



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PAULA SOUZA FERREIRA

Atividade anti-inflamatória e antioxidante de flavonoides cítricos em
camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório

ARARAQUARA - SP

2014

PAULA SOUZA FERREIRA

Atividade anti-inflamatória e antioxidante de flavonoides cítricos em camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Borges Cesar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Nutricionais.

ARARAQUARA - SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

F387a Ferreira, Paula Souza
Atividade anti-inflamatória e antioxidante de flavonoides cítricos em camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório / Paula Souza Ferreira. – Araraquara, 2014
61 f.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Thais Borges Cesar
1. Flavonoides cítricos. 2. Obesidade. 3. Inflamação. 4. Estresse oxidativo. I. Cesar, Thais Borges, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

COMISSÃO EXAMINADORA

Thaís Borges César

Amanda Martins Baviera

Luís Carlos Spolidorio

Ellen Cristini de Freitas

Caio Tales Álvares da Costa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À Deus

À minha mãe Francisca pelo amor, carinho, dedicação e apoio incondicional.

Ao meu pai Jairo (*in memoriam*) pelo incentivo, apoio e exemplo em buscar sempre o melhor.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof^a Dr^a Thaís Borges César pela competência, paciência e carinho com que sempre me ensinou.

Aos professores integrantes da comissão examinadora pelas valiosas sugestões ao trabalho.

À Danielle Raquel Gonçalves, Jacqueline Queiroz da Silveira, Maísa Ikeda e Nathália Rafaela Meirinho Espina por terem me auxiliado no cuidado com os animais e coleta de dados, e pela amizade dedicada durante o todo o período.

Ao meu irmão Lucas pelo auxílio, apoio e por ser meu exemplo de estudo e dedicação.

À Ana Lúcia Nasser pela atenção, auxílio e carinho dedicados. Aos colegas do programa de Alimentos e Nutrição pelo ajuda e convívio alegre que tivemos.

Ao John Manthey, pesquisador da USDA Fort Pierce, Flórida, USA, pelo isolamento e fornecimento dos compostos que utilizamos, e também pela atenção e auxílio dispensados durante a pesquisa.

Ao professor Dr. Luís Carlos Spolidorio e ao José Antônio Sampaio Zuanon do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP-Araraquara, SP pela confecção das lâminas de tecido hepático, e todo cuidado e atenção nas análises.

Ao Carlos Alberto Arcaro Filho e a Professora Dr^a Amanada Martins Baviera pelo carinho, atenção e por terem concedido seu laboratório para a preparação das amostras de fígado.

Ao Sérgio Valladão do Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, Araraquara-SP, pela ajuda e atenção com as análises bioquímicas.

À Cláudia G. Lima, Sara M. Terrazaz e Grace Kelly Simões pela amizade e carinho durante este período.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição pela amizade e convívio alegre que tivemos.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara pelo apoio e disponibilidade concedidos.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pelo ensino e dedicação.

A Capes pelo suporte financeiro.

“A ambição é o puro senso de dever, pois a si só não se produz frutos realmente importantes para a pessoa humana, pelo contrario os frutos verdadeiros derivam do amor e da dedicação para com as pessoas e as coisas.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Inflamação.....	12
2.2 Obesidade, inflamação e estresse oxidativo.....	14
2.3 Danos causados pela inflamação e estresse oxidativo na obesidade.....	17
2.4 Flavonoides cítricos e proteção anti-inflamatória e antioxidante.....	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Animais e condições experimentais.....	23
4.2 Composição das dietas.....	23
4.3 Suplementos.....	24
4.4 Consumo alimentar e energético.....	25
4.5 Ganho ponderal.....	25
4.6 Coleta e preparo das amostras.....	25
4.7 Massa dos órgãos.....	25
4.8 Histologia hepática.....	25
4.9 Citocinas inflamatórias (ELISA).....	26
4.10 Dosagens bioquímicas sanguíneas.....	26
4.11 Peroxidação lipídica no soro e fígado (TBARS).....	27
4.12 Capacidade antioxidante no soro (ABTS).....	27
4.13 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

O estresse oxidativo e a inflamação na obesidade estão associados ao desenvolvimento de doenças crônicas, tais como o diabetes *mellitus* e as doenças cardiovasculares. A ingestão de dietas com alto teor de gorduras saturadas e açúcar, mas deficientes em compostos antioxidantes, contribui para o acúmulo de tecido adiposo e podem levar ao aumento de marcadores inflamatórios no sangue e tecidos. Os flavonoides cítricos possuem propriedades biológicas capazes de atenuar o estresse oxidativo e a inflamação, protegendo contra as desordens metabólicas decorrentes da obesidade e excesso de tecido adiposo. Neste trabalho foi avaliado o efeito da hesperidina, eriocitrina e eriodictiol sobre a inflamação, o estresse oxidativo e alterações no soro, fígado, coração e baço de camundongos induzidos à obesidade com dieta hiperlipídica, contendo 45% de calorias derivadas de lipídios, por quatro semanas. A hesperidina, eriocitrina e eriodictiol inibiram eficientemente o aumento dos níveis séricos de IL-6, MCP-1, proteína C-reativa, e de TBARS no fígado causado pelo consumo da dieta hiperlipídica e excesso de gordura visceral, impedindo o aumento da massa do baço e aumentando a capacidade antioxidante total no soro. A eriocitrina e eriodictiol reduziram também os níveis de TBARS no soro, enquanto o acúmulo de gordura e danos no fígado foram reduzidos pela hesperidina e eriocitrina, e a massa do coração pela hesperidina e eriodictiol. Esses resultados mostram que a hesperidina, eriocitrina e eriodictiol protegem contra a inflamação e estresse oxidativo causados pelo consumo de dieta hiperlipídica e acúmulo de gordura visceral, como indicado pela diminuição dos marcadores inflamatórios, da peroxidação lipídica, esteatose e danos hepáticos, e da massa do baço e coração, sendo bons candidatos para o tratamento das alterações primárias da obesidade, nas quais eles poderiam ajudar a prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: flavonoides cítricos, obesidade, inflamação, estresse oxidativo

ABSTRACT

Oxidative stress and inflammation in obesity are associated with the development of chronic diseases such as diabetes *mellitus* and cardiovascular diseases. The ingestion of diets rich in saturated fatty acids and sugar, but deficient in antioxidants, contributes to adipose tissue accumulation and may lead to increased inflammatory markers in the blood and tissues. Citrus flavonoids have biological properties capable of attenuating oxidative stress and inflammation, protecting against metabolic disorders resulting from obesity and adipose tissue excess. In the present work we assessed the effect of hesperidin, eriocitrin and eriodictyol over inflammation, oxidative stress and the changes resulting from these process in the blood serum, liver, heart and spleen of mice fed a high-fat diet, which contained 45% of calories from fat, for a period of four weeks. Hesperidin, eriocitrin and eriodictyol supplementation efficiently inhibited the increase of serum IL-6, MCP-1 and C-reactive protein, and also the TBARS levels of the liver, caused by high-fat diet ingestion and excessive visceral fat, thus preventing the increase in spleen weight and increasing serum total antioxidant capacity. Eriocitrin and eriodictyol also reduced TBARS levels in the blood serum, while liver fat accumulation and damage were reduced by hesperidin and eriocitrin, and heart weight by hesperidin and eriodictyol. These results show that hesperidin, eriocitrin and eriodictiol have protective effect against inflammation and oxidative stress caused by high-fat diet feeding and visceral obesity, as indicated by reduced liver damage and fat accumulation, and reduced heart and spleen weight, making them good candidates for use in such conditions, in which they could possibly help to prevent cardiovascular diseases development.

Keywords: Citrus flavonoids, obesity, inflammation, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química das flavanonas hesperidina, eriocitrina e suas respectivas agliconas.....20
- Figura 2.** Peso inicial, peso final e ganho de peso de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....29
- Figura 3.** Massa relativa dos órgãos de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....31
- Figura 4.** Cortes histológicos do tecido hepático. (A) grupo controle, (B) grupo dieta hiperlipídica, (C) grupo ibuprofeno. Fotos à esquerda (aumento de 20x), e à direita (aumento de 40x).....33
- Figura 5.** Cortes histológicos do tecido hepático: (D) grupo hesperidina, (E) grupo eriocitrina, (F) grupo eriodictiol. Fotos à esquerda (aumento de 20x), e à direita (aumento de 40x).....34
- Figura 6.** Níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....37
- Figura 7.** Parâmetros do estresse oxidativo de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas: hiperlipídica, e dieta padrão AIN 93M.....	24
Tabela 2. Consumo alimentar e energético de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....	29
Tabela 3. Perfil bioquímico de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....	36

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o consumo de dietas não saudáveis, ricas em gordura e açúcar, mas deficientes em frutas e vegetais, está entre os quatro maiores fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, contribuindo para o excesso de peso, e efeitos adversos na pressão arterial, glicemia, e lipidemia. Em todo o mundo, pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado de excesso de peso ou obesidade. Os riscos para doença cardíaca coronariana, acidente vascular cerebral isquêmico e diabetes *mellitus* tipo 2 aumentam com o aumento do índice de massa corporal (IMC), que também aumenta o risco de vários tipos de câncer¹.

Tem sido mostrado que o estresse oxidativo medeia o desenvolvimento da síndrome metabólica associada à obesidade através da produção exacerbada de citocinas e, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no tecido adiposo. Em humanos obesos, não diabéticos, a peroxidação lipídica, representada por espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foi positivamente correlacionada com o índice de massa corporal (IMC) e a circunferência da cintura². O acúmulo de gordura em indivíduos obesos em geral aumenta o estresse oxidativo e a inflamação sistêmica devido ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)². Dentre os danos causados pela inflamação e estresse oxidativo na obesidade estão a disfunção cardíaca e a esteatose hepática, devido à elevação de ácidos graxos livres no sangue e acúmulo ectópico de lipídios nos tecidos. A lipotoxicidade provoca alterações funcionais e estruturais nas células, levando a liberação de citocinas e quimiocinas que contribuem para o estado de inflamação sistêmica³.

Em camundongos, o consumo de dieta hiperlipídica aumenta as vias para produção de radicais livres no fígado e no tecido adiposo, sugerindo que o estresse oxidativo seja um dos passos iniciais da desregulação metabólica da obesidade, estimulando a produção de moléculas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa^{4,5}. A ativação da cicloxigenase-2 (COX-2) está criticamente envolvida na expressão de MCP-1, infiltração de macrófagos e inflamação do tecido adiposo subcutâneo e visceral, e sua sinalização é associada ao desenvolvimento da esteatose hepática e resistência à insulina, induzidas pelo alto teor de gordura em roedores obesos⁶.

O papel antioxidante dos flavonoides cítricos se caracteriza por sua ação de sequestrar e neutralizar de radicais livres, contribuindo com as defesas endógenas contra o estresse oxidativo. A hesperidina, eriocitrina e o eriodictiol possuem uma forte capacidade de eliminação de radicais

livres por meio da sua estrutura química, ajudando a manter os níveis de antioxidantes endógenos e inibindo a formação do ânion superóxido e hidroperóxido^{7,8,9,10}. A hesperidina e o eriodictiol possuem potente ação inibidora da inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS)^{11,12}.

Em ratos diabéticos o eriodictiol atenuou o grau de inflamação, diminuiu o óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e a peroxidação lipídica plasmática¹³. A hesperitina bloqueou a ativação do fator nuclear kappa-B (NFκB), induzida pelo TNF-α em adipócitos de camundongos, reduziu o estresse oxidativo e a expressão de COX-2, e a transcrição de IL-6 em ratos com carcinogênese do cólon^{14,15}. Entretanto, ainda não foram relatadas a sua capacidade de proteger contra a inflamação sistêmica relacionada a obesidade e ao consumo crônico de dieta hiperlipídica.

A hesperidina é amplamente distribuída entre as frutas cítricas, enquanto as principais fontes de eriocitrina são limões e limas. Nas frutas e sucos cítricos eles estão presentes na forma glicosilada, hesperitina-7-*O*-rutinosídeo e eriodictiol-7-*O*-rutinosídeo, que após ingestão são deglicosilados por bactérias intestinais dando origem à hesperitina e ao eriodictiol, respectivamente. Nos enterócitos e posteriormente no fígado, eles são conjugados com glicuronídeos e sulfatos, dando origem a metabólitos conjugados de homoeriodictiol e de hesperitina^{16,17}. Tem sido mostrado que o consumo habitual de sucos cítricos melhora o perfil lipídico e reduz os marcadores inflamatórios, os níveis de LDL oxidada e a proteína C-reativa em pacientes com obesidade e síndrome metabólica^{18,19}.

Com base nessas informações, a hipótese deste estudo foi mostrar que a hesperidina, eriocitrina e eriodictiol reduzem marcadores do estresse oxidativo e da inflamação induzidos pela obesidade em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica.

2. REVISÃO

2.1 Inflamação

A inflamação é o processo pelo qual o corpo responde a uma lesão ou infecção e, como tal, constitui um importante mecanismo de defesa inicial do corpo para restaurar a homeostase e a função tecidual. As respostas imunes contra agentes patogênicos são compostas das reações primárias da imunidade inata (imunidade natural), seguidas pelas respostas da imunidade adaptativa (imunidade adquirida). A imunidade inata e a adaptativa funcionam cooperativamente em um sistema de defesa firmemente ligado e integrado. A imunidade inata fornece uma resposta rápida e não específica contra agentes infecciosos, enquanto estimula e controla a especificidade e curso da imunidade adaptativa, aumentando a potência da resposta inata contra o agente agressor²⁰.

Células do sistema imune inato reconhecem e são ativadas por patógenos através de receptores de reconhecimento padrão, incluindo receptores *toll-like* (*TLR*), receptores de domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo (*NOD*)-semelhantes ou *NLRs* (*NOD-like receptors*), receptores do tipo lectina C (*CLR*), e receptores semelhantes ao gene-I induzido por ácido retinóico (*RLR*). Esses receptores reconhecem padrões exógenos moleculares associados a patógenos (*PAMP*), como os lipopolissacarídeos (*LPS*), flagelina, e ácidos nucleicos, e padrões moleculares associados a danos endógenos (*DAMP*) a partir de células mortas e em processo de morte, como o trifosfato de adenosina (*ATP*), ácido úrico, proteínas de choque térmico, ou os próprios ácidos nucleicos, levando à ativação de células do sistema imune inato e, por consequência, de células imunes adaptativas^{20,21}.

As células envolvidas na imunidade inata incluem macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células *natural killers* (*NK*), também conhecidas como neutrófilos ou células polimorfonucleares (*PMN*). A imunidade adaptativa é representada por um conjunto de mecanismos de defesa altamente evoluído e sofisticado mediado por linfócitos B ou T, incluindo diversos subconjuntos de CD4+, CD8+ T, e células NK T. Estas células possuem receptores de células B e T altamente específicos que são gerados por rearranjos gênicos aleatórios. Esse rearranjo gera uma grande variedade de receptores específicos para antígenos estranhos, distribuídos em células T e B através de clonagem (exceto em células NK invariantes). Assim, ao contrário da imunidade inata, a resposta imune adaptativa requer vários dias para a expansão clonal, ativação e diferenciação dos linfócitos efetores. Duas características adicionais da imunidade adaptativa são que ela é perfeitamente específica para antígenos

estranhos, e possui capacidade de memória para um encontro posterior com o mesmo antígeno, provocando resposta mais rápida e mais robusta^{20,22}.

