

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/07/2018.

**Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Efeitos regulatórios da tangeritina e  
heptametoxiflavona em camundongos  
alimentados com dieta hiperlipídica**

**Marina Nery da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Alimentos e  
Nutrição para obtenção do título de  
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências  
Nutricionais

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thais Borges  
César

Araraquara

2017

# **Efeitos regulatórios da tangeritina e heptametoxiflavona em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica**

**Marina Nery da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thais Borges César

Araraquara

2017

**Ficha Catalográfica**

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**S586e** Silva, Marina Nery da  
Efeitos regulatórios da tangeritina e heptametoxiflavona em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Marina Nery da Silva. – Araraquara, 2017.  
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição.  
Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Ciências Nutricionais.

Orientadora: Thais Borges César.

1. Flavonoides cítricos. 2. Tangeritina. 3. Heptametoxiflavona. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Obesidade.  
6. Síndrome metabólica. I. César, Thais Borges, orient. II. Título.

**CAPES: 50700006**

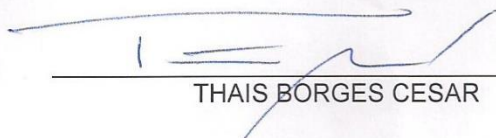
MARINA NERY DA SILVA

Efeitos regulatórios da tangeritina e heptametoxiflavona em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição

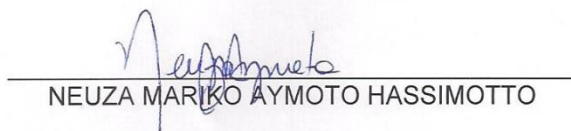
Araraquara, 06 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA



---

THAIS BORGES CESAR



---

NEUZA MARIKO AYMOTO HASSIMOTTO



---

AMANDA MARTINS BAVIERA

*Dedico este trabalho à minha mãe, Isabel, ao meu pai, Manoel, à minha irmã, Ana Clara, ao meu irmão, Francisco e ao meu companheiro, Guilherme. Dedico também a todas as pessoas de minha família, amigas e amigos que me apoiaram nessa trajetória e fizeram dela o mais leve e gratificante possível. E por fim, dedico este trabalho à todas as mulheres que fazem ciência: que usemos sempre adentrar o desconhecido.*

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Thais Borges César, pela orientação, dedicação e carinho.

À doutoranda Paula Souza Ferreira, pela paciência, companheirismo, ajuda e ensinamentos em toda trajetória do mestrado.

À Carolina B. Ribeiro, Melaine P. Fidelix, Marília Martini, Danielle Gonçalves, Olívia Ponce e Renata Benassi, pela ajuda na execução do experimento e pela amizade.

À estudante de iniciação científica Bruna Rodrigues, pelo auxílio com a manutenção dos animais.

Ao John Manthey, pesquisador da USDA Fort Pierce (USA) e a Dra. Danielle R. Gonçalves (UNESP Araraquara), pelos compostos utilizados no experimento.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório e ao técnico José Antônio Sampaio Zuanon, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, pelas análises histológicas e pela paciência.

Ao Sérgio Valladão do Laboratório de Análises Clínicas São Lucas (Araraquara, SP), pelas análises bioquímicas e pela ajuda.

À técnica Ana Lúcia Nasser, pela ajuda com as análises de estresse oxidativo.

Às Profa. Dra. Katia Sivieri e técnica Adriana Cristina Marchese Zavarizi, por conceder o laboratório e auxiliar no preparo de materiais utilizados no experimento.

Ao Carlos Alberto Arcaro Filho, doutorando em Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pelas técnicas ensinadas e por toda atenção.

Às professoras integrantes da comissão examinadora, pelas sugestões ao trabalho.

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição, pelos ensinamentos.

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pela paciência e disponibilidade.

