81	35,97 $\pm$ 3,01 <sup>a</sup>	36,54 $\pm$ 11,82
OPR	213,3 $\pm$ 16,79	33,07 $\pm$ 0,98 <sup>ab</sup>	37,93 $\pm$ 12,97
OGB	231,7 $\pm$ 6,11	33,77 $\pm$ 1,01 <sup>ab</sup>	33,72 $\pm$ 12,26

Dados apresentados como média  $\pm$  DP; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs CA; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs OA. <sup>1</sup>one way ANOVA/Tukey; <sup>2</sup> Kruskal-Wallis/Dunn's; n=6 por grupo.

### 3.4. O GB reduziu a expressão gênica relativa de citocinas pró-inflamatórias

A expressão relativa de mRNA de citocinas pró (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) em amostras do fígado de ratos dos grupos CA, OA, OPR e OGB está demonstrada na Figura 3. Não foram observados efeitos da dieta e/ou da suplementação com GB sobre a expressão de IL-1  $\beta$  (Figura 3 A). Em relação ao TNF- $\alpha$  (Figura 3 B), uma citocina pró-inflamatória, os animais do grupo OA tiveram maior expressão gênica dessa citocina quando comparados com o grupo CA. Tanto a prevenção quanto o tratamento com GB causaram menor expressão gênica de TNF- $\alpha$  quando comparados com o grupo OA. A expressão gênica relativa de IL-6 seguiu o mesmo padrão: foi maior no grupo OA em relação ao grupo CA e menor nos grupos suplementados com GB.

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, foi significativamente menor no grupo OA em relação ao grupo CA. Nos dois grupos que receberam GB (OPR e OGB), por sua vez, o nível de expressão dessa citocina foi mais 2 vezes maior do que no grupo OA, com valores semelhantes aos do grupo controle.



**Figura 3.** Expressão relativa de mRNA de citocinas IL-1  $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) no fígado de ratos dos grupos controle (CA), obeso (OA), obeso preventivo com Goji berry (OPR) e obeso tratado com Goji berry (OGB) aos 130 dias de idade. Dados apresentados como média  $\pm$  DP; a  $p < 0,05$  vs CA; b  $p < 0,05$  vs OA; one way ANOVA/Tukey; n=8 por grupo.

#### 4. Discussão

Este estudo analisou os efeitos da prevenção e do tratamento com Goji berry (GB) sobre a morfofisiologia e a inflamação do fígado de ratos com obesidade induzida por dieta rica em carboidratos simples (DRCS). Os resultados encontrados foram: (a) A DRCS aumentou a massa corporal final e o IMC, mas a prevenção e tratamento com GB resultaram em valores similares aos controles; (b) a DRCS promoveu ganho de gordura visceral (periepídimal) e subcutânea (inguinal) e o tratamento com GB reduziu a massa de gordura visceral. A prevenção foi eficaz em reduzir os dois depósitos; (c) A DRCS aumentou a massa do fígado e diminuiu a massa dos testículos, coração e rins; a prevenção e tratamento com GB foram eficientes em reverter os parâmetros supracitados; (d) A DRCS reduziu a intolerância à glicose, mas a prevenção e tratamento GB a restauraram; (e) A DRCS causou áreas celulares maiores nos hepatócitos, enquanto a prevenção e tratamento com GB reverteu esse padrão; (f) A DRCS aumentou a expressão relativa de mRNA de citocinas pró-inflamatórias e diminuiu a de anti-inflamatória, enquanto que o GB demonstrou seu poder anti-inflamatório ao reduzir a expressão relativa de mRNA de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a da citocina anti-inflamatória, tanto na forma de prevenção quanto na forma de tratamento.

Os resultados mostram que a massa corporal final dos animais alimentados com DRCS foi maior do que dos animais alimentados com dieta padrão. Já foi relatado que animais alimentados com DRCS desenvolvem algumas desordens metabólicas [26,27], apresentam aumento no ganho de massa corporal, no índice de adiposidade e no acúmulo de gordura no fígado [28].

Tanto os animais que receberam GB por 70 dias (grupo OGB) quanto os que receberam por 109 dias (grupo OPR) apresentaram massa corporal final menor do que aqueles

que não foram suplementados com GB (grupo OA). Além disso, os dados apontam para a eficácia do GB em reduzir o IMC e os depósitos de gordura periepididimal e inguinal.