Durante a inflamação, macrófagos são ativados e recrutados para os locais de lesão, produzindo uma grande quantidade de moléculas pró-inflamatórias, incluindo o óxido nítrico, prostaglandinas da série E2 (PGE2), TNF- α e interleucina-1 β (IL- 1 β). O NF κ B é um fator de transcrição que desempenha papel fundamental na inflamação, induzindo a expressão de iNOS e COX-2, que catalisam a produção de óxido nítrico e PGE2. Em condições fisiológicas normais, o NF κ B está localizado no citoplasma e acoplado a sua proteína inibidora, chamada I κ B, que quando ativada por estímulos externos, como o LPS, é fosforilada e degradada levando à liberação do NF κ B, que em seguida é translocado para o núcleo e se liga à sua região promotora (sítio de ligação kB), induzindo a transcrição de genes inflamatórios. As proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK), como a p38, quinase c-Jun N-terminal (JNK) e quinase controlada pela sinalização extracelular (ERK), também fazem parte das vias de transdução de sinais inflamatórios que regulam a expressão da iNOS e COX-2 em macrófagos através da ativação do NF κ B^{23,24}.

O ponto chave na resolução da inflamação é a eliminação dos agentes patogênicos e dos neutrófilos estimulados por meio de apoptose, que é modulada por fatores como o LPS bacteriano ou TNF- α , afetando proteínas envolvidas na execução direta de morte celular seguido da fagocitose por macrófagos. As caspases são responsáveis pela apoptose de fato, através da degradação de proteínas reguladoras e estruturais, essenciais para a sobrevivência das células. A produção de citocinas e liberação de enzimas lisossomais pelas células recrutadas para os locais de lesão também envolve a produção de espécies reativas de oxigênio para execução da apoptose e fagocitose de patógenos, e debris de células mortas nos tecidos inflamados, desencadeando reações metabólicas que começam nos receptores de membrana, seguido por ativação da proteína quinase C e subsequente indução da NADPH-oxidase. Este processo é comumente chamado de "explosão respiratória" e leva à produção de radical superóxido, que é em seguida metabolizado a outras espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso^{25,26,27}.

A inflamação tem sido classificada em dois tipos básicos: a clássica (aguda) que está associada com a dor, e por isso apresenta sintomas; e a inflamação crônica (lenta), que na maioria das vezes é silenciosa e assintomática a nível clínico. Porém, como consequência, essa última não leva à busca de solução, e após longo prazo produz danos permanentes nos tecidos, que levam a alterações fisiológicas e metabólicas importantes suficientes para gerar dor, como acontece na inflamação clássica. Portanto, a inflamação silenciosa é potencialmente patogênica,

e a sua presença indica um aumento do potencial inflamatório a nível celular, tecidual e sistêmico, indicando um estado de doença. Sob condições normais a inflamação leva à cura, no entanto, a perda de controle sobre alguns pontos cruciais pode causar danos crônicos para os tecidos, e a produção contínua dessas moléculas envolve doenças crônicas, tais como artrite reumatóide, aterosclerose, asma, fibrose pulmonar, e câncer^{28,29}.

Compreender os mecanismos e as vias de ativação necessárias para a resolução da inflamação permite analisar e, possivelmente, prevenir processos inflamatórios crônicos, onde o recrutamento exacerbado e ativação de neutrófilos resultam em graves danos aos tecidos.

2.2 Obesidade, inflamação e estresse oxidativo

O tecido adiposo branco, além de servir como local de armazenamento para o excesso de calorias ingeridas da alimentação, é um importante órgão endócrino capaz de produzir e secretar vários hormônios, conhecidos como adipocinas, que ajudam a regular a homeostase metabólica. O reconhecimento desse tecido como órgão endócrino ocorreu com a descoberta da leptina em 1994, e posteriormente de uma variedade de substâncias, como a adiponectina, resistina, proteína amiloide sérica A (SAA), proteína ligadora do retinol-4 (RBP-4), inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), angiotensinogênio, TNF- α , IL-6, interleucina-10 (IL-10) e MCP-1^{30,31,32,33,34}.

Em condições normais o tecido adiposo é um órgão bem vascularizado e innervado, que possui uma matriz de tecido conjuntivo e numerosas células imunes. Sessenta por cento dele é constituído por adipócitos e o restante por pré-adipócitos, macrófagos residentes, fibroblastos, histiócitos (um tipo de monócito tecidual) e células endoteliais. A fração não adipócito é conhecida pela secreção de mediadores inflamatórios, e embora sua distribuição seja conhecida, ainda é difícil avaliar com precisão a contribuição de cada tipo de célula nesse processo^{32,35}. Sugere-se que a leptina e a adiponectina sejam adipocinas primárias, pois parecem ser produzidas principalmente pelos adipócitos. A resistina é produzida em humanos pelas células mononucleares, e em roedores por macrófagos e adipócitos. O TNF- α , IL-6, IL-10, MCP-1 e PAI-1 são secretados por macrófagos ativados e células do sistema imunológico infiltradas no tecido adiposo. Adipócitos, macrófagos e células do estroma vascular produzem IL-6, e estima-se que 30% dos seus níveis circulantes sejam secretados pelo tecido adiposo branco^{35,36}.

A produção exacerbada de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo representa um estado de inflamação comum da obesidade, onde o acúmulo de gordura eleva a expressão e secreção da maioria delas, com exceção da adiponectina que atua na sensibilização da insulina e

tem ação anti-inflamatória. A infiltração de macrófagos derivados da medula óssea age juntamente com os adipócitos e macrófagos residentes no tecido adiposo, produzindo uma vasta gama de mediadores inflamatórios^{5,37,38}. A contribuição do tecido adiposo na inflamação associada à obesidade evidencia seu papel em vários processos fisiológicos, normais e patológicos. Mas ainda não se sabe ao certo a sequência de eventos responsáveis pela iniciação da resposta inflamatória, sendo que vários mecanismos tem sido propostos³⁹.

Uma causa potencial da inflamação no tecido adiposo de obesos é a hipóxia provocada pela hipertrofia dos adipócitos. Genes associados à hipóxia e à angiogênese foram aumentados em camundongos obesos induzidos por dieta, e em células adiposas^{40,41}. Essas observações deram origem à hipótese de que a hipóxia seja o iniciador da desregulação das adipocinas na obesidade, reforçada pela observação de que o fluxo sanguíneo para o tecido adiposo branco é diminuído em indivíduos obesos³⁹. A hipertrofia pode gerar regiões de hipóxia que aumentam a morte dos adipócitos por necrose, e dá início a resposta inflamatória com consequente recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo a fim de sequestrar os detritos de células resultantes. Aproximadamente 90% de todos os macrófagos no tecido adiposo branco estão localizados em locais de necrose^{37,42}. Resumidamente, quimiocinas secretadas localmente, como o MCP-1, atraem macrófagos pró-inflamatórios para o tecido adiposo, onde se agregam em torno de grandes adipócitos necróticos. Em seguida estes macrófagos liberam citocinas (TNF- α , IL-6 e PAI-1) que ativam a resposta pró-inflamatória nos adipócitos e agravam a inflamação, aumentando a liberação de ácidos graxos livres dos adipócitos e gerando um ambiente pró-inflamatório e lipotóxico. Como parte do processo inflamatório crônico pode ocorrer inflamação hepática, na qual a ativação da via inflamatória poderia ser resultado da esteatose e do aumento das respostas ao estresse oxidativo nos hepatócitos, levando a produção de proteínas, como a proteína C-reativa, RBP-4 e SAA^{32,43}.

A ingestão elevada de energia dietética é outro fator importante no desencadeamento do processo inflamatório no tecido adiposo. Foi mostrado que a alta ingestão de glicose e gordura saturada podem induzir inflamação através do aumento do estresse oxidativo e das atividades de fatores de transcrição, como o NF κ B⁴⁴. Uma única infusão intravenosa de triglicerídeos em indivíduos eutróficos aumentou os níveis de ácidos graxos livres no sangue, levando a resposta inflamatória tal como a observada em indivíduos obesos. Os ácidos graxos saturados podem ativar diretamente as respostas pró-inflamatórias em células vasculares endoteliais, adipócitos e células mielóides^{32,45}.

No plasma, a concentração média de ácidos graxos livres no estado pós-absortivo é de 0,7 mM, e esta concentração pode ser muito mais elevada após a ingestão de uma dieta rica em

gorduras, expondo células sanguíneas, como os monócitos, a altas concentrações de ácidos graxos livres. Estudos sugerem que os ácidos graxos saturados ativam o NFkB, a expressão de COX-2 e citocinas pró-inflamatórias, por meio do *toll like receptor 4* (TLR-4). Os ácidos graxos saturados (láurico, mirístico, palmítico) estão presentes na molécula de lipídio A do LPS, onde desempenham um papel importante na ativação do TLR-4. Assim, a expressão celular de COX-2 e de outros marcadores inflamatórios em monócitos e macrófagos pode ser regulada pelo tipo de ácidos graxos circulantes, que podem ser alterados pelo tipo de gordura ingerida, ressaltando o papel das gorduras saturadas no aumento dos riscos de doenças inflamatórias crônicas e agudas⁴⁶. Além disso, dados *in vitro* mostram que o processamento dos ácidos graxos saturados em ceramidas amplifica a resposta imune inata dos macrófagos contra o LPS. Alternativamente, os ácidos graxos podem modular vias inflamatórias através da ligação a receptores acoplados a proteína G, e receptores X do fígado (*LXR*), que são expressos em células do sistema imunológico e de tecidos metabolicamente ativos, afetando a inflamação e o metabolismo da glicose. Outro mecanismo pode envolver o aumento da translocação de LPS do intestino para a circulação, causado pela ingestão de dietas ricas em gordura, que torna a mucosa intestinal mais suscetível a entrada de substâncias tóxicas produzidas por bactérias^{47,48}.

Na obesidade, a sobrecarga de gordura nos tecidos resulta tanto na ativação do estresse oxidativo, quanto das vias inflamatórias. Vários são os fatores que contribuem para o estresse oxidativo na obesidade, como a hiperglicemia, o aumento dos níveis de lipídios nos tecidos, a inflamação crônica, o aumento da formação de radicais livres e a diminuição de defesas antioxidantes, sendo que o estresse oxidativo pode ser o mecanismo subjacente ao desenvolvimento das comorbidades relacionadas à obesidade⁴⁹. O aumento das taxas de oxidação da glicose e de ácidos graxos, devido à hiperglicemia e hiperlipidemia, aumentam a produção de produtos finais da glicosilação avançada (AGE) e de ceramidas e diacilgliceróis, respectivamente, estimulando a atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, com consequente elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)^{2,50}. O acúmulo de macrófagos no tecido adiposo também contribui para o aumento da atividade de NADPH oxidase e formação de ERO, sendo que, tem sido proposto que a obesidade gera um ciclo vicioso, onde ocorre o recrutamento de macrófagos e a produção de citocinas/radicais livres por macrófagos, levando a danos oxidativos nas células⁵¹.

Ainda, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e a diminuição de substâncias antioxidantes foram associados à diminuição da capacidade de diferenciação e proliferação dos adipócitos^{52,53}. A produção de radicais livres é importante para a regulação da transdução de sinal para a diferenciação adipogênica, porém o desequilíbrio no estado redox

pode afetar negativamente o recrutamento e diferenciação de células precursoras, promovendo a expansão não saudável do tecido adiposo^{54,55}. Tal falha no processo adipogênico fundamenta o paradigma de expansão do tecido adiposo, no qual a sua incapacidade para armazenar o excesso de triglicerídeos provoca um ambiente diabetogênico, promovendo o aumento do fluxo e a deposição de ácidos graxos em órgãos dependentes de insulina, levando à secreção de adipocinas que aumentam o estresse oxidativo, a inflamação local e sistêmica, além de promover um ambiente hipóxico⁵⁶.

Níveis elevados de ácidos graxos nos adipócitos podem induzir o aumento da expressão de MCP-1 e de derivados da peroxidação lipídica, que vão agir como potentes agentes quimioatrativos de macrófagos². A peroxidação lipídica refere-se à degradação oxidativa de lipídios, iniciada por espécies reativas de oxigênio. Foi mostrado que as vias para produção de espécies reativas de oxigênio aumentam tanto no fígado, quanto no tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e precede a elevação de marcadores inflamatórios e ácidos graxos livres no sangue e fígado, sugerindo que o estresse oxidativo seja um passo inicial da obesidade⁴. Entre os produtos da peroxidação lipídica, os oxisteróis, o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e o malondialdeído são os mais estudados. Em níveis fisiológicos os subprodutos da peroxidação lipídica podem servir como moléculas de sinalização que regulam várias funções celulares, efeitos que resultam principalmente de sua capacidade de formar adutos com diferentes macromoléculas, tais como fosfolipídios, proteínas e nucleotídeos, os quais podem ter sua atividade biológica perturbada quando há o aumento dos níveis desses subprodutos⁵⁶.

Assim, o acúmulo de tecido adiposo pode provocar o estresse oxidativo e a produção desregulada de citocinas, levando à inflamação sistêmica⁴. Vários são os mecanismos que podem estar envolvidos no efeito da obesidade e consumo de dietas ricas em gorduras, principalmente saturadas, sobre a inflamação e o estresse oxidativo, incluindo a produção de espécies lipídicas tóxicas, remodelação das membranas lipídicas, receptores inatos e nucleares, apoptose e, possivelmente a quimiotaxia da microbiota intestinal^{22,57}.

2.3 Danos causados pela inflamação e estresse oxidativo na obesidade

A elevação de marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo na obesidade provoca uma série de alterações fisiológicas, dentre elas a hiperlipidemia, esteatose hepática, resistência insulínica, diabetes *mellitus* tipo 2, disfunção miocárdica e aterosclerose. O TNF- α , que é uma das citocinas mais comumente elevadas no plasma de obesos, pode inibir a fosforilação do

substrato receptor de insulina-1 (IRS-1) nos músculos e tecido adiposo, diminuindo a transdução do sinal para a translocação de GLUT-4, caracterizando um estado de resistência insulínica. Ele também aumenta a liberação de ácidos graxos livres e a deposição de gordura no fígado, e pode acelerar o processo de aterosclerose através da indução da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e vasculares^{14,32,33}.

A exposição crônica a IL-6 pode estimular a hipertrigliceridemia pelo estímulo a secreção hepática de VLDL, e impedir a ação da insulina pela ativação da tirosina fosfatase ou pela interação com proteínas supressoras da sinalização de citocinas e o receptor de insulina, além de estimular a produção hepática de proteína C-reativa^{33,58,59}. O excesso de IL-6 e o acúmulo de triglicerídeos no fígado estão associados ao aumento do baço em indivíduos com esteatose hepática, e o MCP-1 pode induzir a infiltração e acúmulo de macrófagos ativados no baço, contribuindo para a produção de TNF- α ^{38,60,61,62}.

A lipotoxicidade pode causar lesões teciduais e a apoptose por meio do estresse oxidativo do retículo endoplasmático, onde as células lesadas liberam citocinas ou quimiocinas³. Espécies reativas de oxigênio, como o H₂O₂, são produzidas de forma transiente em resposta à estimulação da insulina, e também atuam como um segundo mensageiro para sua ação nos adipócitos, enquanto que a exposição excessiva reduz a sensibilidade à insulina e prejudica o metabolismo de glicose e lipídios².

Estudos têm mostrado que o consumo de dietas hiperlipídicas pode levar à hipertrofia do coração, e que a obesidade induzida por dieta está associada ao aumento da utilização de ácidos graxos e redução das taxas de utilização de glicose pelo miocárdio, que ocorre pela redução do conteúdo e translocação do GLUT-4. Este processo representa um sério risco cardiovascular, levando a disfunção do miocárdio^{63,64,65}.