Aos funcionários e funcionárias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e da UNESP, pela dedicação e disponibilidade.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

*“Na vida, nada deve ser temido; deve apenas ser compreendido”*

*Marie Curie*



## Resumo

**Objetivo:** Avaliar efeitos regulatórios da tangeritina e heptametoxiflavona sobre perfil bioquímico, inflamação e estresse oxidativo de camundongos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica. **Métodos:** 50 camundongos C57BL/6J machos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Controle, alimentados com dieta padrão (n=10); DH, alimentados apenas com dieta hiperlipídica (n=10); TAN, alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com tangeritina (n=15); e HMF, alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com heptametoxiflavona. Nas primeiras quatro semanas foi realizada indução da obesidade e os animais receberam apenas dieta padrão (9,5% kcal gordura) ou dieta hiperlipídica (45% kcal gordura). Após esse período, nas quatro semanas seguintes, os grupos TAN e HMF receberam dieta hiperlipídica com seus respectivos suplementos na dose de 100mg/kg, e os demais grupos continuaram a receber suas referidas dietas. Ao fim da oitava semana, os animais foram eutanasiados por exsanguinação total via punção cardíaca, e foram coletados sangue e órgãos para posteriores análises de perfil bioquímico, citocinas inflamatórias, marcadores de estresse oxidativo e histologia. **Resultados:** Tangeritina e heptametoxiflavona diminuíram os níveis séricos de glicose, leptina e resistina, e do índice HOMA-IR ( $p < 0.05$ ). Os níveis de TBARS também foram menores nos grupos suplementados em comparação ao grupo alimentado com dieta hiperlipídica não suplementada ( $p < 0,05$ ). Em adição, a tangeritina reduziu o tamanho do adipócito ( $p < 0.05$ ) e a heptametoxiflavona diminuiu a acumulação de gordura no tecido hepático ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** A suplementação com tangeritina e heptametoxiflavona indicou potencial efeito protetor de danos metabólicos causados pelo consumo de dieta hiperlipídica, evidenciado pela melhora de parâmetros relacionados a resistência insulínica e estresse oxidativo, podendo auxiliar na prevenção de alterações associadas à obesidade, como o desenvolvimento de diabetes mellitus e síndrome metabólica. **Palavras-chave:** flavonoides cítricos; tangeritina; heptametoxiflavona; dieta hiperlipídica; obesidade; síndrome metabólica.

## Abstract

**Objective:** To evaluate the regulatory effects of tangeretin and heptamethoxyflavone on biochemical profile, inflammation and oxidative stress of mice induced obesity by a high-fat diet. **Methods:** 50 male C57BL / 6J mice were randomly divided into 4 groups: Control, fed standard diet (n = 10); DH, fed only high-fat diet (n = 10); TAN, fed high-fat diet and supplemented with tangeretin (n = 15); HMF, fed high-fat diet and supplemented with heptamethoxyflavone. In the first four weeks, obesity induction was performed and the animals received only standard diet (9.5% kcal fat) or high-fat diet (45% kcal fat). After this period, in the following four weeks, the groups TAN and HMF received high-fat diet with their respective supplements in the dose of 100mg/kg, and the other groups continued to receive their referred diets. At the end of the eighth week, the mice were euthanized by total exsanguination via cardiac puncture, and blood and organs were collected for further analysis of biochemical profile, inflammatory cytokines, oxidative stress markers and histology. **Results:** Tangeretin and heptamethoxyflavone decreased serum levels of glucose, leptin and resistin, and the HOMA-IR index ( $p < 0.05$ ). The TBARS levels were also lower in the supplemented groups compared to the group fed a not supplemented high-fat diet ( $p < 0.05$ ). In addition, tangeretin reduced adipocyte size ( $p < 0.05$ ) and heptamethoxyflavone decreased fat accumulation in hepatic tissue ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Supplementation with tangeretin and heptamethoxyflavone indicated a potential protective effect of metabolic damages caused by the consumption of high-fat diet, evidenced by the improvement of parameters related to insulin resistance and oxidative stress, and may help to prevent obesity-related alterations such as the development of diabetes mellitus and metabolic syndrome. **Keywords:** citrus flavonoids; tangeretin; heptamethoxyflavone; high-fat diet; obesity; metabolic syndrome

## Sumário

	Página
Resumo	VIII
Abstract	IX
Introdução	11
Capítulo	22
Capítulo 1. Tangeretin and heptamethoxyflavone decrease insulin resistance, fat accumulation and oxidative stress in mice fed high-fat diet	23
Resumo	25
Introdução	26
Métodos	27
Resultados	30
Discussão	31
Conclusão	35
Referências	35
Considerações finais	47
Referências	48
Anexos	54