Os polissacarídeos do GB (PGB), são os responsáveis pela maioria das suas propriedades bioativas, incluindo os efeitos anti-obesogênicos [29,30,31,32]. Dentre esses, está a modulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e na adipogênese. Os PGB são capazes de diminuir a expressão hepática de SRBP-1 via fosforilação do AMPK tanto *in vitro* quanto *in vivo* [33]. Essas moléculas desempenham um papel crucial no controle da síntese de ácidos graxos e armazenamento de lipídios. Além desse efeito molecular, o GB é capaz de promover o aumento do gasto calórico em humanos saudáveis [34], a modulação da microbiota intestinal e a redução da desordem no metabolismo de lipídeos em camundongos com obesidade induzida por dieta rica em gordura [31]. Tanto a redução da expressão de SRBP-1 quanto o aumento do gasto calórico e a modulação da desordem no metabolismo de lipídeos e da microbiota intestinal pelo GB podem ter contribuído para a menor massa corporal final, dos depósitos de gordura e do IMC observados neste estudo.

A massa do fígado aumentou significativamente nos animais alimentados com DRCS, com interferência positiva tanto da prevenção quanto do tratamento com GB sobre esse parâmetro, uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos CA, OPR e OGB. Apesar de não sido avaliada a quantidade de gordura hepática neste estudo, foi observado, em modelo experimental semelhante, que o consumo de GB reduziu a deposição de gordura no fígado, revertendo o padrão de esteatose hepática verificado anteriormente [6]. A partir disso, supõe-se que a massa reduzida do fígado após a prevenção e tratamento com GB pode ser decorrente de menor acúmulo de gordura hepática.

Em relação à menor massa dos testículos, rins e coração, nos animais alimentados com DRCS, pode-se argumentar que, como a DRCS apresenta 14% a menos de proteínas do que a ração padrão para roedores [23], isso pode ter interferido na massa desses órgãos. Isso corrobora com o resultado de Malafaia et al. [35], que observaram redução na massa do baço de camundongos alimentados com dieta aprotéica. O GB foi capaz de aumentar a massa dos testículos, rins e coração, possivelmente porque o GB possui cerca de 5,3 g de proteínas a cada 100 g de frutos [36], o que pode ter suprido, em parte, a carência proteica causada pela DRCS.

Uma das complicações decorrentes da obesidade é a resistência à insulina, que pode levar a um quadro de hiperglicemia e até desenvolver o diabetes tipo 2 [37]. Em muitos casos, o tratamento para o diabetes tipo 2 precisa ser medicamentoso, entretanto, a indústria é encorajada a encontrar compostos alternativos com propriedades hipoglicemiantes [38]. Nesse sentido, existem vários relatos na literatura sobre o poder hipoglicemiante do GB tanto em humanos quanto em roedores [6,7,8,9,39,40].

Para analisar se o GB teria esse mesmo efeito no nosso modelo experimental, animais foram submetidos aos testes de tolerância à glicose e à insulina. Os resultados demonstraram que a variação da glicemia (expressa como AUC) após administração intragástrica de glicose foi reduzida nos animais preventivos ou tratados com GB, indicando a eficiência do GB na melhora da tolerância à glicose, a qual foi menor nos animais obesos sem tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos por Crepaldi et al. [6], tanto na menor tolerância à glicose de ratos alimentados com DRCS quanto nos efeitos benéficos do GB sobre essa variável.

Um dos mecanismos propostos para o efeito hipoglicemiante do GB é a melhora da captação de glicose pelas células. Estudos *in vitro* têm demonstrado que compostos bioativos presentes no GB, como polissacarídeos e polifenóis, podem aumentar a captação de glicose pelas células musculares e adiposas [3]. Um segundo mecanismo é a inibição de  $\alpha$ -amilases e  $\alpha$ -glicosidases, duas enzimas que participam do processo de digestão dos carboidratos. Wojdylo et al. [41] dizem que essa inibição enzimática é uma boa candidata para o tratamento não-insulino-dependente de pacientes hiperglicêmicos. Desse modo, os efeitos hipoglicemiantes do GB podem ser atribuídos a uma combinação de diferentes mecanismos que atuam em conjunto para regular os níveis de glicose no sangue.