Portanto, o papel da obesidade no desencadeamento de doenças crônico-degenerativas está fortemente ligado ao consumo de dietas hipercalóricas, especificamente as dietas com alto teor de gordura saturada, levando os indivíduos a um estado de inflamação crônica e subaguda, acompanhada do acúmulo excessivo de lipídios no tecido adiposo, fígado, coração, artérias e músculos⁶⁶. Este estado representa um padrão alimentar não saudável observado em grande parte da população ocidental, onde a ingestão continuada de dietas hiperlipídicas tem sido preditor de vários distúrbios metabólicos.

2.4 Flavonoides cítricos e proteção anti-inflamatória e antioxidante

Embora ainda não tenha sido estabelecida uma relação direta entre acúmulo de gordura corporal e inflamação, a deposição anormal de lipídios nos tecidos (colesterol, ceramidas, triglicerídeos e ácidos graxos livres) é uma linha característica comum dos distúrbios metabólicos observados em indivíduos obesos. A dislipidemia da síndrome metabólica, caracterizada por uma superprodução hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e baixa produção de lipoproteínas de alta densidade (HDL) contribui para a deposição de lipídios nos tecidos. Essa desregulação do metabolismo lipídico pode contribuir para a patogênese de doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* e inflamação. Por conseguinte, os flavonoides cítricos têm sido descritos por ajudar a regular do metabolismo lipídico, limitando a lipotoxicidade e estimulando a utilização de glicose e ácidos graxos nos tecidos^{67,68}. Existe uma relação inversa entre o consumo de frutas cítricas e fatores de risco para doenças cardiovasculares, incluindo melhora da pressão arterial, do peso corporal, e da dislipidemia⁶⁹.

Os flavonoides cítricos abrangem vários subgrupos, incluindo flavanonas (naringina, hesperidina e eriocitrina), flavonas (diosmina), e polimetoxiflavonas (nobiletina e tangeretina). Eles têm sido reconhecidos como agentes com ação anti-inflamatória e antioxidante na obesidade e síndrome metabólica. A hesperidina e eriocitrina, em particular, apresentam propriedades anti-inflamatórias, anti-hiperglicêmica, hipolipemiante e antioxidantes, que podem contribuir para a redução das alterações metabólicas observadas em indivíduos obesos^{13,70,71,72}. A bioatividade de tais moléculas depende, no entanto, da sua estrutura e subsequente metabolismo, que por sua vez, depende da sua biodisponibilidade⁷⁰.

Quando ingeridas a eriocitrina e a hesperidina são deglicosiladas por ação das bactérias intestinais e convertidas a eriodictiol e hesperitina para posterior absorção. Nos enterócitos elas são conjugadas com glicuronídeos e sulfatos sendo transportadas ao fígado, onde sofrem novas reações de sulfatação, glicuronidação e, metilação, formando uma variedade de metabólitos glicuronídeos e sulfatos conjugados de eriodictiol, homoeriodictiol e hesperitina. Em seguida eles são liberados para a circulação aptos a exercerem sua atividade biológica^{73,74,75,76}.

A ação antioxidante da hesperidina, eriocitrina e eriodictiol se deve a sua capacidade de eliminar cadeias de radicais livres e quelar íons metálicos que catalisam a peroxidação lipídica. A presença de grupos hidroxila, juntamente com os anéis aromáticos, os torna capazes de doar elétrons, proporcionando estabilidade à molécula através da conjugação e ressonância de elétrons com propriedade anti-radical direcionada a íons OH^- e ânion superóxido, importantes na capacidade em quelar íons metálicos ativos e evitar a quebra catalítica de peróxido de hidrogênio

(reação de Fenton). Além disso, flavonoides com mais grupos OH⁻ apresentam maior atividade antioxidante e efeito anti-inflamatório, como é o caso da eriocitrina e eriodictiol em relação à hesperidina^{10,13}. Essas propriedades defendem contra o estresse oxidativo e evitam danos teciduais pela oxidação das membranas celulares. A Figura 1 apresenta um esquema dos flavonoides cítricos acima citados.

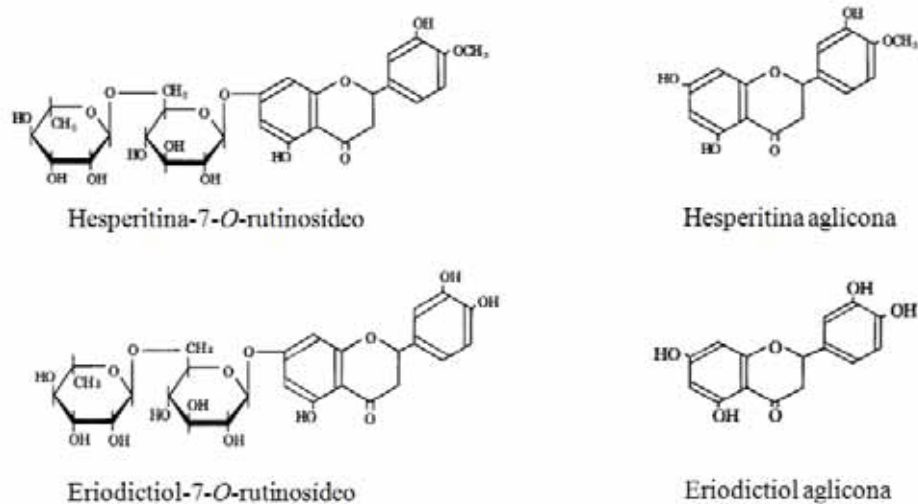


Figura 1. Estrutura química das flavanonas hesperidina, eriocitrina e suas respectivas agliconas.

Estudo recente mostrou que a hesperidina reduziu o estresse oxidativo de forma dose dependente em ratos submetidos ao exercício crônico com sobrecargas crescentes⁷⁷. Foi sugerido que a hesperidina, além de exercer efeito hipolipidêmico em condições hiperlipidêmicas, como acontece na ingestão de dietas hiperlipídicas, tem ação terapêutica como agente anti-inflamatório leve⁷³. Os metabólitos conjugados da hesperitina foram capazes de reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β , inibindo a inflamação em ratos com artrite reumatoide, doença caracterizada por sua pronunciada inflamação⁷⁸. A avaliação de macrófagos de camundongos tratados com hesperidina mostrou atenuação da resposta imune provocada por LPS, com redução dos níveis de óxido nítrico, IL-10, IL-12, e TNF- α ⁷⁹. A hesperitina inibiu a secreção de ácidos graxos livres em adipócitos de camundongos estimulados com TNF- α , bloqueando a ativação do NF κ B e da ERK, suprimindo a transcrição de IL-6¹⁴, ela também mostrou potente inibição da expressão de COX-2 induzida por LPS em macrófagos de camundongos e em ratos com carcinogênese do cólon^{12,15}.

Ao nível clínico foi mostrado que o tratamento com hesperidina reduziu a disfunção endotelial, aumentando a produção de óxido nítrico e suprimindo o TNF- α . Em indivíduos com síndrome metabólica a terapia oral com hesperidina, aumentou a dilatação fluxo-mediada e

reduziu as concentrações circulantes de marcadores pró-inflamatórios (proteína de C-reativa, proteína amiloide sérica A e E-seletina solúvel), conferindo proteção cardiovascular⁸⁰.

A eriocitrina e o eriodictiol apresentaram potente atividade antioxidante “*in vitro*”, e tem sido relatados com atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, sendo capazes de suprimir o estresse oxidativo em ratos infectados com streptozotocina e em ratos submetidos ao exercício agudo^{7,8,81}. A administração oral de eriocitrina em modelo de obesidade induzida reduziu a dislipidemia e a deposição de gordura no fígado. Processo que foi atribuído à ativação da biogênese mitocondrial, aumento do tamanho da mitocôndria e produção de ATP em células HepG2⁸². O efeito anti-inflamatório do eriodictiol foi mostrado na redução dos níveis de óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão em ratos diabéticos¹³. Em células HepG2 o eriodictiol aumentou a captação de glicose e o acúmulo de ácidos graxos em adipócitos 3T3-L1, pela melhora da sinalização da insulina e diminuição da resistência à insulina devido ao aumento da expressão do PPAR γ 2 (expresso no tecido adiposo), e da proteína de ligação de ácidos graxos específica de adipócitos (aP2)⁸. Foi mostrado que eriodictiol regula moléculas de adesão e a migração trans-endotelial de monócitos, que são eventos imunes envolvidos na patogênese de doenças inflamatórias, como a aterosclerose⁸³.

O eriodictiol tem sido também identificado como ativador do fator de transcrição relacionado ao NF-E2 (Nrf2), induzindo enzimas de desintoxicação de fase 2 em queratinócitos, células da retina humana, e em modelo de isquemia cerebral^{8,9,10,84}. O Nrf2 regula a transcrição de enzimas de fase 2 que protegem contra danos causados ao DNA pelo estresse oxidativo e evita a morte celular⁸⁵. Recentemente, foi revelado que a via Nrf2 pode ser ativada de maneira dependente do PPAR, protegendo hepatócitos humanos normais do elevado teor de glicose, sendo este um dos mecanismos de ação do rosiglitazone⁸⁶. Ambas hesperidina e eriocitrina aumentaram a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase e glutathione (GSH) no fígado, e diminuíram o nível de 8-OHdG (indicador de dano oxidativo ao DNA) na urina de ratos diabéticos, suprimindo a peroxidação lipídica no soro, fígado e rins, onde a ação antioxidante da eriocitrina mostrou-se mais potente que da hesperidina⁸¹.

A resolução da inflamação depende da depuração de neutrófilos ativados dos tecidos via apoptose e fagocitose por macrófagos, onde a redução das espécies reativas de oxigênio promove a redução dos danos mediados por proteases. Assim, a hesperidina e a eriocitrina podem ser consideradas como compostos potencialmente ativos para uso em condições em que o estresse oxidativo e inflamação estão envolvidos, pois possuem atividade antioxidante e de supressão da formação de espécies reativas de oxigênio, e podem exercer efeitos benéficos em pacientes que sofrem de doenças inflamatórias²⁷.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória das flavanonas hesperidina, eriocitrina e eriodictiol em camundongos tratados com dieta hiperlipídica.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar:

- a. Consumo alimentar e ganho ponderal
- b. Deposição de gordura visceral e massa do fígado, coração e baço
- c. Concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL-c, LDL-c, e proteína C-reativa
- d. Função, morfologia e deposição de gordura no fígado
- e. Marcadores da inflamação sistêmica no soro
- f. Marcadores do estresse oxidativo no soro e fígado

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados 60 camundongos C57BL/6J machos com 9 semanas de idade procedentes do Biotério Central da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto-SP. Os animais passaram por um período de aclimação de 15 dias, abrigados em sistema isolado, mantido em temperatura ambiente constante de 22-25 °C com ciclos de 12-h claro/escuro, com livre acesso a água e ração. Após este período eles foram divididos em 6 grupos (n=10 cada):

- 1) Controle, tratado com dieta padrão;
- 2) Dieta hiperlipídica, tratado com dieta hiperlipídica;
- 3) Ibuprofeno, tratado com dieta hiperlipídica e ibuprofeno (20 mg/kg de peso corporal);
- 4) Hesperidina, tratado com dieta hiperlipídica e hesperidina (100 mg/kg de peso corporal);
- 5) Eriocitrina, tratado com dieta hiperlipídica e eriocitrina (200 mg/kg de peso corporal);
- 6) Eriodictiol, tratado com dieta hiperlipídica e eriodictiol (200 mg/kg de peso corporal).

O peso corporal foi aferido semanalmente e o consumo alimentar diariamente. Os suplementos foram oferecidos na ração com base no peso corporal. Ao final do estudo os animais foram anestesiados e sacrificados por punção cardíaca para coleta das amostras. O experimento teve duração de 4 semanas. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, Brasil (Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 18/2013).

4.2 Composição das dietas

A dieta hiperlipídica, com alto teor de gordura, é composta por 45% de calorias em gordura, 21% em proteína e 34% em carboidratos, com densidade calórica de 5,35 kcal/g de ração (Rhoster Indústria e Comércio LTDA, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). Em contraste, a dieta padrão contém 9,5 % de calorias em gorduras, 14,7% em proteínas e 75,8% em carboidratos, com 4,22 kcal/g de ração⁸⁷. A composição das dietas está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição das dietas: hiperlipídica e dieta padrão AIN 93M

Composição	g/100g	
	Hiperlipídica	Padrão
Dieta		
Proteínas (%kcal)	21	14,7
Carboidratos (%kcal)	34	75,8
Gorduras (% kcal)	45	9,5
Energia (kcal/g)	5,35	4,22
Amido de milho	7,79	46,57
Caseína	24,00	14,00
L-Cisteína	0,35	0,18
Amido Dextrinizado	11,65	15,50
Sacarose	20,14	10,00
Fibra	5,83	4,00
Óleo de Soja	2,91	5,00
Banha de Porco	20,68	-
Mix Mineral	5,24	3,50
Mix Vitamínico	1,17	1,00
Bitartarato de Colina	0,23	0,25
Tert-Butilhidroquinona (TBHQ)	0,01	0,80
Total	100,00	100,00

4.3 Suplementos

Os suplemento de hesperidina foi oferecido na dose diária de 100 mg/kg de peso corporal, de eriocitrina e eriodictiol na dose de 200 mg/kg de peso corporal por dia, e o ibuprofeno, incluído como controle positivo para atividade anti-inflamatória, foi oferecido na dose de 20 mg/kg de peso corporal por dia, com base na recomendação farmacológica. Este fármaco possui ação anti-inflamatória, inibindo a enzima COX, de forma sistêmica, e tem sido utilizado cronicamente por apresentar menos efeitos secundários que os corticosteroides e inibidores específicos. A enzima COX-2 está implicada no processo de propagação da inflamação com conseqüente formação de mediadores pró-inflamatórios pela cascata do ácido araquidônico⁸⁸.

Durante o período de adaptação e durante o experimento o consumo alimentar dos animais foi medido diariamente, para se conhecer a quantidade média de ração consumida. Baseado nesta quantidade foi oferecida, para cada animal, a ração suplementada com o composto específico do grupo (hesperidina, eriocitrina, eriodictiol ou ibuprofeno) mais 10% para garantia da dose diária recomendada do suplemento, por um período de quatro semanas.

4.4 Consumo alimentar e energético

O consumo de dieta foi mensurado diariamente pelo método do resto-ingesta, onde pesa-se a quantidade oferecida e o restante, sabendo-se assim a quantidade consumida. Toda a ração restante do dia anterior era descartada, e nova ração era colocada. A partir da quantidade de ração consumida foi calculada a ingestão energética, baseada na composição das dietas, e a porcentagem de suplemento ingerida, no caso das dietas suplementadas.

4.5 Ganho ponderal

O peso corporal dos animais foi determinado uma vez por semana para determinar o ganho de massa corporal, calculado pela diferença entre o peso final e o peso inicial.

4.6 Coleta e preparo das amostras

No último dia do experimento (30º dia) os animais foram submetidos a jejum de 12 horas, e anestesiados com xilazina (16 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) *via* intraperitoneal (*i.p.*) antes do procedimento de coleta de sangue por punção cardíaca, que é um procedimento final de eutanásia. O sangue coletado foi centrifugado a 2800xg por 15 minutos em temperatura ambiente para obtenção do soro sanguíneo. Foram coletadas amostras do tecido adiposo visceral (epididimal, retro peritoneal, e peri-renal), fígado, coração e baço. Após remoção todas as amostras de soro e tecidos foram devidamente identificadas e armazenadas a -80°C.

4.7 Massa dos órgãos

Para avaliação da massa do tecido adiposo visceral, fígado, coração e baço, os órgãos foram lavados em solução salina (0,9%), colocados sobre filtro para eliminar o excesso de líquido e pesados em balança semi-analítica. A massa obtida de cada órgão foi dividida pela massa corporal do respectivo animal (massa do órgão/massa corporal do animal).