## INTRODUÇÃO

Estudos atuais têm mostrado que o consumo de dietas desbalanceadas e muito ricas em gorduras alteram o metabolismo de glicose e lipídeos e, em associação ao sedentarismo, podem levar ao aumento da obesidade em muitas populações<sup>1,2</sup>. Dentro deste quadro, o excesso de gordura abdominal tem sido relacionado ao desenvolvimento de Síndrome Metabólica, um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência insulínica. De acordo com o US National Heart, Lung and Blood Institute e o American Heart Association (NHLBI/AHA), o conjunto de três ou mais das características cardiometabólicas listadas abaixo caracterizam a Síndrome Metabólica<sup>3</sup>:

- obesidade abdominal >102cm em homens e >88cm em mulheres
- triglicerídeos >150mg/dL
- HDL-colesterol <40mg/dL em homens e <50mg/dL em mulheres
- pressão sanguínea  $\geq 130/\geq 85$ mmHg
- glicemia de jejum >110mg/dL

O desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo II e de doenças cardiovasculares está relacionado a fatores de risco da Síndrome Metabólica, como hiperglicemia e hipertrigliceridemia<sup>4</sup>. A resistência insulínica também é uma das manifestações observadas no diabetes tipo II e na síndrome metabólica. Nesse estado metabólico, a ação da insulina em tecidos alvo é prejudicada, resultando em hiperglicemia<sup>5</sup>.

Em condições normais, os lipídeos provenientes da dieta entram na circulação na forma de quilomícrons, que contêm triglicerídeos (TG). No estado

pós-prandial, quando os níveis de insulina estão elevados, ocorre aumento da atividade da lipase lipoproteica, havendo hidrólise dos TG e liberação de ácidos graxos livres (AGL) das lipoproteínas. Os AGL são capturados pelos adipócitos, sendo estocados na forma de TG no tecido adiposo. No jejum, quando os níveis de insulina diminuem, ocorre lipólise/hidrólise dos TG do tecido adiposo pela lipase hormônio sensível, com consequente liberação de AGL<sup>5</sup>. Na ingestão de dietas ricas em gordura, há excesso de ácidos graxos saturados na circulação, sendo que os altos níveis de ácidos graxos circulantes podem induzir a inflamação e estresse oxidativo, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade de NFκB e a expressão de COX-2 por meio do TLR-4<sup>6</sup>.

O tecido adiposo é composto principalmente por adipócitos, além de células endoteliais, fibroblastos, leucócitos e macrófagos. Além de funcionar como estoque energético, este tecido é responsável pela produção de diversas citocinas inflamatórias, como TNF-α, interleucinas, leptina, adiponectina, resistina e PAI-1, sendo, portanto, considerado um importante órgão endócrino. Essas citocinas atuam tanto em processos inflamatórios e imunes como na regulação da homeostase energética<sup>7,8</sup>.

Normalmente, o tecido adiposo é um órgão bem vascularizado e innervado. Entretanto, na obesidade ocorre grande acúmulo de triglicérides nas células adiposas, fazendo com que estas se expandam. Essa hipertrofia leva à diminuição do fluxo sanguíneo no tecido adiposo, causando hipóxia tecidual e consequente apoptose de adipócitos. Nestas condições, ocorre secreção de CCL2 e outras quimioquinas, aumentando a infiltração de macrófagos no tecido para sequestrar os detritos celulares. Juntamente com os adipócitos, os macrófagos ativos perpetuam um ciclo vicioso de produção de citocinas pró-

inflamatórias e liberação de ácidos graxos livres. Dessa maneira, a obesidade é considerada uma inflamação crônica sistêmica de baixa intensidade<sup>7,9</sup>.

A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória produzida pelos adipócitos, que pode aumentar a produção de IL-10 e diminuir a produção de INF- $\gamma$ . Essa citocina também é considerada anti-aterogênica por inibir a adesão de monócitos no endotélio vascular, prevenindo a formação de placas ateroscleróticas. Em condições normais, a adiponectina está relacionada à oxidação de ácidos graxos no músculo e fígado, e à redução da hiperglicemia pós-prandial. Assim, ela aumenta a sensibilidade à insulina e auxilia na regulação da homeostase energética. No entanto, em indivíduos obesos, a adiponectina é encontrada em níveis reduzidos, pois sua transcrição pode ser suprimida por marcadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>7,8,9,10</sup>.