Em contraste, a intolerância à glicose registrada no grupo OA não foi acompanhada por resistência à insulina, avaliada pelo ITT. Desse modo, o resultado obtido no GTT não parece ser resultado de uma secreção exacerbada de insulina como forma de compensar uma resposta tecidual deficiente a esse hormônio – um processo que caracteriza os quadros de resistência à insulina, incluindo a obesidade [42]. É possível que, neste modelo experimental, a resistência à insulina se manifeste mais tardiamente e/ou com agravamento da adiposidade excessiva.

Na obesidade, é observado aumento de triglicerídeos hepáticos, que podem causar esteatose hepática e NAFLD. Além disso, foi descrita a presença de fibrose pericelular e portal no fígado de ratos alimentados com dieta rica em gordura [43]. Nesta investigação, não foram observadas alterações macro ou microscópicas que se assemelhassem a um quadro de esteatose ou fibrose. Entretanto, constatou-se maior área dos hepatócitos dos animais obesos, sendo que o GB foi eficaz em reduzir esse parâmetro. Esse efeito pode estar relacionado às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do GB. Estudos anteriores demonstraram que compostos bioativos presentes no GB, como polissacarídeos e polifenóis, possuem a capacidade de modular a inflamação e reduzir o estresse oxidativo [3,4], o que indica uma melhora da saúde hepática, inclusive com redução do acúmulo de gordura no fígado. A redução da área dos hepatócitos pode indicar melhora da saúde hepática sendo possível associar à redução no peso do fígado observado neste estudo.

Em relação ao percentual de glicogênio hepático, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. Isso sugere que nem a dieta rica em carboidratos simples nem o tratamento com GB tiveram impacto direto no armazenamento de glicogênio no fígado dos ratos. Estudos adicionais são necessários para investigar os efeitos da DRCS e do GB no metabolismo de carboidratos e no armazenamento de glicogênio hepático.

A obesidade é considerada um quadro de inflamação crônica de baixo grau [17]. Isso acontece porque o aumento de tecido adiposo pode modular o sistema imunológico, sendo descrito que obesos apresentam maior quantidade de macrófagos M1, células NK defeituosas, células dendríticas, linfócitos B, Th1, Th17 e T CD8+ [45]. A leptina é um hormônio liberado pelo tecido adiposo em proporção à sua quantidade. Esse hormônio liga-se a receptores de leptina nos macrófagos, levando à ativação dessas células e à produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , que são citocinas pró-inflamatórias [46,47].

Independente do grupo experimental, a análise morfológica das amostras de fígado coradas com HE não evidenciou a presença de focos inflamatórios. Entretanto, ao avaliar a expressão gênica relativa de citocinas pró-inflamatórias no fígado, via técnica de RT-PCR, observou-se um aumento significativo de IL-6 e TNF- $\alpha$  no fígado dos ratos obesos, indicando inflamação hepática.

Nossos resultados apontam para a eficiência do GB em reduzir a inflamação hepática em animais obesos alimentados com DRCS, uma vez que houve menor expressão de mRNA relativo de TNF- $\alpha$  e IL-6 tanto no grupo preventivo quanto no grupo tratado e maior expressão da IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Esses resultados são condizentes com o que a literatura recente ressalta, de que o GB tem capacidade de reduzir a produção dessas citocinas pró-inflamatórias [2,3].

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que os polissacarídeos e polifenóis do fruto do GB podem inibir a ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias, como o NF- $\kappa$ B [4]. O NF- $\kappa$ B desempenha um papel central na regulação da resposta inflamatória, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias [48]. Se essa sinalização estiver aumentada, a inflamação pode causar numerosas complicações, sendo um marco para patologias como câncer, doenças neurodegenerativas e autoimunes [38]. Portanto, a inibição do NF- $\kappa$ B pelo GB pode contribuir para a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

O GB também tem sido associado à modulação da resposta imune, o que pode influenciar o estado inflamatório observado na obesidade. O GB pode modular a atividade de células imunes, como macrófagos e linfócitos, regular a produção de citocinas e moléculas de adesão e, também, promover a proliferação de células NK [49,50].