4.8 Histologia hepática

Um lobo do fígado (esquerdo) de cada animal foi retirado para análise histológica. Eles foram acomodados em cassetes histológicos, e colocados em formol a 10% por 48 horas, após esse período eles foram lavados com água deionizada e mantidos em álcool 70%. Amostras de tecido hepático preservadas em álcool 70% foram incluídas em parafina, seccionadas a 4-6 µM

de espessura, e depois desparafinizadas. Os cortes desparafinizados foram corados com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson usando protocolos padronizados do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, SP, Brasil. As lâminas de tecido hepático coradas com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson foram analisadas para verificação da morfologia e estrutura hepática, e sintomas de esteatose hepática por patologista cego ao estudo. A avaliação foi feita tendo como base de normalidade os cortes do grupo controle.

4.9 Citocinas inflamatórias (ELISA)

Os níveis de citocinas inflamatórias no plasma dos camundongos foram realizados por ensaios de ELISA Multiplex através do método de detecção Luminex xMAP (Genese Produtos Diagnósticos Ltda, Cambuci, SP, Brasil). A detecção Luminex utiliza microesferas de cor codificadas internamente com dois corantes, a partir dos quais é possível criar até 100 conjuntos de esferas de cores diferentes, cada uma revestida com um anticorpo específico. O analito é capturado pelo grânulo e é introduzido um anticorpo biotilado, que é depois incubado com conjugado de Estreptavidina-PE (corante fluorescente) gerando cor na superfície de cada microesfera para completar a reação. As microesferas são autorizadas a passar rapidamente através de um laser que excita o corante de marcação interna do conjunto de microsferas e, um segundo laser excita o corante fluorescente na molécula reporter (PE). Finalmente, os processadores de sinais digitais de alta velocidade identificam cada microesfera individual e quantificam o resultado do bio-ensaio com base nos sinais fluorescentes.

4.10 Dosagens bioquímicas sanguíneas

As dosagens de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, e triglicerídeos, da proteína C-reativa ultrasensível e, das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase foram analisados por utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) em equipamento automatizado (Labmax 240, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O valor de LDL-colesterol foi obtido a partir dos resultados das dosagens de colesterol total (CT), Triglicérides (TG) e HDL-C, pela fórmula de Friedewald⁸⁹: $LDL = (CT - HDL) - (TG/5)$.

4.11 Concentração de TBARS no soro e fígado

Para avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) o fígado foi homogeneizado em KCl 1,15%, e centrifugado 10.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C para retirada do sobrenadante. Uma alíquota de 200 µL de cada amostra de soro, e do sobrenadante dos homogenatos do fígado foram homogeneizadas com 400 µL de NaOH (1,5 M), incubadas por 30 minutos a 60° C, e colocadas em gelo por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 400 µL de ácido perclórico (10%) as amostras, e centrifugadas por mais 10.000 rpm por 20 minutos a 4° C. O sobrenadante foi utilizado para avaliação da presença de substâncias no plasma que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o MDA que produz uma base de *Shiff* de coloração rosácea, lida no espectrofotômetro a 535nm⁹⁰. A peroxidação lipídica hepática foi dada em µM de MDA/ mg de proteína, que foi quantificada pelo método de Lowry⁹¹, e a do soro em µM de MDA. Todas as análises foram realizadas em triplicata utilizando-se a média como o resultado final.

4.12 Capacidade antioxidante no soro

O método ABTS⁹² foi utilizado para quantificar a presença de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos capazes de eliminar o ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico, radical ABTS* (ABTS*+, Sigma), convertendo-o em um produto incolor. A solução para formação do radical foi preparada utilizando 7mM de ABTS*+ e 140mM de persulfato de potássio e foi incubada durante 16 horas ao abrigo da luz. A absorbância foi medida a 734 nm para verificar a formação de ABTS *+. Com o radical formado, a reação foi iniciada pela adição de 5 µl de plasma a 300 µL de solução de radical. A absorbância foi medida a 734 nm após 6 minutos, e a diminuição da absorção foi utilizada para calcular a atividade antioxidante total. A curva de calibração foi preparada com diferentes concentrações de Trolox (Sigma), que variam de 0 a 2 mM. A capacidade antioxidante foi determinada a partir desta curva padrão, e expressa como Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox (CAET).

4.13 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão das médias. As estatísticas realizadas por análise de variância (ANOVA) seguido de análise post-hoc (teste de Student Newman Keuls) para avaliação dos efeitos dos diferentes suplementos e dietas entre os grupos, com nível de significância em $p < 0,05$ (Sigma Stat Software, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Peso corporal, consumo alimentar e energético

As médias do consumo alimentar, consumo energético e de suplementos durante o experimento são mostradas na Tabela 2. Os resultados do peso corporal inicial, peso corporal final e ganho de peso são mostrados na Figura 2.

Ao final do experimento, os animais que consumiram dieta hiperlipídica apresentaram maiores peso corporal e ganho de peso em relação aos que consumiram dieta padrão. Somente o grupo que recebeu dieta hiperlipídica suplementada com hesperidina não alterou o ganho de peso, tendo valores semelhantes ao grupo controle. Esses resultados são consistentes com outros estudos, e mostram o potencial obesogênico da dieta hiperlipídica.

O grupo alimentado com dieta padrão consumiu 29% mais dieta e 9,5% mais energia do que os grupos alimentados com dieta hiperlipídica. E entre os grupos com dieta hiperlipídica o menor consumo alimentar e energético foi do grupo suplementado com eriocitrina, enquanto que os grupos hesperidina e eriodictiol consumiram quantidades intermediárias.

A ingestão dos suplementos ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e, eriodictiol foi monitorada ao longo do experimento garantindo o consumo da dose recomendada. Pela avaliação do consumo alimentar total, observamos que a ingestão dos suplementos alcançou em média 97% do esperado (Tabela 2, ingestão de suplementos).

Tabela 2: Consumo alimentar e energético de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.

Suplemento	Padrão		Hiperlipídica				
	Sem	Sem	Sem	Ibuprofeno	Hesperidina	Eriocitrina	Eriodictiol
Consumo alimentar (g/d)	4,6 ± 0,7 ^c	3,4 ± 0,5 ^b	3,4 ± 0,5 ^b	3,4 ± 0,5 ^b	3,2 ± 0,5 ^{ab}	3,1 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,4 ^{ab}
Consumo energético (kcal/d)	19,3 ± 3,0 ^d	18,4 ± 2,5 ^c	18,4 ± 2,5 ^c	18,2 ± 2,9 ^{bc}	17,4 ± 2,9 ^{abc}	16,4 ± 1,7 ^a	17,0 ± 2,1 ^{ab}
Suplementos (%)	0	0	0	97 ± 13	94 ± 10	97 ± 12	99 ± 11

Resultados em média ± desvio padrão, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si (p<0,05).

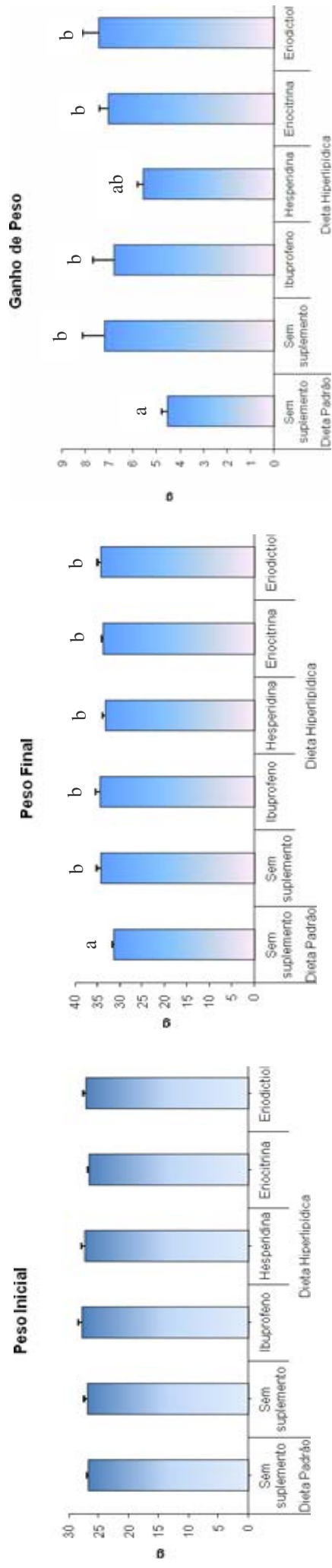


Figura 2. Peso inicial, peso final e ganho de peso de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol. Dados expressos como média ± erro padrão, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si (p<0,05).

5.2 Massa relativa dos órgãos

O peso dos órgãos foi avaliado em relação à massa corporal, obtendo-se assim uma medida relativa do órgão em relação ao tamanho de cada animal (Figura 3). Todos os animais que consumiram dieta hiperlipídica, com e sem suplemento, apresentaram aumento da gordura visceral. Por sua vez, o peso do fígado foi menor nos animais alimentados com dieta hiperlipídica independente do suplemento.

O peso do baço foi menor nos grupos tratados com dieta hiperlipídica e flavanonas cítricas e, aqueles que receberam ibuprofeno e os alimentados com dieta padrão tiveram valores intermediários, enquanto que os animais alimentados com dieta hiperlipídica sem suplemento apresentaram o maior peso do baço. Situação similar foi encontrada para o peso do coração, exceto que aqueles tratados com eriocitrina apresentaram peso intermediário, enquanto o ibuprofeno reduziu o peso do coração.

Observados em conjunto, os grupos tratados com dieta hiperlipídica sem suplemento e com ibuprofeno ou eriodictiol apresentaram o maior aumento dos órgãos (Σ gordura visceral, fígado, baço, coração), enquanto os animais tratados com dieta hiperlipídica e hesperidina ou eriocitrina apresentaram aumento intermediário. O grupo de animais tratados apenas com dieta padrão foi o que mostrou menor massa dos órgãos analisados.

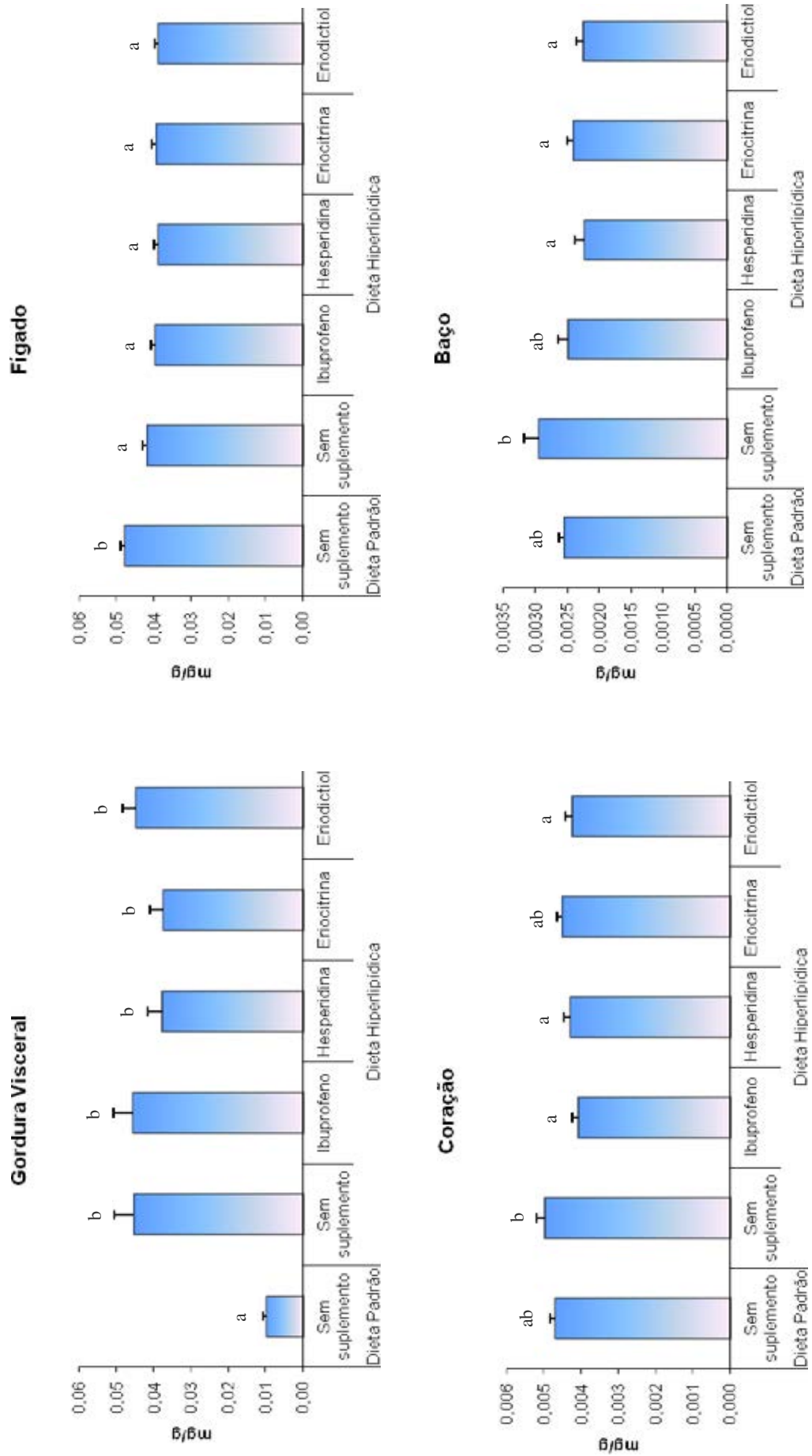


Figura 3. Massa relativa dos órgãos de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol. Dados expressos como média ± erro padrão, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

5.3 Histologia hepática

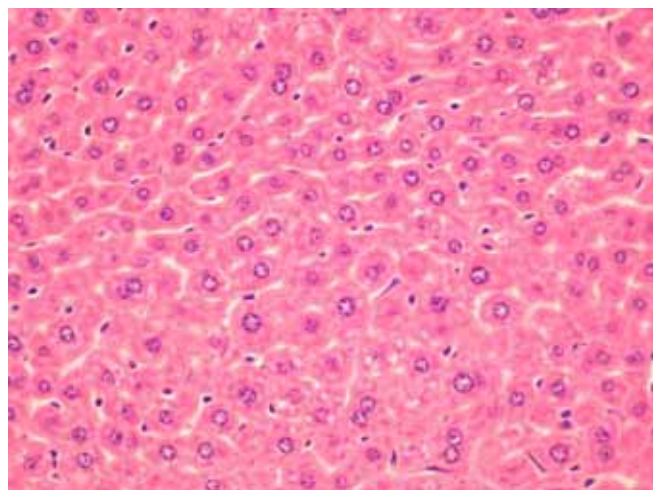
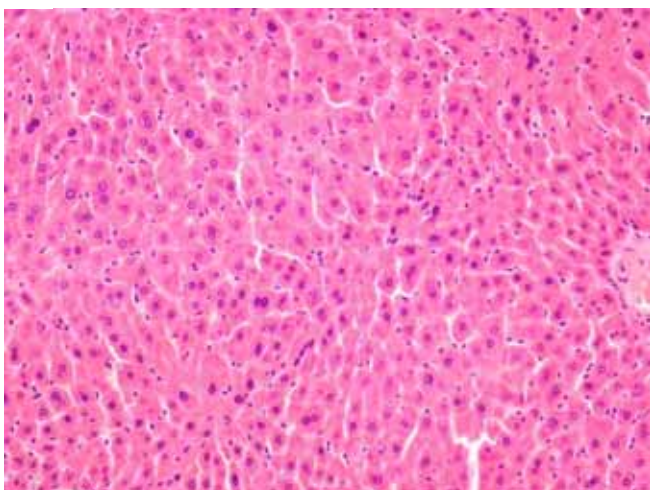
A análise histológica do fígado foi feita com base na comparação entre os grupos, onde o grupo controle foi considerado como base de normalidade, e ausência de esteatose. Os cortes do fígado dos camundongos do grupo alimentado com dieta padrão apresentaram-se compostos de placas de hepatócitos entremeados por sinusóides. Os hepatócitos e os sinusóides estavam organizados radialmente ao redor dos espaços porta, representados pela artéria, veia porta e ducto biliar. As veias e as artérias apresentaram-se com características próprias: a veia mais calibrosa e com a parede mais delgada em relação ao tamanho de sua luz que a artéria. Os hepatócitos apresentaram-se com aspectos de normalidade na maioria das regiões: globosos, com núcleo centralizado, basofílico e nucléolos aparentes, o citoplasma eosinofílico, e muitos com gotículas micro vesiculares de gordura. Os espaços centro lobulares estavam com aspecto de normalidade e os ductos biliares com epitélio que variava de cúbico a cilíndrico (Figura 4 A).