A resistina, por sua vez, é uma citocina pró-inflamatória que tem sido relacionada à obesidade e resistência insulínica. Em roedores, a resistina é produzida pelos adipócitos, enquanto em humanos é secretada predominantemente por macrófagos. Em camundongos com resistência insulínica, observa-se altos níveis de resistina, TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1, além de apoptose de células  $\beta$ -pancreáticas. Em animais obesos, a correção dos níveis de resistina melhora a tolerância à glicose e aumenta a sensibilidade à insulina<sup>11,12,13</sup>.

A leptina é uma citocina responsável pelo controle do apetite e sua secreção pelos adipócitos ocorre em proporção direta ao estoque energético no tecido adiposo. Dessa forma, observa-se um aumento nos níveis de leptina em pacientes obesos. Esse excesso de leptina circulante, em associação ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, diminui a ação efetiva dessa citocina,

podendo acarretar em resistência à leptina e distúrbios relacionados à saciedade. A leptina tem caráter pró-inflamatório e pode aumentar a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. Além disso, a leptina estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos neutrófilos, contribuindo para o estado pró-oxidativo na obesidade<sup>7, 10</sup>.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma proteína transmembrana liberada principalmente por macrófagos, altamente expressa no tecido adiposo branco, e que está relacionada à inflamação sistêmica e local. O TNF- $\alpha$  pode diminuir a expressão de PPAR- $\gamma$ , interferindo na expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose. Além disso, o TNF- $\alpha$  pode inibir a atividade do substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) no tecido adiposo e músculo, diminuindo a translocação do transportador de glicose GLUT-4, o que pode desencadear resistência insulínica<sup>5,9,10</sup>.

A interleucina 6 (IL-6) é sintetizada principalmente por adipócitos e é considerada pró-inflamatória. Essa citocina pode inibir a atividade da lipoproteína lipase (LPL) e maturação de pré-adipócitos. Níveis elevados de IL-6 são associados à obesidade e resistência insulínica, e sua neutralização pode reduzir a resistência insulínica em camundongos<sup>7,10</sup>. Por outro lado, a interleucina 10 (IL-10) é considerada anti-inflamatória, sendo secretada por vários tipos celulares, como macrófagos e células T e B. Juntamente com a adiponectina, a IL-10 pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ <sup>8</sup>.

A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) é considerada um marcador de inflamação sistêmica e estresse oxidativo. Altas concentrações de ácidos graxos nos adipócitos aumentam a expressão de MCP-1 e de derivados

da peroxidação lipídica, como o malondialdeído, atraindo macrófagos para o tecido adiposo. A peroxidação lipídica diz respeito à degradação oxidativa de lipídeos e pode ser iniciada por espécies reativas de oxigênio (ROS)<sup>14</sup>.

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de radicais livres, como as ROS, e a sua eliminação por sistemas antioxidantes. Na obesidade, o excesso de ácidos graxos livres aumenta a atividade da NADPH oxidase e diminui a atividade de enzimas antioxidantes, aumentando a geração de ROS. Estas espécies reativas, por sua vez, aumentam a expressão de NADPH oxidase, criando um ciclo vicioso de geração de estresse oxidativo a nível local e sistêmico. Esse ambiente oxidativo desregula a produção de citocinas, elevando os níveis de TNF- $\alpha$ , MCP-1 e PAI-1<sup>15</sup>. Além disso, o excesso de radicais livres pode prejudicar o recrutamento e diferenciação de células adiposas, impedindo a expansão do tecido adiposo. Isso pode dificultar o armazenamento de triglicerídeos nesse tecido e aumentar a deposição de ácidos graxos em órgãos insulino dependentes, como o fígado e pâncreas<sup>16</sup>.

No fígado, o excesso de lipídeos dietéticos pode levar ao desenvolvimento da doença do fígado gorduroso não alcoólico (nonalcoholic fatty liver disease – NAFLD). A NAFLD é caracterizada por um acúmulo de triglicerídeos no fígado, resultando em esteatose e inflamação hepática. Em condições normais, a insulina age no fígado suprimindo a produção de glicose através da inibição da gliconeogênese e glicogenólise, além de promover a síntese de glicogênio e a lipogênese. Dessa maneira, a ação da insulina no fígado é essencial para manter a homeostase energética por meio da regulação do metabolismo de glicose e lipídeos. Entretanto, na resistência insulínica, a insulina perde a capacidade de suprimir a produção de glicose hepática, deixando de regular o metabolismo de



glicose e lipídeos, e acarretando em hiperglicemia, dislipidemias e esteatose hepática. A resistência insulínica ocorre na maior parte dos pacientes com NAFLD e a incidência dessa doença tem crescido juntamente com a pandemia de obesidade e síndrome metabólica<sup>17,18</sup>.