Além desses mecanismos, outros ainda podem estar envolvidos nos efeitos do GB na redução da inflamação. Um deles inclui a modulação da microbiota intestinal, como foi demonstrado por Tian et al. [51], havendo aumento das bifidobactérias e das bactérias produtoras de butirato em camundongos tratados com GB. Essa modulação da microbiota esteve associada à redução da permeabilidade intestinal, havendo aumento da expressão de proteínas das junções de oclusão dos enterócitos, como a ocludina e a claudina nesses animais. Com uma barreira intestinal mais íntegra, a possibilidade é de que houve menor migração de lipopolissacarídeos (metabólitos derivados da microbiota que estão associados ao aumento da inflamação) para a corrente sanguínea e para o fígado, com consequente redução da ativação da via inflamatória mediada por receptores tipo *Toll-like*, que também mediam a inflamação crônica de baixo grau [52].

Em síntese, os resultados deste estudo sugerem que o GB possui propriedades benéficas na redução dos depósitos de gordura e na modulação da inflamação hepática em ratos com obesidade induzida por dieta rica em carboidratos simples. Os possíveis mecanismos envolvidos incluem a regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico e à adipogênese, atividade lipolítica, regulação do metabolismo energético, inibição de vias de sinalização pró-inflamatórias e modulação da resposta imune.

## 5. Conclusão

Os resultados indicam o potencial terapêutico do Goji berry na dose diária de (250 mg/kg) na melhora das complicações decorrentes da obesidade induzida por dieta rica em carboidratos simples, fornecendo uma base sólida para futuras pesquisas e destacando o Goji berry como um candidato promissor para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a obesidade e suas complicações metabólicas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro e ao Professor Dr. Rui Curi e sua equipe pelo fornecimento de espaço e reagentes para o RT-PCR.

## Referências

- Mocan, A.; Schafberg, M.; Crişan, G.; Rohn, S. Determination of lignans and phenolic components of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using HPLC-ESI-ToF-MS and HPLC-online TEAC: Contribution of individual components to overall antioxidant activity and comparison with traditional antioxidant assays. *J. Funct. Foods* **2016**, *24*, 579–594. DOI:10.1016/j.jff.2016.05.007
- Jing, L.; Cui, G.; Feng, Q.; Xiao, Y. Evaluation of hypoglycemic activity of the polysaccharides extracted *Lycium barbarum* Afr J Tradit Complement Altern Med. **2009**, *6*, 376–382. DOI: 10.4314/ajtcam.v6i4.57220
- Mocan, A.; Moldovan, C.; Zengin, G.; Bender, O.; Locatelli, M.; Simirgiotis, M.; Atalay, A.; Vodnar, D. C.; Rohn, S.; Crişan, G. UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory, and real-time cytotoxicological evaluation. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *115*, 414–424. DOI: 10.1016/j.fct.2018.01.054
- Teixeira, F.; Silva, A. M.; Delerue-Matos, C.; Rodrigues, F. *Lycium barbarum* Berries (Solanaceae) as Source of Bioactive Compounds for Healthy Purposes: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*(5), 4777. DOI: 10.3390/ijms24054777
- Fernando, W. M. A. D. B.; Dong, K.; Durham, R.; Stockmann, R.; Jayasena, V. Effect of goji berry on the formation of extracellular senile plaques of Alzheimer's disease. *Nutr. Healthy Aging.* **2021**, *6*, 105–116. DOI: 10.3233/nha-200101
- Crepaldi, L. D.; Mariano, I. R.; Trondoli, A. J. P. C.; Moreno, F. N.; Piovan, S.; Formigoni, M.; Salgueiro-Pagadigorria, C. L.; Godoi, V. A. F.; Brito, M. N.; Garcia, R. F. Goji berry (*Lycium barbarum*) extract improves biometric, plasmatic and hepatic parameters of rats fed a high-carbohydrate diet. *J. Pharm. Pharmacol.* **2018**, *6*, 877–889. DOI: 10.17265/2328-2150/2018.10.001
- Cai, H.; Liu, F.; Zuo, P.; Huang, G.; Song, Z.; Wang, T.; Lu, H.; Guo, F.; Han, C.; Sun, G. Practical application of antidiabetic efficacy of *Lycium barbarum* polysaccharide in patients with type 2 diabetes. *Med. Chem.* **2015**, *11*, 4, 383–390. DOI: 10.12174/1573406410666141110153858
- Jiang, H.; Zhang, W.; Li, X.; Xu, Y.; Cao, J.; Jiang, W. The anti-obesogenic effects of dietary berry fruits: A review. *Food Res. Int.* **2021**, *147*, 110539. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110539
- Jiang, Y.; Fang, Z.; Leonard, W.; Zhang, P. Phenolic compounds in *Lycium* berry: Composition, health benefits and industrial applications. *J. Funct. Foods* **2021**, *7*, 104340. DOI: 10.1016/j.jff.2020.104340
- Bora, K. S.; Sharma, A.; Sharma, A. Phytochemical and pharmacological potential of *Lycium barbarum* L.: A review. *Indian J. Pharm. Sci.* **2019**, *81*, 835–847. DOI: 10.3390/biom9100551