Por outro lado, os cortes dos fígados dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, apresentaram-se com todas as regiões alteradas e foram diagnosticados com esteatose hepática. Nesses casos, as células eram maiores quando comparadas as do grupo alimentado com dieta padrão, muitas vezes sem contornos definidos, ou mesmo fragmentadas, denotando necrose celular e conseqüentemente tecidual. O citoplasma apresentou acúmulo de lipídios, em micro e macro vesículas de limites nítidos e tamanhos variados, com os núcleos rechaçados para periferia da célula, em muitos casos foi possível observar picnose, cariólise ou mesmo ausência nuclear. Foi possível observar também a presença de hepatócitos balonizados, porém sem focos de inflamação no parênquima hepático (Figura 4 B).

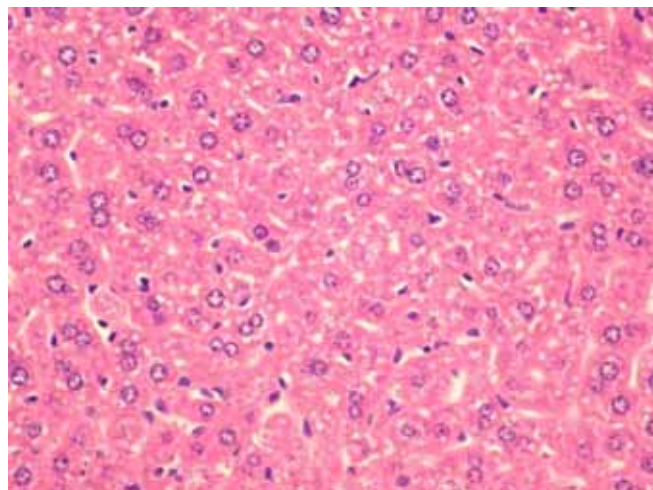
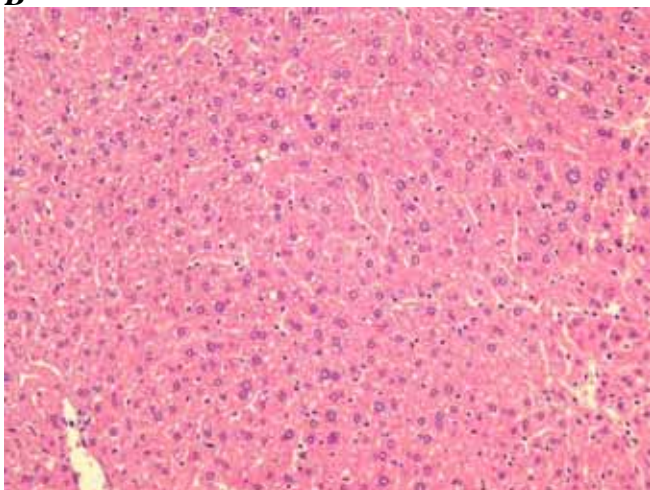
A morfologia hepática dos grupos suplementados com ibuprofeno, hesperidina ou eriodictiol, mostrou-se com conservação da arquitetura hepática, com características morfológicas dentro da normalidade (Figura 4 C, e Figura 5 D e F, respectivamente). Entretanto foi possível observar hepatócitos com microvesículas lipídicas, mas raramente macro vesículas. Os contornos celulares estavam bem definidos, e a maioria dos núcleos centralizados, com raros casos de picnose, cariólise ou ausência nuclear. Não houve presença de hepatócitos balonizados ou focos de inflamação no parênquima hepático.

Os cortes do fígado dos animais suplementados com eriocitrina apresentaram padrões histológicos semelhantes ao grupo alimentado com dieta hiperlipídica, mostrando que a eriocitrina não evitou o acúmulo de gordura causado pelo consumo da dieta hiperlipídica.

A



B



C

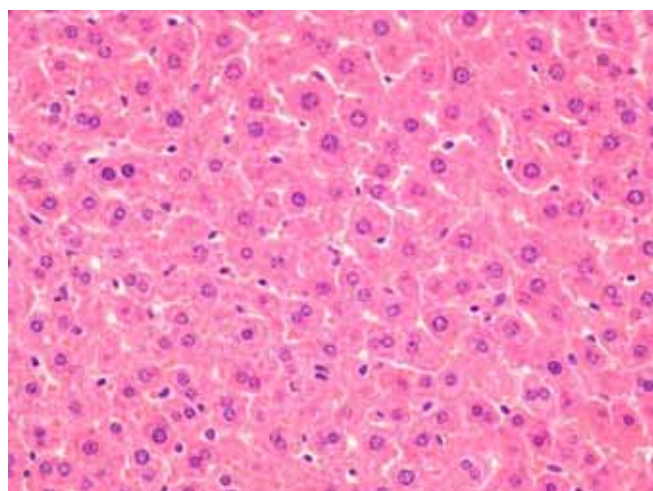
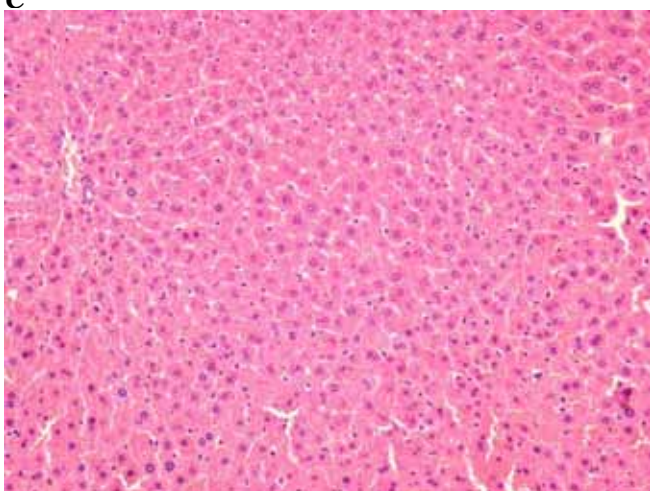
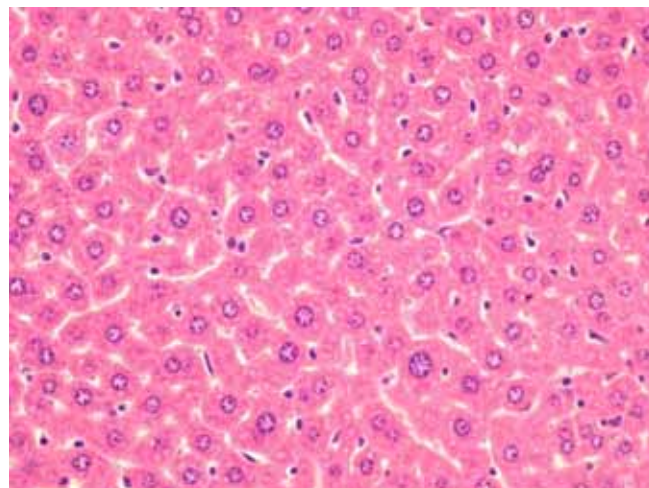
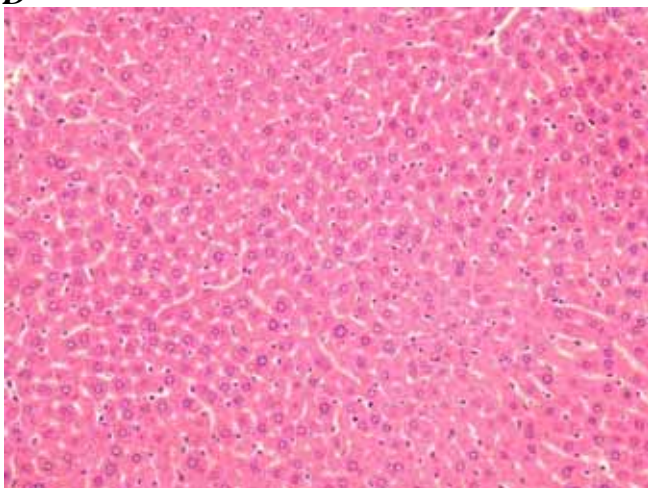
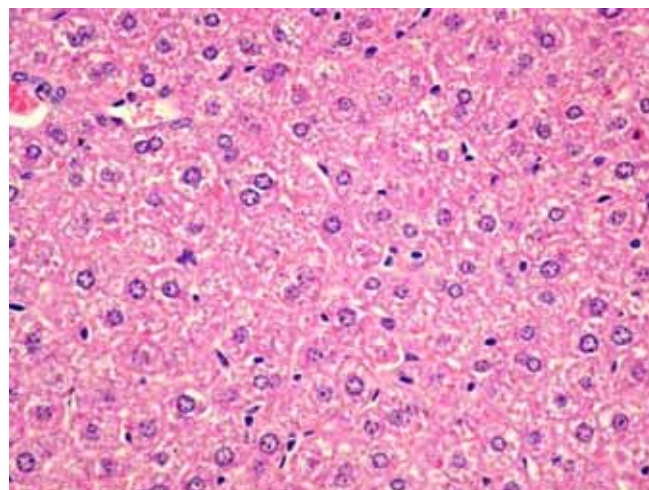
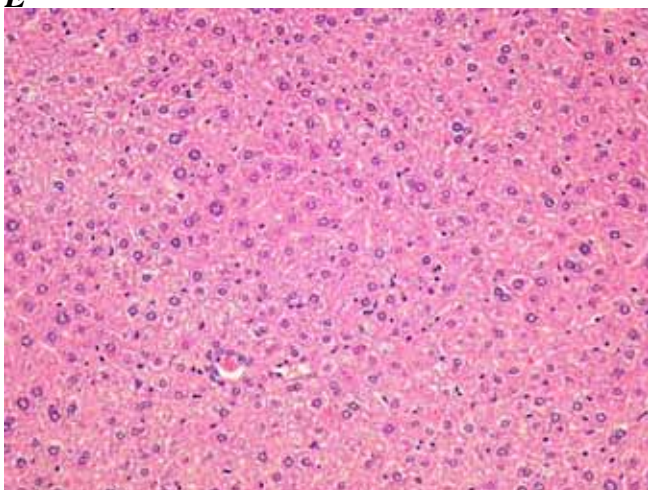


Figura 4. Cortes histológicos do tecido hepático. (A) grupo controle, (B) grupo dieta hiperlipídica, (C) grupo ibuprofeno. Fotos à esquerda (aumento de 20x), e à direita (aumento de 40x).

D



E



F

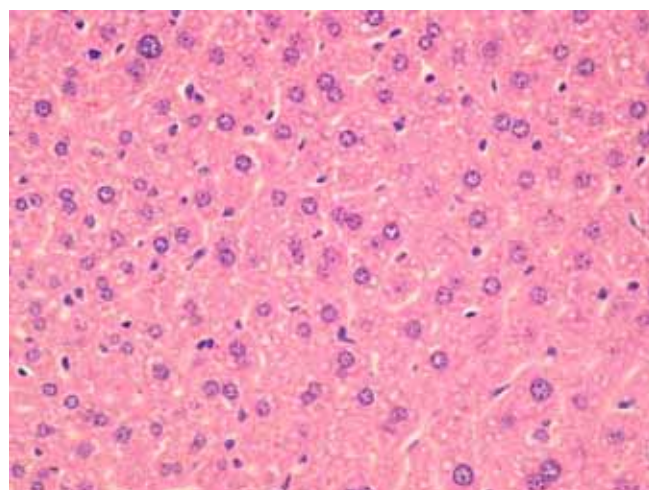
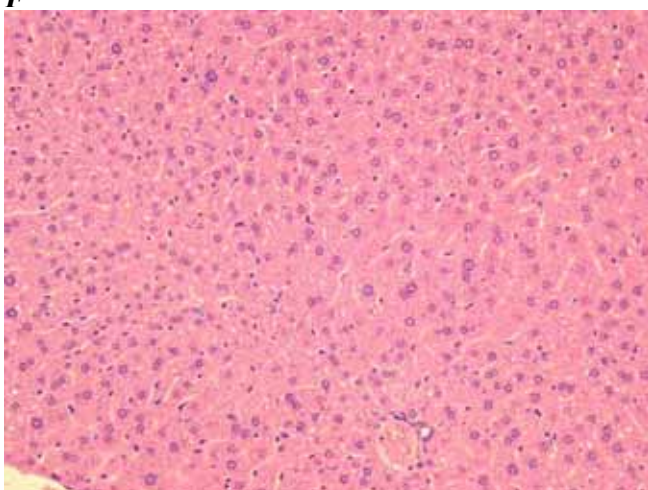


Figura 5. Cortes histológicos do tecido hepático: (D) grupo hesperidina, (E) grupo eriocitrina, (F) grupo eriodictiol. Fotos à esquerda (aumento de 20x), e à direita (aumento de 40x).

5.4 Perfil bioquímico

Nesta etapa do estudo foram avaliadas as seguintes variáveis bioquímicas no soro dos camundongos: glicose, TG, colesterol total, HDL-c, LDL-c, enzimas hepáticas e proteína C-reativa ultra-sensível (Tabela 4). No grupo alimentado com dieta hiperlipídica foi detectado aumento dos níveis de glicose, colesterol total, HDL-c e LDL-c (19,5; 35,5; 33,7 e 55,0%, respectivamente) em relação ao grupo controle. Já, os grupos suplementados com hesperidina, eriocitrina, eriodictiol ou ibuprofeno apresentaram concentrações intermediárias de glicose. Aqueles suplementados com hesperidina apresentaram uma redução de 27,5% de LDL-c em relação ao grupo dieta hiperlipídica e, o grupo suplementado com eriocitrina mostrou concentração de LDL-c intermediária. O aumento dos níveis de colesterol dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica é explicado pelo seu alto conteúdo de lipídeos em relação à dieta padrão (4,7 vezes maior em kcal/g), composto principalmente por gordura saturada.

As enzimas hepáticas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase se mantiveram inalteradas com o consumo da dieta hiperlipídica e dos suplementos em todos grupos, sugerindo ausência de efeito hepatotóxico para as doses administradas. Finalmente, os valores da proteína C-reativa ultrasensível foram 11,0% menores nos animais tratados com ibuprofeno, 33,3% nos tratados com hesperidina e eriocitrina e 22,2% nos tratados com eriodictiol, em relação ao grupo dieta hiperlipídica. Os animais do grupo controle apresentaram valores de proteína C-reativa ultrasensível intermediários entre o grupo ibuprofeno e o grupo dieta hiperlipídica.

Tabela 3: Perfil bioquímico de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.