Enquanto dietas ricas em lipídeos são associadas ao aumento do estresse oxidativo e inflamação, estudos têm mostrado que compostos, como flavonoides, podem diminuir os danos causados pela ingestão excessiva de gordura. Flavonoides são moléculas polifenólicas presentes em frutas e vegetais, divididas em diversas classes, incluindo flavanonas, flavonas e flavonols, que apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O consumo de dietas ricas em flavonoides tem sido associado a prevenção de diabetes tipo II, câncer, desordens neurodegenerativas e osteoporose. Além disso, esses compostos podem diminuir o risco de AVC, demonstrando seu potencial cardioprotetor<sup>19,20</sup>.

As frutas cítricas estão entre as mais consumidas mundialmente, *in natura* ou em forma de suco, e são ricas em flavonoides cítricos. O consumo de suco de laranja integral tem sido associado à diminuição do risco de obesidade e à melhora de marcadores bioquímicos em humanos e modelos animais<sup>21</sup>. Um estudo recente de nosso grupo mostrou que o consumo de suco de laranja integral em pacientes obesos, associado a uma dieta de restrição alimentar, diminuiu o colesterol total, colesterol LDL, proteína C-reativa ultrasensível (PCR-us), insulina e índice HOMA-IR no soro sanguíneo, prevenindo a resistência insulínica<sup>22</sup>. Em outro estudo, o suco de laranja foi associado ao aumento da capacidade antioxidante e diminuição da inflamação e colesterol em pacientes com hepatite C, protegendo contra danos causados por essa

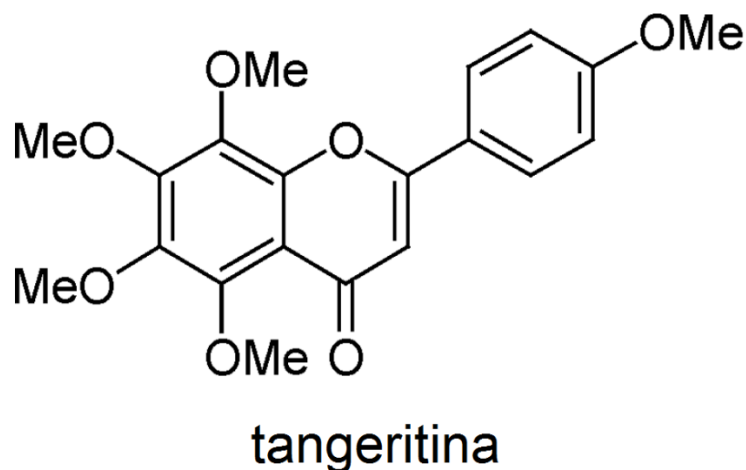
doença<sup>23</sup>. Foi mostrado ainda que o consumo de suco de laranja vermelha, rico em flavonoides cítricos e licopeno, apresentou efeitos antioxidantes, anti-inflamatórias e hipolipemiantes, podendo prevenir o desenvolvimento de síndrome metabólica em humanos<sup>24</sup>.

Dentre os flavonoides cítricos presentes nas frutas cítricas, as flavanonas são o grupo predominante, e incluem hesperidina, eriocitrina e naringina. Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com hesperidina e eriocitrina apresentaram aumento da capacidade antioxidante e diminuição dos níveis de IL-6, MCP-1 e PCR-us no soro sanguíneo. Assim, esses compostos protegeram contra a inflamação e o estresse oxidativo causados pelo consumo desta dieta<sup>25</sup>. As flavonas são o segundo maior grupo de flavonoides encontrados nas frutas cítricas, e incluem diosmestina, luteolina e apigenina. A diosmestina tem apresentado atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer, benéficas à saúde humana<sup>26</sup>.