11. Zhang, Q.; Xie, Z.; Li, Y.; Zhu, Q.; Shi, H.; Zhao, R.; Yang, X.; Tian, J.; Ma, L. The potential of *Lycium barbarum* miR166a in kidney cancer treatment. *Exp. Cell. Res.* **2023**, *423*, 113455. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113455 480
12. Organização Mundial da Saúde. Obesidade. 2023. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1) (acesado em 18 Agosto 2023). 481
13. Lobstein, T.; Brinsden, H.; Neveux, M. *World Obesity Atlas 2022*; World Obesity Federation: London, United Kingdom, 2022. 482
14. Pasquali, R.; Gambineri, A. Metabolic effects of obesity on reproduction. *Reprod Biomed Online.* **2006**, *12*, 542–551. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)61179-0. 483
15. Kawai, T.; Autieri, M. V.; Scalia, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2021**, *320*, C375–C391. DOI: 10.1152/ajpcell.00379.2020. 484
16. Tilg, H.; Zmora, N.; Adolph, T. E.; Elinav, E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 40–54. DOI: 10.1038/s41577-019-0198-4 485
17. Wu, H.; Ballantyne, C. M. Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 1549–1564. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315896. 486
18. Paternostro, R.; Trauner, M. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *J Intern Med.* **2022**, *292*, 190–204. DOI: 10.1111/joim.13531. Epub 487
19. Yaghchiyan, M.; Roshangar, L.; Farhangi, M. A.; Mesgari-Abbasi, M.; Rafiei, L.; Shahabi, P. Histologic, Metabolic, and Inflammatory Changes in the Liver of High-fat Diet-induced Obese Rats before and after Vitamin D Administration. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* **2019**, *18*, 402–411. DOI: 10.18502/ijaai.v18i4.1418. 488
20. Basaranoglu, M.; Basaranoglu, G.; Sabuncu, T.; Sentürk, H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* **2013**, *19*, 1166. DOI: 10.3748/wjg.v19.i8.1166. 489
21. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J. E.; Diehl, A. M.; Brunt, E. M.; Cusi, K.; Charlton, M.; Sanyal, A. J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology.* **2012**, *55*, 2005–2023. DOI: 10.1002/hep.25762. 490
22. Willebrords, J.; Pereira, I.; Maes, M.; Yanguas, S.; Colle, I.; Van Den Bossche, B. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog. Lipid Res.* **2015**, *59*, 106–125. DOI: 10.1016/j.plipres.2015.05.002 491
23. Lima, D. C.; Silveira, S. A.; Haibara, A. S.; Coimbra, C. C. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metab. Brain Dis.* **2008**, *23*, 361–373. DOI: 10.1007/s11011-008-9101-x 492
24. Luo, Q.; Cai, Y.; Yan, J.; Sun, M.; Corke, H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sci.* **2004**, *76*, 137–149. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.04.056 493
25. Babata, L. K.; Pedrosa, M.; Garcia, R. F.; Peicher, M. V.; de Godoi, V. A. F. Sustained liver glucose release in response to adrenaline can improve hypoglycaemic episodes in rats under food restriction subjected to acute exercise. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, *969137*. DOI: 10.1155/2014/969137 494