Suplemento	Dieta		Hiperlipídica				
	Padrão	Sem	Sem	Ibuprofeno	Hesperidina	Eriocitrina	Eriodictiol
Glicose (mg/dL)	302 ± 4 ^a	375 ± 59 ^b	321 ± 47 ^{ab}	337 ± 85 ^{ab}	332 ± 44 ^{ab}	316 ± 50 ^{ab}	
Triglicérides (mg/dL)	81 ± 8	71 ± 14	88 ± 17	84 ± 20	90 ± 18	88 ± 20	
Colesterol total (mg/dL)	89 ± 14 ^a	138 ± 2 ^{bc}	150 ± 27 ^c	122 ± 20 ^b	147 ± 34 ^c	157 ± 22 ^c	
HDL-C (mg/dL)	55 ± 9 ^a	83 ± 1 ^{bc}	88 ± 13 ^c	77 ± 15 ^b	94 ± 22 ^c	99 ± 14 ^c	
LDL-C (mg/dL)	18 ± 9 ^a	40 ± 12 ^c	44 ± 13 ^c	29 ± 9 ^b	36 ± 12 ^{bc}	40 ± 8 ^c	
ALT* (U/L)	52 ± 13	44 ± 23	55 ± 9	41 ± 16	39 ± 14	41 ± 11	
AST* (U/L)	152 ± 36	153 ± 52	161 ± 36	146 ± 45	166 ± 55	133 ± 50	
Proteína C-reativa (mg/L)	0,08 ± 0,0 ^{bc}	0,09 ± 0,0 ^c	0,08 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,02 ^a	0,06 ± 0,02 ^a	0,07 ± 0,02 ^{ab}	

Resultados em média ± desvio padrão, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si (p<0,05).

* ALT: Alanina aminotransferase. *AST: Aspartato aminotransferase.

5.5 Citocinas inflamatórias

A avaliação dos parâmetros imunológicos mostrou que a suplementação com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol reduziu os níveis séricos da IL-6 em 66%, 91%, 95% e 91% e do MCP-1 em 69%, 62%, 74% e 81%, respectivamente, em comparação com o grupo dieta hiperlipídica. Em média, os níveis de IL-6 aumentaram 87% na dieta hiperlipídica e o MCP-1 aumentou 67% comparação ao grupo controle. Não foram observadas alterações nos níveis séricos de TNF- α e IL-10 para nenhum dos grupos estudados (Figura 6).

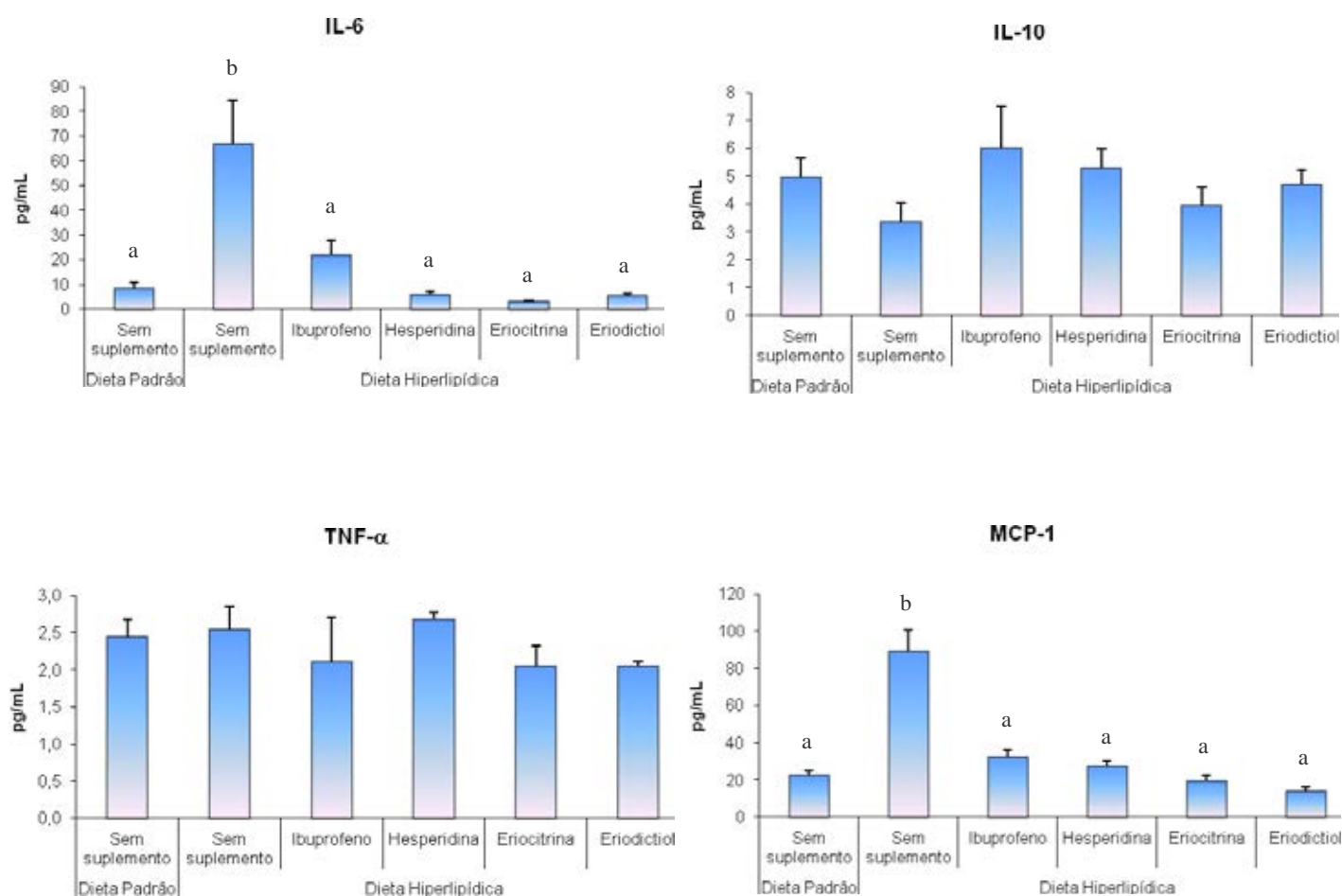


Figura 6. Níveis séricos das citocinas IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α , de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol. Dados expressos como média \pm erro padrão, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

5.6 Parâmetros do estresse oxidativo

Os resultados da influência da hesperidina, eriocitrina e eriodictiol sobre os níveis de TBARS no soro e fígado, e da capacidade antioxidante total no soro de camundongos tratados com dieta hiperlipídica são mostrados na Tabela 6 e Figura 7.

O grupo dieta hiperlipídica apresentou aumento de cerca de 32% nos níveis de TBARS no soro e 60% no fígado, em relação aos demais grupos. Enquanto a concentração de TBARS hepática foi consistentemente reduzida em todos os grupos suplementados: 77% no grupo ibuprofeno, 52% no grupo hesperidina, 59% no grupo eriocitrina e 68% no grupo eriodictiol, em relação ao grupo dieta hiperlipídica. No soro o TBARS foi reduzido apenas nos grupos suplementados com eriocitrina e eriodictiol, 48 e 47 %, respectivamente.

Observamos também um leve aumento da capacidade antioxidante sanguínea nos grupos suplementados com hesperidina (7%), eriocitrina (9%) e eriodictiol (6%), comparado ao grupo dieta hiperlipídica, mas o grupo ibuprofeno e controle não mostraram alterações na capacidade antioxidante.

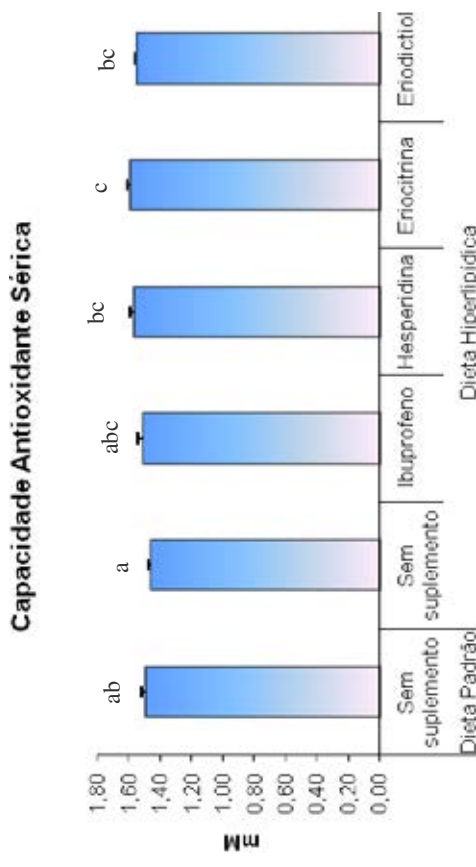
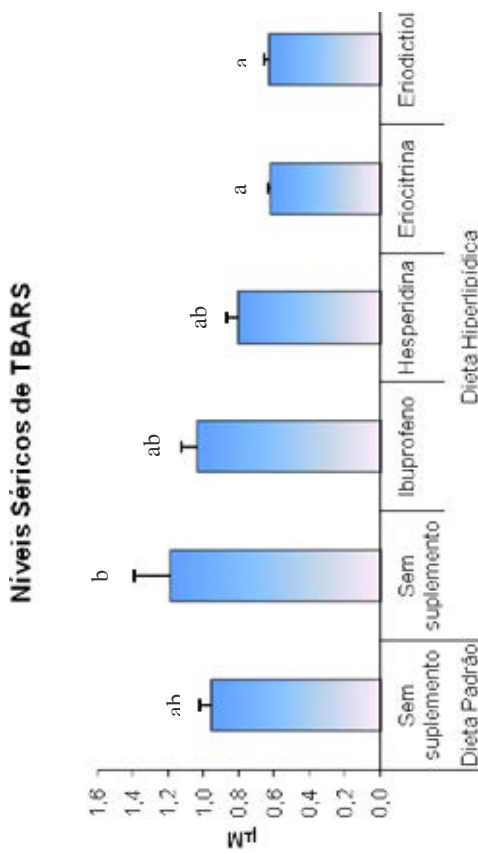
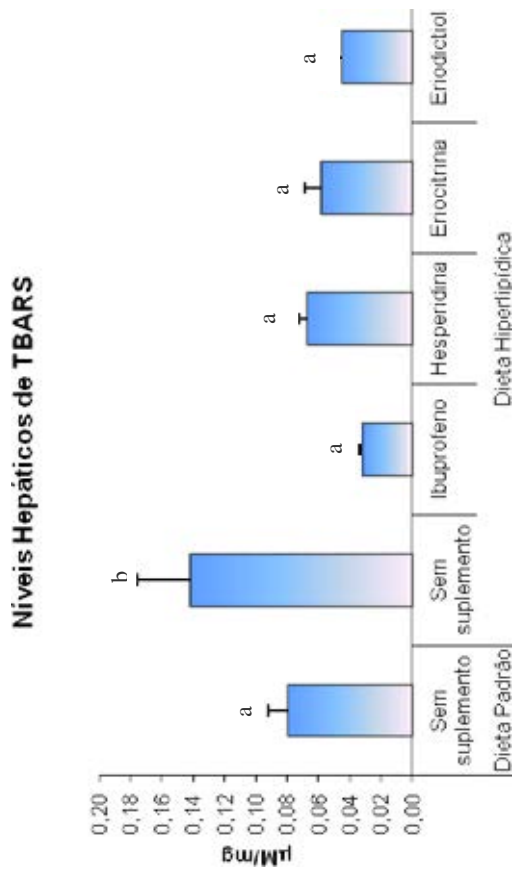


Figura 7. Parâmetros do estresse oxidativo de camundongos alimentados com dieta padrão, dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica suplementada com ibuprofeno, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol. Dados expressos como média ± erro padrão, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si (p<0,05).

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que as flavanonas cítricas, hesperidina, eriocitrina e eriodictiol, reduzem os danos causados pela obesidade e estado de inflamação crônica de baixo grau induzida por dieta hiperlipídica. Foram detectados nos animais tratados com flavanonas cítricas: (1) redução no soro sanguíneo das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e MCP-1, (2) redução da peroxidação lipídica sérica e hepática, (3) aumento da capacidade antioxidante, (4) diminuição da esteatose e danos hepáticos causados pelo consumo da dieta hiperlipídica. Foi ainda verificada (5) redução da massa do coração e do baço, indicando possível ação anti-inflamatória e antioxidante dos flavonoides nestes órgãos. Dentre as flavanonas estudadas, a hesperidina foi a única que apresentou atividade hipolipemiante, reduzindo os níveis de LDL-c em 27,5%. O efeito da hesperidina sobre o colesterol foi relatado por outros autores^{18,19}, e se deve a sua capacidade em reduzir a secreção da Apo B (apolipoproteína B) e a síntese de VLDL-c, promovendo ação hipolipidêmica por diminuir a esterificação do colesterol e as concentrações plasmáticas de LDL-c⁹³.

Ao contrário dos animais suplementados, aqueles que receberam a dieta hiperlipídica sem flavanonas mostraram aumento do estresse oxidativo, da inflamação sistêmica, da gordura hepática, massa do coração e baço, evidenciando o alto potencial da dieta hiperlipídica de induzir o estado de inflamação crônica e sistêmica, comum da obesidade. Ainda, todos os animais que receberam dieta hiperlipídica, suplementada ou não, tiveram maior peso corporal e gordura visceral, maior nível de glicose e lipídios séricos, mostrando que a obesidade foi eficientemente induzida. A elevação da lipidemia tem estreita relação com a esteatose hepática e a hiperglicemia é uma das primeiras alterações causadas por danos teciduais devido à inflamação no fígado e tecido adiposo, contribuindo para o desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares⁹⁴.

Contudo, os valores de glicose sérica encontrados foram elevados mesmo no grupo controle, quando comparado a estudos anteriores^{95,96,97}. Estudo recente revelou que o uso de uma dieta padrão semissintética, como a utilizada neste estudo, que possui altas quantidades de amido de milho e sacarose pode ser limitante no estudo do efeito de dietas hiperlipídicas sobre a homeostase glicêmica⁹⁸. Além disso, tem sido demonstrado que camundongos da linhagem C57BL/6J são os mais indicados para estudos de intolerância à glicose e fases iniciais do diabetes *mellitus* tipo 2, por serem mais suscetíveis⁹⁵. De forma geral, o consumo prolongado de dietas hiperlipídicas por camundongos causa um desequilíbrio no metabolismo da glicose que leva à diminuição da expressão gênica, síntese e secreção de insulina e, aumenta a apoptose das

células β , sugerindo que este seja o mecanismo responsável pela hiperglicemia comumente observada em indivíduos obesos com inflamação crônica⁹⁶.

Como observado neste trabalho, e em estudos anteriores^{99,100}, o aumento do peso e acúmulo de gordura visceral nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica foi independente da ingestão de energia, pois eles ingeriram menor quantidade que os controles. Os roedores possuem um mecanismo de adaptação sensível à energia da dieta, e quando alimentados com dieta hipercalórica ocorre uma renovação celular no hipotálamo que ajusta rapidamente o consumo de energia, fazendo com que eles reduzam o consumo alimentar¹⁰¹. Desta forma, sugere-se que o aumento da gordura visceral, observado nos animais deste experimento, foi resultado do conteúdo lipídico da dieta, e não das calorias ingeridas. O tecido adiposo se expande como forma de adaptação frente ao excesso de suprimento lipídico para acomodar a maior oferta de ácidos graxos livres circulantes, reduzindo a hiperlipidemia e a deposição de lipídios em outros tecidos¹⁰².