Por fim, as polimetoxiflavonas (PMFs) são encontradas em quantidades menores que as flavanonas e flavonas, e estão presentes especialmente na casca das frutas cítricas, particularmente da laranja doce (*Citrus sinensis*) e da tangerina (*Citrus reticulata*). O termo PMF designa flavonas que contenham dois ou mais grupos metoxi em seu esqueleto pirona-benzoico básico (15 carbonos, C6-C3-C6) com um grupo carbonil na posição C4. As PMFs mais comuns são nobiletina e tangeritina e sua estrutura química é responsável por diversas propriedades biológicas de interesse farmacológico, como hipoglicêmica, hipolipidêmica e neuroprotetora<sup>27,28</sup>.

A tangeritina tem sido amplamente estudada por suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes. Sua estrutura química é mostrada na Figura 1.

Estudo em ratos com danos renais mostrou que a tangeritina reduziu o estresse oxidativo por diminuir a formação de lipoperóxidos e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como GSH e GPx. Além disso, essa PMF restaurou níveis de IL-10 e diminuiu a expressão de NF- $\kappa$ B, demonstrando sua ação anti-inflamatória<sup>29</sup>.

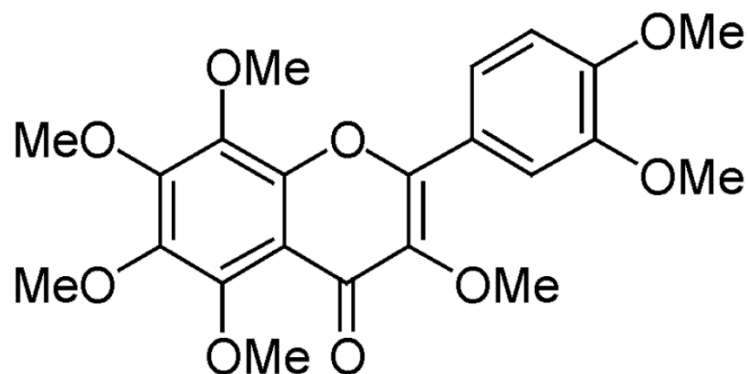


**Figura 1.** Estrutura química da tangeritina

Estudos tem explorado os benefícios da tangeritina na regulação do metabolismo de lipídeos e glicose. *In vitro*, a tangeritina diminuiu o acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos e facilitou a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, processo importante na formação do tecido adiposo e que evita a deposição lipídica em outros órgãos. Além disso, esse composto foi capaz de aumentar os níveis de adiponectina e diminuir a secreção de MCP-1<sup>30,31</sup>. Em hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica, a tangeritina reduziu os níveis séricos de LDL e VLDL, sem causar efeitos tóxicos<sup>32</sup>. O tratamento com tangeritina reduziu ainda os níveis intracelulares de triglicerídeos e colesterol *in vitro*, possivelmente por modular a secreção de apo-B<sup>33</sup>.

A tangeritina também tem sido estudada por seus efeitos antidiabéticos. Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, a tangeritina diminuiu o ganho de peso, o colesterol total e a secreção de leptina, resistina e MCP-1, além de aumentar os níveis de adiponectina e melhorar a tolerância a glicose. Ainda, foi mostrado *in vitro* que a tangeritina estimulou a captação de glicose por regular a ativação de AMPK<sup>34</sup>. Em ratos diabéticos, o tratamento com tangeritina reduziu a glicemia, aumentou os níveis de insulina e normalizou o glicogênio hepático e os níveis de enzimas do metabolismo de carboidratos, como piruvato quinase, glicose-6-fosfatase e glicogênio sintase. Assim, mostrou-se que a tangeritina pode modular a atividade de enzimas hepáticas e melhorar a resistência insulínica associada à diabetes<sup>35</sup>.

A heptametoxiflavona (HMF) é uma PMF menos explorada, que também possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Sua estrutura química é mostrada na Figura 2. A HMF tem sido estudada na prevenção de danos neurais em modelos animais. O tratamento com essa PMF protegeu contra a perda de memória e morte celular pós-isquemia cerebral em camundongos, e esses benefícios foram atribuídos ao potencial anti-inflamatórios desse composto<sup>36,37</sup>. Os efeitos anti-inflamatórios da HMF também foram observados em ratos com edema, em que o tratamento com HMF reduziu a produção de TNF- $\alpha$ <sup>38</sup>. Um estudo com camundongos mostrou ainda a proteção de HMF contra a inflamação causada por perda óssea, comumente observada em doenças periodontais<sup>39</sup>.



heptametoxiflavona

**Figura 2.** Estrutura química da heptametoxiflavona

Foi mostrado *in vitro* que a HMF reduziu a expressão de LDL-oxidado em macrófagos, podendo proteger contra a formação de placas ateroscleróticas<sup>40</sup>. A HMF inibiu a produção de esteróis e óxido nítrico *in vitro* devido a sua ação anti-inflamatória e antioxidante, e em comparação a outras PMFs, foi a que apresentou maior atividade inibitória<sup>41</sup>. Outro estudo comparando PMFs também mostrou que a HMF foi o composto com maior atividade anticâncer *in vitro*<sup>31</sup>. No entanto, ainda não estão disponíveis estudos que avaliem os efeitos da heptametoxiflavona no metabolismo de glicose e lipídeos.

Para estudos sobre obesidade e distúrbios associados, camundongos da linhagem C57BL/6J são considerados um dos melhores modelos, pois após algumas semanas alimentados com dieta hiperlipídica estes animais desenvolvem diversas alterações típicas, como hiperglicemia e dislipidemias<sup>42</sup>.

Considerando os potenciais anti-inflamatórios e antioxidantes das polimetoxiflavonas, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos regulatórios da tangeritina e da heptametoxiflavona, separadamente, em camundongos C57BL/6J induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica. Nossa

hipótese foi que os tratamentos com tangeritina e heptametoxiflavona seriam eficientes na redução de danos metabólicos causados pela ingestão de uma dieta rica em lipídeos. Assim, esses compostos poderiam prevenir o desenvolvimento de resistência insulínica e diminuir os níveis de marcadores pró-inflamatórios nestes animais.

## Considerações finais

A suplementação com tangeritina e heptametoxiflavona melhorou parâmetros relacionados a resistência insulínica (glicemia, índice HOMA-IR, resistina e leptina) e ao estresse oxidativo (TBARS). Além disso, a tangeritina reduziu a acumulação lipídica no tecido adiposo, enquanto a heptametoxiflavona diminuiu os danos hepáticos causados pela dieta rica em gordura. Pela primeira vez foram apresentados os benefícios da heptametoxiflavona na regulação do metabolismo de camundongos induzidos à obesidade.

Estes resultados sugerem que a tangeritina e a heptametoxiflavona podem ser úteis para reduzir as desordens metabólicas causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica, prevenindo o desenvolvimento de síndrome metabólica e diabetes *mellitus* tipo II.

## REFERÊNCIAS

1. WHO: Global Health Observatory (GHO) data. Obesity: situation and trends, 2015.
2. Mello MM. Obesity – personal choice or public health issue? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Jan;4(1):2-3.
3. U S National Heart, Lung and Blood Institute. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National High Blood Pressure Education Program. <http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/jnc7full.pdf>. Acesso: 03/2017.
4. Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2017 Jul;22(4):365-367
5. Velez M, Kohli S, Sabbah HN. Animal models of insulin resistance and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2014 Jan;19(1):1-13.
6. 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.
7. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:772–83.
8. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 15;323(2):630-5.
9. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3117-32.



10. Paniagua JA. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes*. 2016 Nov 15;7(19):483-514.
11. Park HK, Kwak MK, Kim HJ, Ahima RS. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *Korean J Intern Med*. 2017 Mar;32(2):239-247.
12. Schwartz DR, Lazar MA. Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Jul;22(7):259-65.
13. Filková M1, Haluzík M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol*. 2009 Nov;133(2):157-70.
14. Tateya S, Tamori Y, Kawaguchi T, Kanda H, Kasuga M. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. *Endocrinology*. 2010 Mar;151(3):971-9.
15. 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.
16. 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.
17. Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 24;14(11):21240-57.

18. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 2015 Mar;47(3):181-90.
19. Assini, JM, Mulvihill, EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24:34-40.
20. 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.
21. 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.
22. Ribeiro C, Dourado G, Cesar T. Orange juice allied to a reduced-calorie diet results in weight loss and ameliorates obesity-related biomarkers: A randomized controlled trial. *Nutrition.* 2017 Jun;38:13-19.
23. Gonçalves D, Lima C, Ferreira P, Costa P, Costa A, Figueiredo W, Cesar T. Orange juice as dietary source of antioxidants for patients with hepatitis C under antiviral therapy. *Food Nutr Res.* 2017 Mar 22;61(1):1296675.
24. Silveira JQ, Dourado GK, Cesar TB. Red-fleshed sweet orange juice improves the risk factors for metabolic syndrome. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(7):830-6.
25. Ferreira PS, Spolidorio LC, Manthey JA, Cesar TB. Citrus flavanones prevent systemic inflammation and ameliorate oxidative stress in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Food Funct.* 2016 Jun 15;7(6):2675-81.

26. Patel K, Gadewar M, Tahilyani V, Patel DK. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: a concise report. *Chin J Integr Med.* 2013 Oct;19(10):792-800.
27. Li RW, Theriault AG, Au K, Douglas TD, Casaschi A, Kurowska EM, Mukherjee R. Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. *Life Sci.* 2006 Jun 20;79(4):365-73.
28. Yi L, Ma S, Ren D. Phytochemistry and bioactivity of Citrus flavonoids: a focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities. *Phytochem Rev.* 2017 Jun; 16: 479-511.
29. Arab HH, Mohamed WR, Barakat BM, Arafa el-SA. Tangeretin attenuates cisplatin-induced renal injury in rats: Impact on the inflammatory cascade and oxidative perturbations. *Chem Biol Interact.* 2016 Oct 25;258:205-13.
30. Miyata Y, Tanaka H, Shimada A, Sato T, Ito A, Yamanouchi T, Kosano H. Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin. *Life Sci.* 2011 Mar 28;88(13-14):613-8.
31. Hirata T, Fujii M, Akita K, Yanaka N, Ogawa K, Kuroyanagi M, Hongo D. Identification and physiological evaluation of the components from citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorg Med Chem.* 2009 Jan 1;17(1):25-8.
32. Kurowska E. M., Mantney J.A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *J Agric Food Chem.*, 2004;52(10):2879-86.

33. Kurowska E .M., Manthey J. A., Casaschi A., Theriault A. G. Modulation of HepG2 cell net apolipoprotein B secretion by the citrus polymethoxyflavone, tangeretin. *Lipids*. 2004;39(2):143-51.
34. Kim MS, Hur HJ, Kwon DY, Hwang JT. Tangeretin stimulates glucose uptake via regulation of AMPK signaling pathways in C2C12 myotubes and improves glucose tolerance in high-fat diet-induced obese mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jul 6;358(1):127-34.
35. Sundaram R, Shanthi P, Sachdanandam P. Effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2014 May 15;21(6):793-9.
36. Okuyama S, Shimada N, Kaji M, Morita M, Miyoshi K, Minami S, Amakura Y, Yoshimura M, Yoshida T, Watanabe S, Nakajima M, Furukawa Y. Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, enhances brain-derived neurotrophic factor production and neurogenesis in the hippocampus following cerebral global ischemia in mice. *Neurosci Lett*. 2012 Oct 24;528(2):190-5.
37. Okuyama S, Morita M, Miyoshi K, Nishigawa Y, Kaji M, Sawamoto A, Terugo T, Toyoda N, Makihata N, Amakura Y, Yoshimura M, Nakajima M, Furukawa Y. 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia mouse model. *Neurochem Int*. 2014 May;70:30-8.
38. Manthey JA, Bendele P. Anti-inflammatory activity of an orange peel polymethoxylated flavone, 3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone, in the rat carrageenan/paw edema and mouse lipopolysaccharide-challenge assays. *J Agric Food Chem*. 2008 Oct 22;56(20):9399-403.

39. Matsumoto C, Inoue H, Tominari T, Watanabe K, Hirata M, Miyaura C, Inada M. Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, suppresses inflammatory osteoclastogenesis and alveolar bone resorption. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015;79(1):155-8.
40. Kou MC, Fu SH, Yen JH, Weng CY, Li S, Ho CT, Wu MJ. Effects of citrus flavonoids, 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone and 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, on the activities of macrophage scavenger receptors and the hepatic LDL receptor. *Food Funct.* 2013 Apr 25;4(4):602-9.
41. Duan L., Dou L.L., Yu K.Y., Guo L., Bai-Zhong C., Li P., Liu E. H. Polymethoxyflavones in peel of *Citrus reticulata* 'Chachi' and their biological activities. *Food Chem.*, 2017;234:254-61.
42. Chu DT, Malinowska E, Jura M, Kozak LP. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. *Physiol Rep.* 2017 Apr;5(7):1-20.