26. Zhao, R.; Qiu, B.; Li, Q.; Zhang, T.; Zhao, H.; Chen, Z.; Cai, Y.; Ruan, H.; Gea, W.; Zheng, X. LBP-4a improves insulin resistance via translocation and activation of GLUT4 in OLETF rats. *Food Funct.* **2014**, *5*, 811–820. DOI: 10.1039/C3FO60602C 495
27. Zhao, R.; Li, Q.; Xiao, B. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on the improvement of insulin resistance in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi* **2005**, *125*(12), 981–988. DOI: 10.1248/yakushi.125.981 496
28. Lima, M. L.; Leite, L. H.; Gioda, C. R.; Leme, F. O.; Couto, C. A.; Coimbra, C. C.; Leite, V. H.; Ferrari, T. C. A novel wistar rat model of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease induced by sucrose-rich diet. *J Diabetes Res.* **2016**, *9127076*. DOI: 10.1155/2016/9127076 497
29. Vidović, B. B.; Milinčić, D. D.; Marčetić, M. D.; Djuriš, J. D.; Ilić, T. D.; Kostić, A. Ž.; Pešić, M. B. Health Benefits and Applications of Goji Berries in Functional Food Products Development: A Review. *Antioxidants.* **2022**, *11*, 248. DOI: 10.3390/antiox11020248 498
30. Kumar K.; Srivastav S.; Sharanagat V. S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *70*, 105325. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2020.105325 499
31. Yang, Y.; Chang, Y.; Wu, Y.; Liu, H.; Liu, Q.; Kang, Z.; Wu, M.; Yin, H.; Duan, J. A homogeneous polysaccharide from *Lycium barbarum*: Structural characterizations, anti-obesity effects and impacts on gut microbiota. *Int J Biol Macromol.* **2021**, *183*, 2074–2087. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.209 500
32. Donno, D.; Beccaro, G. L.; Mellano, M. G.; Cerutti, A. K.; Bounous, G. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *J. Funct. Foods.* **2015**, *18*, 1070–1085. DOI:10.1016/j.jff.2014.05.020 501
33. Li, W.; Li, Y.; Wang, Q.; Yang, Y. Crude extracts from *Lycium barbarum* suppress SREBP-1c expression and prevent diet-induced fatty liver through AMPK activation. *Biomed Res. Int.*, **2014**, 196–198. DOI: 10.1155/2014/196198 502
34. Amagase, H.; Nance, D. M. A. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Clinical Study of the General Effects of a Standardized *Lycium barbarum* (Goji) Juice, GoChi TM. *J Altern Complement Med.* **2008**, *14*, 403–412 503
35. Malafaia, G.; Martins, R. F.; Silva, M. E. Avaliação dos efeitos, em curto prazo, da deficiência proteica nos parâmetros físicos e bioquímicos e camundongos Swiss. *SaBios* **2009**, *4*, 21–33. DOI: 10.1089/acm.2008.0004 504
36. Pires, T. C. S. P.; Dias, M. I.; Barros, L.; Calhelha, R. C.; Alves, M. J.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. Phenolic compounds profile, nutritional compounds and bioactive properties of *Lycium barbarum* L.: A comparative study with stems and fruits. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *122*, 574–581. DOI: /10.1016/j.indcrop.2018.06.046 505
37. Zhang, J.; Wu, H.; Wang, R. Metabolic syndrome and esophageal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr.* **2021**, *13*, 1–9. DOI: 10.1186/s13098-021-00627-6 506



38. Pinto, D.; Cadiz-Gurrea, M. L.; Vallverdu-Queralt, A.; Delerue-Matos, C.; Rodrigues, F. Castanea sativa shells: A review on phytochemical composition, bioactivity and waste management approaches for industrial valorization. *Food Res. Int.* **2021**, *144*, 110364. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110364
39. Zhao, Q.; Li, J.; Yan, J.; Liu, S.; Guo, Y.; Chen, D.; Luo, Q. *Lycium barbarum* polysaccharides ameliorates renal injury and inflammatory reaction in alloxan-induced diabetic nephropathy rabbits. *Life Sci.* **2016**, *157*, 82–90. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.05.045
40. Skenderidis, P.; Kerasioti, E.; Karkanta, E.; Stagos, D.; Kouretas, D.; Petrotos, K.; Hadjichristodoulou, C.; Tsakalof, A. Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation. *Toxicol. Rep.* **2018**, *5*, 251–257. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.02.001
41. Wojdylo, A.; Nowicka, P.; Bąbelewski, P. Phenolic and carotenoid profile of new goji cultivars and their anti-hyperglycemic, anti-aging and antioxidant properties. *J. Funct. Foods.* **2018**, *48*, 632–642. DOI: 10.1016/j.jff.2018.07.061
42. Kuehnbaum, N.; Gillen, J.; Gibala, M.; Britz-Mckibbin, P. Personalized metabolomics for predicting glucose tolerance changes in sedentary women after high-intensity interval training. *Scientific Reports.* **2014**, *4*, 1–12. DOI: 10.1038/srep06166
43. Altunkaynak, Z. Effects of high fat diet induced obesity on female rat livers (a histochemical study). *Eur J Gen Med.* **2005**, *2*(3), 100–109. DOI: 10.29333/ejgm/82319
44. Yang, Y.; Li, W.; Li, Y.; Wang, Q.; Gao, L.; Zhao, J. Dietary *Lycium barbarum* polysaccharide induces Nrf2/ARE pathway and ameliorates insulin resistance induced by high-fat via activation of PI3K/AKT signaling. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, **2014**, 145641. DOI: 10.1155/2014/145641
45. Centa, A.; Marcondes, E. F.; Schuh, K.; Tavares, M. T.; Silva, G. F. da; Locatelli, C.; Pont, G. C. D.; Assolini, J. P. Obesidade e sistema imunológico: Qual a relação? *Seven Editora* **2023**, 557–565. DOI: 10.56238/ciesaudesv1-022
46. Acedo, S. C.; Gambero, S.; Cunha, F. G.; Lorand-Metze, I.; Gambero, A. Participation of leptin in the determination of the macrophage phenotype: an additional role in adipocyte and macrophage crosstalk. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **2013**, *49*, 473–478. DOI: 10.1007/s11626-013-9629-x
47. Zarkesh-Esfahani, H.; Pockley, G.; Metcalfe, R. A.; Bidlingmaier, M.; Wu, Z.; Ajami, A.; Weetman, A. P.; Strasburger, C. J.; Ross, R. J. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol.* **2001**, *167*, 4593–4599. DOI: 10.4049/jimmunol.167.8.4593
48. Rohm, T. V.; Meier, D. T.; Olefsky, J. M.; Donath, M. Y. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity* **2022**, *55*, 31–55. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.12.013
49. Kwasnik, P.; Lemieszek, M. K.; Rzeski, W. Impact of phytochemicals and plant extracts on viability and proliferation of NK cell line NK-92 - a closer look at immunomodulatory properties of goji berries extract in human colon cancer cells. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2021**, *28*, 291–299. DOI: 10.26444/aaem/133801
50. Zhu, P. F.; Zhao, Y. L.; Dai, Z.; Qin, X. J.; Yuan, H. L.; Jin, Q.; Wang, Y. F.; Liu, Y. P.; Luo, X. D. Phenolic amides with immunomodulatory activity from the nonpolysaccharide fraction of *Lycium barbarum* fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 3079–3087. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b07499
51. Tian, B.; Zhao, J.; Zhang, M.; Chen, Z.; Ma, Q.; Liu, H.; Nie, C.; Zhang, Z.; An, W.; Li, J. *Lycium ruthenicum* Anthocyanins attenuate high-fat diet-induced colonic barrier dysfunction and inflammation in mice by modulating the gut microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, 2000745. DOI: 10.1002/mnfr.202000745
52. Bona, M. D.; Torres, C. H. D. M.; Lima, S. C. V. C.; Morais, A. H. D. A.; Lima, A. Â. M.; Maciel, B. L. L. Intestinal barrier permeability in obese individuals with or without metabolic syndrome: a systematic review. *Nutrients* **2022**, *14*, 3649. DOI: 10.3390/nu141736

---