O armazenamento de triglicerídeos protege as células não adiposas contra a sobrecarga de ácidos graxos, mas no estado de inflamação crônica e sistêmica induzido pela obesidade, há aumento da lipogênese em tecidos não adiposos e lipólise no tecido adiposo branco, desequilibrando a homeostase de ácidos graxos e, levando a lipotoxicidade tecidual e sanguínea. O acúmulo de triglicerídeos em células não adiposas leva à formação de produtos como as ceramidas e diacilglicerol, que propiciam a ativação da sintetase de óxido nítrico induzida (iNOS), com consequente formação de óxido nítrico e indução de processo de apoptose através da ativação do fator nuclear κ B (NF κ B)^{56,103,104}. Portanto, o aumento do coração e a presença de esteatose hepática observada nos animais que receberam a dieta hiperlipídica ocorreram, possivelmente, em consequência da perda da capacidade de regulação da síntese e armazenamento de triglicerídeos no tecido adiposo causada pela inflamação.

A deposição de lipídios pode ocorrer no coração, artérias, fígado, músculos e pâncreas, e tem sido associada à disfunção desses tecidos em modelos de síndrome metabólica e resistência insulínica^{67,105}. Neste estudo o aumento da massa do coração foi eficientemente inibido nos grupos suplementados com as flavanonas, e do baço nos suplementados com ibuprofeno, hesperidina e eriodictiol, enquanto a eriocitrina apresentou massa intermediária do baço. A hipertrofia do coração pode ser resultante de alterações inflamatórias e oxidativas causadas pelo consumo da dieta hiperlipídica. O aumento de citocinas pró-inflamatórias e a infiltração de macrófagos precederam o aparecimento da disfunção miocárdica em camundongos transgênicos, mostrando que a lipotoxicidade neste tecido pode induzir a inflamação e contribuir para o seu remodelamento¹⁰⁶. Da mesma forma, o aumento do baço foi anteriormente relacionado ao

estímulo inflamatório da dieta hiperlipídica¹⁰⁷. O baço é um órgão linfoide, cuja principal função na inflamação é através de fagocitose, imunidade mediada por células T, e imunidade humoral mediada por células B. Pacientes com esteatose hepática não alcoólica apresentam um aumento do tamanho desse órgão, devido ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias^{38,60,61,62}.

O fígado é o órgão mais suscetível à lipotoxicidade sob condições de suprimento excessivo de gordura, pois tem capacidade limitada para acomodação de lipídios, e, no entanto, recebe grande quantidade da dieta diretamente por meio da veia porta e da captação de lipídios circulantes não oxidados pelos músculos e outros tecidos¹⁰². No presente estudo o consumo da dieta hiperlipídica causou alterações severas na estrutura hepática, revelando alterações morfológicas como balonização, degradação celular e nuclear, caracterizando um processo de morte celular, com a presença de esteatose hepática na forma de micro e macro vesículas de gordura, mas sem aumento da infiltração de células de defesa. Estudo recente com camundongos mostrou que o consumo de dieta hiperlipídica pode levar a esteatose hepática num período de três semanas ou menos¹⁰². A comparação entre o consumo de dieta de *fast food*, rica em gordura e açúcar, e o consumo de dieta hiperlipídica, revelou a presença de esteatose hepática com balonismo pronunciado e fibrose progressiva na primeira, e esteatose hepática evidente na segunda, mas sem evidências de inflamação¹⁰⁸.

Embora o fígado dos animais alimentados com dieta hiperlipídica tenha sido diagnosticado com esteatose, os resultados mostraram que a massa do fígado foi maior nos animais alimentados com dieta padrão, sugerindo maior armazenamento de glicogênio e água, devido ao conteúdo 2,2 vezes maior de carboidratos na dieta padrão do que na dieta hiperlipídica¹⁰⁹. Estudo recente mostrou que o peso do fígado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por onze semanas não foi alterado, embora o conteúdo de gordura hepática tenha sido maior que dos animais controles, assim como observado neste estudo⁹⁸. No presente estudo, a suplementação com hesperidina, eriodictiol e ibuprofeno protegeu o fígado das alterações morfológicas provocadas pelo consumo da dieta hiperlipídica (balonização e degradação dos hepatócitos) e diminuiu o tamanho das gotículas de gordura depositadas nos hepatócitos, mostrando o importante papel da ação anti-inflamatória dessas flavanonas na proteção contra os danos hepáticos causados pelo consumo excessivo de gordura. Fato que fica evidenciado pelo uso do ibuprofeno que ofereceu não só proteção contra a peroxidação lipídica nesse órgão, como também reduziu os danos na morfologia hepática. Embora o mecanismo de ação das flavanonas possa ser diferente do ibuprofeno, a diminuição da inflamação parece ter papel primordial na prevenção desses danos.

A sobrecarga de lipídios no fígado contribui para a disfunção das células hepáticas, reduzindo a capacidade de armazenamento e oxidação de ácidos graxos, o que permite que compostos intermediários como ceramidas e diacilgliceróis se acumulem¹¹⁰. Este processo tem sido também associado à resistência insulínica com consequente elevação da gliconeogênese e redução da síntese de glicogênio no estado pós-prandial^{94,111}. Estudos anteriores indicam que a hesperidina, eriocitrina e eriodictiol diminuem o acúmulo de gordura hepática devido a sua ação sobre o PPAR α e PPAR γ , que tem importante papel no metabolismo de lipídios e da glicose^{8,82,112,113}. O desenvolvimento de esteatose hepática está diretamente relacionado com o consumo exagerado de lipídios⁹⁸. Estima-se que 70 a 100% da população de obesos tenham esteatose hepática, onde o excesso de gordura e o estresse oxidativo têm papel direto na sua iniciação e desenvolvimento¹¹⁴. Um dos indicativos de dano hepático é o aumento da proteína C-reativa, e o consumo das flavanonas hesperidina, eriocitrina e eriodictiol, e do ibuprofeno junto à dieta hiperlipídica, reduziu significativamente os níveis séricos dessa proteína, que é utilizada como marcador inflamatório sistêmico. A proteína C-reativa apresenta correlação positiva com o índice de massa corporal, gordura corporal, circunferência da cintura, glicemia de jejum, colesterol total, triglicerídeos, LDL-c e pressão arterial em humanos, sendo amplamente utilizada no diagnóstico de doenças cardiovasculares^{115,116}.

O tecido adiposo branco, juntamente com o fígado, está envolvido em vários processos metabólicos ligados à inflamação e à obesidade através da secreção de adipocinas (citocinas e quimiocinas secretadas pelo tecido adiposo), onde diversas vias estão envolvidas^{117,118,119}. O acúmulo de gordura na porção visceral (epididimal, retro peritoneal e peri-renal) tem sido amplamente utilizado em modelos de estudos de inflamação crônica, onde a obesidade é induzida por dietas hiperlipídicas^{120,121, 122}. No fígado, o alto teor de gordura aumenta a atividade do NF κ B, produção de citocinas pró-inflamatórias, infiltração de macrófagos e expressão de MCP-1, bem como o aumento dos níveis sistêmicos de proteínas de fase aguda⁴⁷.

A suplementação com hesperidina, eriocitrina, eriodictiol e com ibuprofeno nos camundongos suprimiu o estado de inflamação sistêmica provocado pelo consumo da dieta hiperlipídica, reduzindo significativamente a resposta pró-inflamatória, como mostrado pela redução dos níveis séricos da IL-6 e MCP-1. Ao contrário, os animais tratados com a dieta hiperlipídica mostraram aumento de ambas. Existe uma relação positiva entre porcentagem de gordura corporal e aumento de citocinas pró-inflamatórias, entre elas, a IL-6, MCP-1 e TNF- α ^{5,123}. A infiltração de macrófagos e células inflamatórias nos adipócitos ocorre na mesma proporção que o aumento do tecido adiposo, e a elevação dos níveis sistêmicos de MCP-1 tem sido associada à obesidade em humanos e roedores^{5,124,125}. Níveis elevados de IL-6 foram

associados ao acúmulo de gordura no fígado e nos músculos, e o consumo de dieta hiperlipídica aumenta a expressão gênica de IL-6 nos adipócitos e sua concentração no plasma e no tecido adiposo^{3,66}. Além disso, o aumento dos níveis de IL-6 e TNF- α podem elevar a produção de proteína C-reativa no fígado, levando a uma resposta inflamatória sistêmica¹²⁶, assim como observado neste estudo.

A inflamação é normalmente controlada por um balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias. A IL-10 possui ação inibidora sobre monócitos, macrófagos, células T e B, que atuam positivamente sobre a resposta imune inata e específica. O aumento da IL-10 impede a liberação de mediadores pró-inflamatórios e aumenta funções inibitórias, de tolerância, e limpadora dessas células¹²⁷. Porém, os resultados do presente estudo não mostraram alterações nos níveis séricos da IL-10 e TNF- α entre os grupos, provavelmente pelo tempo de experimentação. Num estudo semelhante, camundongos que consumiram dieta hiperlipídica por 3 e 8 semanas também não tiveram alteração dos níveis sistêmicos de vários mediadores pró e anti-inflamatórios, entre eles IL-6, IL-10, TNF- α e MCP-1¹⁰².

Além de aumentar a inflamação, o consumo da dieta hiperlipídica aumentou também a peroxidação lipídica, tanto no soro quanto no fígado dos animais estudados, acompanhado pela diminuição da capacidade antioxidante no soro. Este resultado indicou aumento do estresse oxidativo e, por consequência, maior utilização das substâncias antioxidantes sanguíneas, enquanto a suplementação com as flavanonas aumentou a capacidade antioxidante sérica. Todavia, este efeito não foi observado com o ibuprofeno. No fígado, a peroxidação lipídica foi reduzida pela hesperidina, eriocitrina, eriodictiol e ibuprofeno. No entanto, a peroxidação lipídica no soro foi reduzida somente com eriocitrina e eriodictiol, mas não com ibuprofeno ou hesperidina. Foi mostrado que o eriodictiol tem o efeito antioxidante mais eficiente e protetor contra o estresse oxidativo que vários outros flavonoides, fato que pode estar relacionado ao seu maior número de hidroxilas em relação à hesperidina e eriocitrina^{128,129}.

A diminuição da peroxidação lipídica está relacionada ao aumento dos níveis circulantes de antioxidantes exógenos e, provavelmente pela conservação e aumento da atividade de enzimas antioxidantes como glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e superóxido dismutase pelo consumo das flavanonas⁵². Por outro lado, a diminuição do estresse oxidativo no fígado pela suplementação com ibuprofeno mostra a estreita relação entre inflamação e estresse oxidativo, onde mesmo não alterando a capacidade antioxidante sérica ele foi capaz de reduzir o estresse provocado pela dieta hiperlipídica nesse órgão, que é um dos mais afetados.

Como mostrado neste estudo, o consumo de substâncias capazes de suprimir a liberação de IL-6 e MCP-1, e o estresse oxidativo, pode prevenir ou impedir o desenvolvimento de doenças e distúrbios metabólicos provocados pela inflamação associada ao consumo de dietas hiperlipídicas e acúmulo de tecido adiposo¹³⁰. Os resultados mostraram claramente que as flavanonas hesperidina, eriocitrina e eriodictiol foram capazes de suprimir a resposta pró-inflamatória, sendo candidatas potenciais para esse fim. Em concordância aos fatos observados, estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de frutas cítricas tem uma relação inversa com a incidência de doenças cardiovasculares, cuja principal característica é a inflamação sistêmica^{131,132}. A proteção oferecida pelas flavanonas cítricas parece estar ligada à sua ação antioxidante, como constatado neste estudo pela diminuição da peroxidação lipídica sérica e hepática, impedindo a propagação da inflamação através da diminuição do estresse oxidativo.

7. CONCLUSÕES FINAIS

O presente estudo mostrou pela primeira vez que as flavanonas eriocitrina e eriodictiol são capazes de suprimir eficientemente a inflamação induzida pela obesidade e consumo de dieta hiperlipídica, prevenindo danos em órgãos como o fígado, coração e baço de camundongos. Além disso, a suplementação com hesperidina, eriocitrina e eriodictiol se mostrou potencialmente útil na prevenção dos danos iniciais, causadores de distúrbios metabólicos, que no homem, podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Global Health Observatory (GHO) – Obesity: Situation and trends; Media centre Cardiovascular diseases (CVDs). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> Acesso em: 29 mar. 2014.
2. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752-61.
3. Mei M, Zhao L, Li Q, Chen Y, Huang A, Varghese Z, Moorhead JF, Zhang S, Powis SH, Li Q, Ruan XZ. Inflammatory stress exacerbates ectopic lipid deposition in C57BL/6J mice. *Lipids Health Dis.* 2011;10:110.
4. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism.* 2008;57:1071-7.
5. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1796-808.
6. Hsieh PS, Lu KC, Chiang CF, Chen CH. Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat induced obese rats. *Eur J Clin Invest.* 2010;40:164-71.
7. Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, SHIMOMURA Y, Osawa T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci.* 2003;2:1609-16.
8. Hu Q, Zhang DD, Wang L, Lou H, Ren D. Eriodictyol-7-O-glucoside, a novel Nrf2 activator, confers protection against cisplatin-induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 2012; 50:1927–1932.
9. Jing X, Ren D, Wei X, Shi H, Zhang X, Perez RG, Lou H, Lou H. Eriodictyol-7-O-glucoside activates Nrf2 and protects against cerebral ischemic injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;273:672-9.

10. Lee ER, Kim JH, Kang YJ, Cho SG. The anti-apoptotic and anti-oxidant effect of eriodictyol on UV-induced apoptosis in keratinocytes. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:32-7.
11. Lee E, Jeong KW, Shin A, Jin B, Jnawali HN, Jun BH, Lee JY, Heo YS, Kim Y. Binding model for eriodictyol to Jun-N terminal kinase and its anti-inflammatory signaling pathway. *BMB Rep.* 2013;46:594-9.
12. Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res.* 2005;25:3367-74.
13. Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Salomone S. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemical Pharmacol.* 2012; 84:88–92.
14. Yoshida H, Takamura N, Shuto T, Ogata K, Tokunaga J, Kawai K, Kai H. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF- α in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:728-32.
15. Saiprasad G, Chitra P, Manikandan R, Sudhandiran G. Hesperidin alleviates oxidative stress and downregulates the expressions of proliferative and inflammatory markers in azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis in mice. *Inflamm Res.* 2013;62:425-40.
16. Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of Citrus juices. *Molecules.* 2007;12:1641-73.
17. Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinae N, Osawa T. Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriodictyol-treated rats. *J Agric Food Chem.* 2000;48:3217-24.
18. Apteckmann NP, Cesar TB. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL-cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects.
19. Mulero J, Bernabé J, Cerdá B, García-Viguera C, Moreno DA, Albaladejo MD, Avilés F, Parra S, Abellán J, Zafrilla P. Variations on cardiovascular risk factors in metabolic syndrome after consume of a citrus-based juice. *Clin Nutr.* 2012;31:372-7.

20. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197–216.
21. Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:807–22.
22. Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr.* 2012;21;32:261-86.
23. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res.* 2001;480:243–268.
24. Kundu JK, Surh YJ. Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals. *Mutat. Res.* 2005;591:123–46. *Lipids Health Dis.* 2013;12:119
25. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001;487:318–322.
26. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 2000;80:617–53.
27. Zielinska-Przyjemska M, Ignatowicz E. Citrus fruit flavonoids influence on neutrophil apoptosis and oxidative metabolism. *Phytother Res.* 2008;22:1557-62.
28. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420: 846–52.
29. Yang HL, Chen SC, Senthil Kumar KJ, Yu KN, Lee Chao PD, Tsai SY, Hou YC, Hseu YC. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach. *J Agric Food Chem.* 2012;60:522-32.
30. Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res.* 2009;58:727-36.
31. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425–32
33. Leal Vde O, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta.* 2013;419:87-94.

32. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2007;132:2169-80.
34. Richardson VR, Smith KA, Carter AM. Adipose tissue inflammation: Feeding the development of type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*. 2013; 218:1497-504.
35. Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm*. 2006;74:443–77.
36. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:772–83.
37. Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc*. 2011;70:408-17.
38. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest*. 2006;116:1494–505.
39. Wood IS, de Heredia FP, Wang B, Trayhurn P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2009;68:370-7.
40. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:1118–28.
41. Lolmede K, Durand DE, Saint Front, V, Galitzky J, Lafontan M, Bouloumié A. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27:1187–95.
42. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005;46:2347– 55.
43. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008;582:97-105.

44. Dhindsa S, Tripathy D, Mohanty P, Ghanim H, Syed T, Aljada A, Dandona P. Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor- κ B in mononuclear cells. *Metabolism*. 2004;53:330–34.
45. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*. 2003;52:2882–7.
46. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2001;276:16683-9.
47. Van Diepen JA, Berbée JF, Havekes LM, Rensen PC. Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;228:306-15.
48. Oh DY, Lagakos WS. The role of G-protein-coupled receptors in mediating the effect of fatty acids on inflammation and insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14:322-27.
49. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30:400-18.
50. Rodriguez-Manas L, Angulo J, Vallejo S, Peiro C, Sanchez-Ferrer A, Cercas E et al. Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature. *Diabetologia*. 2003; 46:556–566.
51. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1785–1788.
52. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim JW. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem*. 2009;284:10601–09.
53. Zhang Y, Chen X. Reducing seleno protein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. *Am J Physiol. Endocrinol Metab*. 2011;300:77–85.

54. Gummersbach C, Hemmrich K, Kroncke KD, Suschek CV, Fehsel K, Pallua N. New aspects of adipogenesis: radicals and oxidative stress, Differentiation. v. 77, p. 115-120, 2009.
55. Findeisen HM, Pearson KJ, Gizard F, Zhao Y, Qing H, Jones KL, Cohn D, Heywood EB, DE Cabo R, Bruemmer D. Oxidative stress accumulates in adipose tissue during aging and inhibits adipogenesis. Plos one. 2011;6:e18532.
56. Murdolo G, Piroddi M, Luchetti F, Tortoioli C, Canonico B, Zerbinati C, Galli F, Iuliano L. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. Biochimie. 2013;95:585-94.
57. Schilling JD, Machkovech HM, Kim AH, Schwendener R, Schaffer JE. Macrophages modulate cardiac function in lipotoxic cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012;303:H1366-73.
58. Nieto-vasquez I, Fernandez-veledo S, DE Alvaro C, Lorenzo M. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. Diabetes. 2008;57:3211–21.
59. Sparks JD, Cianci J, Jokinen J, Chen LS, Sparks CE. Interleukin-6 mediates hepatic hypersecretion of apolipoprotein B. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;299:980–9.
60. Tsushima Y, Endo K. Spleen enlargement in patients with nonalcoholic fatty liver: correlation between degree of fatty infiltration in liver and size of spleen. Dig Dis Sci. 2000;45:196-200.
61. Rousset S, Emre Y, Join-Lambert O, Hurtaud C, Ricquier D, Cassard-Doulcier AM. The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity. Cytokine. 2006;35:135-42.
62. Tarantino G, Pizza G, Colao A, Pasanisi F, Conca P, Colicchio P, Finelli C, Contaldo F, Di Somma C, Savastano S. Hepatic steatosis in overweight/obese females: new screening method for those at risk. World J Gastroenterol. 2009;15:5693-9.
63. Mali VR, Ning R, Chen J, Yang XP, Xu J, Palaniyandi SS. Impairment of aldehyde dehydrogenase-2 by 4-hydroxy-2-nonenal adduct formation and cardiomyocyte hypertrophy in mice fed a high-fat diet and injected with low-dose streptozotocin. Exp Biol Med (Maywood). 2014; 239:610-628.

64. Nagarajan V, Gopalan V, Kaneko M, Angeli V, Gluckman P, Richards AM, Kuchel PW, Velan SS. Cardiac function and lipid distribution in rats fed a high-fat diet: in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304:H1495-504.
65. Wright JJ, Kim J, Buchanan J, Boudina S, Sena S, Bakirtzi K, Ilkun O, Theobald HA, Cooksey RC, Kandrор KV, Abel ED. Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res*. 2009 ;82:351-60.
66. Lira FS, Rosa JC, Cunha CA, Ribeiro EB, Nascimento CO, Oyama LM, Mota JF. Supplementing alpha-tocopherol (vitamin E) and vitamin D3 in high fat diet decrease IL-6 production in murine epididymal adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes following LPS stimulation. *Lipids Health Dis* 2011;10:37.
67. Unger RH, Scherer PE. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21:345–52.
68. Mulvihill EE, Huff MW. Protection from Metabolic Dysregulation, Obesity, and Atherosclerosis by Citrus Flavonoids: Activation of Hepatic PGC1 α -Mediated Fatty Acid Oxidation. *PPAR Res*. 2012;2012:857142.
69. O’Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL III. 100% orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003–2006. *Nutr J*. 2012;11:107.
70. Assini, JM, Mulvihill, EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24:34-40.
71. Miyaki Y, Mochizuki M, Okada M, Hiramitsu M, Morimitsu Y, Osawa T. Isolation of antioxidative phenolic glucosides from lemon juice and their suppressive effect on the expression of blood adhesion molecules. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71:1911-19.
72. Peterson JJ, Beecher GR, Bhagwat SA, Dwyera JT, Gebhardt SE, Haytowitz DB, Holdenc JM. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J Food Compos Anal*. 2006;19:74–80.

73. Tripoli E, Guardia M, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* 2007;104:466–79.
74. Miyake Y, Sakurai C, Usuda M, Fukumoto S, Hiramitsu M, Sakaida K, Osawa T, Kondo K. Difference in plasma metabolite concentration after ingestion of lemon flavonoids and their aglycones in humans. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2006;52:54–60.
75. Nielsen ILF, Chee WSS, Poulsen L, Offord-cavin E, Rasmussen SE, Frederiksen H, Enslin M, Barron D, Horcajada MN, Williamson G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: A randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr.* 2006;136:404–08.
76. Mullen W, Archeveque MA, Edwards CA, Matsumoto H, Crozier A. Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. *J Agric Food Chem.* 2008;56:11157-64.
77. De Oliveira DM, Dourado GK, Cesar TB. Hesperidin associated with continuous and interval swimming improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10:27 [Epub ahead of print].
78. Li R, Cai L, Xie XF, Peng L, Wu TN, Li J. 7,3'-dimethoxy hesperetin inhibits inflammation by inducing synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2013;35:139-46.
79. Dourado GKZS, Ribeiro LCA, Carlos IZ, Cesar TB. Orange juice and hesperidin promote differential innate immune response on macrophages ex vivo. *Int J Vitam Nutr Res.* 2013 (no prelo)..
80. Rizza S Muniyappa R, Iantorno M, Kim JA, Chen H, Pullikotil P, Senese N, Tesauro M, Lauro D, Cardillo C, Quon MJ. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:782-92.
81. Miyake, Y.; Yamamoto, K.; Morimitsu, Y.; Osawa, T. Characteristics of antioxidative flavonoid glycosides in lemon fruit. *Food Sci Technol Int.* 1998;4:48–53.

82. Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, Inoue T, Katagiri T, Zang L, Nishimura Y, Nishimura N, Tanaka T. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. *Sci Rep.* 2014;4:3708.
83. Huang T, Tseng KY, Tsai S, Liu H, Ho C; Lin HY, Cheng LT, Chuang KP. Eriodictyol decreases very late antigen-4 (VLA-4) expression, cellular adhesion, and migration through an NF κ B-dependent pathway in monocytes. *J Funct Foods* 2010;2:263-270.
84. Johnson J, Maher P, Hanneken A. The flavonoid, eriodictyol, induces long-term protection in ARPE-19 cells through its effects onNrf2 activation and phase 2 gene expression. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:2398–2406.
85. Hanneken A, Lin FF, Johnson J, Maher P. Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3164-77.
86. Wang X, Wang Z, Liu JZ, Hu JX, Chen HL, Li WL, Hai CX. Double antioxidant activities of rosiglitazone against high glucose-induced oxidative stress in hepatocyte. *Toxicol in Vitro.* 2011; 25:839–847.
87. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997;5:838-41
88. Rainsford KD. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology.* 2009;17:275-342.
89. Knopfholz J, Disserol CCD, Pierin AJ, Schirr FL, Streisky L, Takito LL, Ledesma PM, Faria-Neto JR, Olandoski M, Cunha CLP, Bandeira AM.. Validation of the Friedewald Formula in Patients with Metabolic Syndrome. *Cholesterol.* 2014; 2014:261878.
90. Kohn HI; Liversedge M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther.* 1944;82:292-300.
91. Krohn RI. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Curr Protoc Cell Biol.* 2011;28:A.3H.1-A.3H.

92. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1231-37.
93. Borradaile NM, Carroll KK, Kurowska EM. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids.* 1999;34:591-98.
94. Um MY, Moon MK, Ahn J, Youl Ha T. Coumarin attenuates hepatic steatosis by down-regulating lipogenic gene expression in mice fed a high-fat diet. *Br J Nutr.* 2013;109:1590-7.
95. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53:S215-9.
96. Wu Y, Wu T, Wu J, Zhao L, Li Q, Varghese Z, Moorhead JF, Powis SH, Chen Y, Ruan XZ. Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet. *J Endocrinol.* 2013;219:195-204.
97. Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2014;6:47-54.
98. Benoit B, Plaisancié P, Awada M, Géloën A, Estienne M, Capel F, Malpuech-Brugère C, Debard C, Pesenti S, Morio B, Vidal H, Rieusset J, Michalski MC. High-fat diet action on adiposity, inflammation, and insulin sensitivity depends on the control low-fat diet. *Nutr Res.* 2013;33:952-60.
99. Jorgensen EA, Vogelsang TW, Knigge U, Watanabe T, Warberg J, Kjaer A. Increased susceptibility to diet-induced obesity in histamine-deficient mice. *Neuroendocrinology.* 2006;83:289-94.
100. Townsend KL, Lorenzi MM, Widmaier EP. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocrine.* 2008;33:176-88.

101. Gouazé A, Brenachot X, Rigault C, Krezymon A, Rauch C, Nédélec E, Lemoine A, Gascuel J, Bauer S, Pénicaud L, Benani A. Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. *Plos one*. 2013;8:e72029.
102. Trajcevski KE, O'Neill HM, Wang DC, Thomas MM, Al-Sajee D, Steinberg GR, Ceddia RB, Hawke TJ. Enhanced lipid oxidation and maintenance of muscle insulin sensitivity despite glucose intolerance in a diet-induced obesity mouse model. *Plos One*. 2013;8:e71747.
103. Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Opin Cardiovasc Ther*. 2008;6:343–368.
104. Unger RH, Zhou Y-T, Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:2327-32.
105. Grundy SM. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:399–404.
106. Schilling JD, Machkovech HM, Kim AH, Schwendener R, Schaffer JE. Macrophages modulate cardiac function in lipotoxic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303:1366-73.
107. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009; 325:612-16.
107. Vielma SA, Klein RL, Levingston CA, Young MR. Adipocytes as immune regulatory cells. *Int Immunopharmacol*. 2013;2:224-31.
108. Charlton M, Krishnan A, Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico A, Masuoko H, Gores G. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301:G825-34.

109. Bergstrom J, Hermansen L, Hultman E, Saltin B. Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand.* 1967;2:140-50.
110. Adiels M, Taskinen MR, Boren J. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep.* 2008; 8:60–64.
111. Samuel VT, Shulman GI Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell.* 2012;148:852–71.
112. Fukuchi Y, Hiramitsu M, Okada M, Hayashi S, Nabeno Y, Osawa T, Naito M. Lemon Polyphenols Suppress Diet-induced Obesity by Up-Regulation of mRNA Levels of the Enzymes Involved in beta-Oxidation in Mouse White Adipose Tissue. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;43:201-9.
113. Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:1134-45.
114. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology.* 2006; 43:99–112.
115. Unek IT, Bayraktar F, Solmaz D, Ellidokuz H, Sisman AR, Yuksel F, Yesil S. The levels of soluble CD40 ligand and C-reactive protein in normal weight, overweight and obese people. *Clin Med Res.* 2010;8:89-95.
116. Stepien M, Stepien A, Wlazeł RN, Paradowski M, Banach M, Rysz J. Obesity indices and inflammatory markers in obese non-diabetic normo- and hypertensive patients: a comparative pilot study. *Lipids Health Dis.* 2014;13:29.
113. Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, Inoue T, Katagiri T, Zang L, Nishimura Y, Nishimura N, Tanaka T. Eriocitrin ameliorates diet induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis. *Sci Rep.* 2014;4:3708.
117. Bueno AA, Oyama LM, de Macedo Motoyama CS, da Silva Biz CR, Silveira VL, Ribeiro EB, Oller do Nascimento CM. Long chain saturated fatty acids increase haptoglobin gene expression in C57BL/6J mice adipose tissue and 3T3-L1 cells. *Eur J Nutr.* 2010;49:235-41.

118. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, Xiang X, Luo Z, Ruderman N.
Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes*. 2005;54:3458-65.
119. Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV.
Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:451-63.
120. Bueno AA, Oyama LM, de Oliveira C, Pisani LP, Ribeiro EB, Silveira VL, Oller do Nascimento CM. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch*. 2008;455:701-9.
121. Amato MC, Pizzolanti G, Torregrossa V, Misiano G, Milano S, Giordano C.
Visceral adiposity index (VAI) is predictive of an altered adipokine profile in patients with type 2 diabetes. *Plos One*. 2014;9:e91969.
122. Eguchi K1, Manabe I. Toll-Like Receptor, Lipotoxicity and Chronic inflammation: The Pathological Link Between Obesity and Cardiometabolic Disease. *J Atheroscler Thromb*. 2014 [Epub ahead of print]
123. Wisse BE: The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2792-800.
124. Sell H1, Dietze-Schroeder D, Eckardt K, Eckel J. Cytokine secretion by human adipocytes is differentially regulated by adiponectin, AICAR, and troglitazone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343:700-6.
125. Yu R, Kim CS, Kwon, BS, Kawada T. Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:1353-62.
126. Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:678159.
127. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J.
Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:331-44.

128. Areias FM, Rego AC, Oliveira CR, Seabra RM. Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe (2+) induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:111-8.
129. Hendriks JJ, de Vries HE, Van der Pol SM, Van den Berg TK, Van Tol EA, Dijkstra CD. Flavonoids inhibit myelin phagocytosis by macrophages; a structure–activity relationship study. *Biochem Pharmacol* 2003;65:877–85.
130. Woo HM, Kang JH, Kawada T, Yoo H, Sung MK, Yu R. Active spice-derived components can inhibit inflammatory responses of adipose tissue in obesity by suppressing inflammatory actions of macrophages and release of monocyte chemoattractant protein-1 from adipocytes. *Life Sci.* 2007;80:926-31.
131. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann. Int. Med.* 2001;134:1106–14.
132. Cassidy A, Rimm EB, O'Reilly EJ, Logroscino G, Kay C, Chiuve SE, Rexrode KM. Dietary flavonoids and risk of stroke in women. *Stroke.* 2012; 43:946–951.

ANEXO 1. Aprovação do comitê de ética em pesquisa

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 18/2013

Interessado: PAULA SOUZA FERREIRA

Orientadora: Profª Drª Thaís Borges César

Projeto: Estudo da Atividade antioxidante e anti-inflamatória da flavonóides cítricos em camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório

Parecer nº 36/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa “Estudo da Atividade antioxidante e anti-inflamatória da flavonóides cítricos em camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório”, apresentado pela Pós-graduanda PAULA SOUZA FERREIRA, sob orientação da Professora Doutora Thaís Borges César, do Departamento de Alimentos e Nutrição desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em DEZEMBRO de 2013, em formulário para este fim.

Araraquara, 10 de julho de 2013.



Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA