

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/02/2024.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Erika Tiemi Nakandakare Maia

**Efeito terapêutico do extrato da folha de
Bergamota (*Citrus bergamia*) sobre a resistência à
leptina em modelo experimental de obesidade
induzida por dieta rica em açúcar e gordura**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Patologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Camila Renata Corrêa
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron

**Botucatu
2022**

Erika Tiemi Nakandakare Maia

Efeito terapêutico do extrato das folhas de Bergamota (*Citrus bergamia*) sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Patologia.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Camila Renata Corrêa
Coorientador(a):Prof(a).Dr(a). Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Maia, Erika Tiemi Nakandakare.

Efeito terapêutico do extrato da folha de Bergamota (Citrus bergamia) sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura / Erika Tiemi Nakandakare Maia. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Camila Renata Corrêa
Coorientador: Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron
Capes: 20803001

1. Obesidade. 2. Citrus. 3. Usos Terapêuticos. 4. Extratos vegetais. 5. Leptina. 6. Dietas.

Palavras-chave: Bergamota; Obesidade; Resistência leptina.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que são meus maiores e melhores exemplos na vida, e nunca mediram esforços para garantir o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu marido, meu grande companheiro que, a cada nova jornada, sempre me concede o apoio e o suporte necessário para que eu atinja os meus objetivos, estando ao meu lado diante de qualquer dificuldade.

À minha orientadora, Camila Renata Corrêa, que além de ser uma profissional incrível, é digna de imensa admiração por sua personalidade, caráter e humildade. Como sua orientanda, aprendi que sabedoria não é apenas conhecimento, e sim um misto de experiência, compreensão, respeito e dedicação.

À minha co-orientadora, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron, que jamais me desamparou nesse período desafiador, e imensamente enriquecedor. Com sua didática, paciência e sinceridade que as tornam ainda mais sábia, além de tanto conhecimento, fez da minha caminhada mais leve.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço às Prof^{as}. Dra. Camila Renata Corrêa e Dra. Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron por todos os ensinamentos, paciência e disposição em me orientar durante toda a realização desse trabalho.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas, ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

(Carl Jung)

À equipe do Lab RedOx, meus agradecimentos à Carol Cristina Vágula de Almeida Silva, Bruno Henrique de Paula, Felipe Sarzi, Hugo Tadashi Kano, Cristina Schmitt Gregolin e demais membros da equipe por me receberem com estima e, mesmo diante das dificuldades rotineiras desse mundo da pesquisa, sempre se dispuseram em me ajudar. Em especial, agradeço ao Artur Junio Togneri Ferron e Juliana Silva Siqueira por estarem ao meu lado do início ao fim nessa caminhada, obrigada pelos ensinamentos e a amizade que conquistamos nesses dois anos!

À toda equipe da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), que viabilizou a execução desse projeto, auxiliando no biotério e dosagens necessárias.

Aos membros titulares da banca examinadora de qualificação, Dra. Renata de Azevedo Melo Luvizotto Nascimento e Dr. Igor Otavio Minatel pela participação enriquecedora nessa etapa final. Além disso, também sou grata ao Igor por toda confiança, ajuda e indicação a esse programa tão bem-conceituado.

À coordenadora do programa de pós-graduação em Patologia, Dra. Márcia Guimarães da Silva pela dedicação em manter a excelência desse programa. E à secretária deste programa, Vânia do Amaral Soler, por sua imensa disposição e colaboração a todo instante.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Patrícia Estela Monteiro Pereira, professora de pilates e docente no Centro Universitário Sudoeste Paulista (UniFSP), que me ofertou palestras para as turmas da graduação nas quais lecionava, encorajando-me ao mundo acadêmico.

À minha professora da graduação, Prof^a. Dra. Aline Carbonera Luvizon, e minha coordenadora, Prof^a. Dra. Renata Carolina Piffer, que me concederam oportunidades de palestrar, incentivando ao mestrado.

À minha amiga Tânia Maria Diniz Ianni que, durante o meu estágio na graduação, já me incentivava a seguir a área da pesquisa e a docência no ensino superior.

Aos meus amigos queridos que sempre torceram por mim nessa jornada e se alegram com as minhas árduas vitórias.

Muito obrigada!

Por vezes, sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota
d'água no mar, mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.
(Madre Teresa de Calcutá)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismo de supressão da SOCS-3 na ação da leptina.....	21
Figura 2: Comorbidades gerais associadas à obesidade.....	23
Figura 3: Mecanismo de resistência à leptina através da falha em sua sinalização.....	24
Figura 4: Folhas e fruto da bergamota (<i>Citrus bergamia</i>).....	26
Figura 5: Hipótese do trabalho.....	34
Figura 6: Gráficos dos indicadores de comorbidades.....	50
Figura 7: Gráficos de obesidade e parâmetros oxidativos e inflamatórios no TAE.....	51
Figura 8: Gráficos dos parâmetros oxidativos e inflamatórios hipotalâmicos.....	52
Figura 9: Gráficos da via de sinalização da leptina.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das rações.....	41
Tabela 2: Análises nutricionais, metabólicas e hormonais na 20 ^a semana.....	48
Tabela 3: Análises nutricionais na 30 ^a semana.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP	Proteína relacionada à <i>Agouti</i>
AMPK	Quinase ativada por adenosina monofosfato
ARC	Núcleo arqueado
ATP	Adenosina trifosfato
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i>
bAT	<i>Brown-like Adipose Tissue</i>
DNPB	Dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HOMA-IR	<i>Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance</i>
HSF	<i>High Sugar Fat</i>
IA	Índice de adiposidade
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
JAK	Janus quinase
kDa	Quilodalton
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LEPR-B	<i>Leptin receptor long isoform</i>
LPS	Lipopolissacarides
MAPK	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MC3R	Melanocortina 3
MC4R	Melanocortina 4
MDA	Malondialdeído
NF-kB	Fator de transcrição nuclear
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização mundial da saúde
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI3K	Fosfoinosítido 3-quinase
PKB	Proteína quinase B
POMC	Pró-opiomelanocortina
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTP	<i>Protein-tyrosine-phosphatase</i>
RE	Retículo Endoplasmático
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SNC	Sistema nervoso central

SOCS	<i>Supressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TA	Tecido adiposo
TAE	Tecido adiposo epididimal
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
WAT	<i>White adipose tissue</i>
α -MSH	Melanocortina α

Sumário

Capítulo 1 - Revisão de literatura	14
Visão geral da obesidade.....	15
Tecido adiposo.....	16
Leptina e a resistência na Obesidade	19
Bergamota (<i>Citrus bergamia</i>).....	25
Referências bibliográficas	28
Justificativa e Hipótese	34
Objetivo.....	35
Capítulo 2 - Artigo científico	36
Efeito terapêutico do extrato das folhas de Bergamota (<i>Citrus bergamia</i>) sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura	37
Conclusão	56

Resumo

A obesidade, decorrente do consumo de dietas ricas em açúcar e gordura, induz à inflamação e estresse oxidativo que, ao atingirem o hipotálamo, alteram a sinalização da leptina. A bergamota (*Citrus bergamia*), apresenta ação antioxidante e anti-inflamatória com benefícios comprovados em algumas doenças metabólicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito terapêutico do extrato de folhas de bergamota sobre a resistência à leptina em modelo experimental de obesidade induzida por dieta rica em açúcar e gordura. Ratos Wistar machos (n=28) foram distribuídos em 2 grupos para receberem dieta controle (C, n=14 animais) e dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=14 animais) por 20 semanas. No fim desse período, foi detectada diferença estatística nos níveis plasmáticos de leptina entre os grupos; assim, os animais foram subdivididos em 4 grupos; no grupo controle, 7 animais receberam a dieta controle com tratamento placebo (C, n=7) e outros 7 animais receberam a dieta controle com extrato das folhas de bergamota (C+B, n=7). A mesma distribuição ocorreu no grupo HSF, mantendo a dieta rica em açúcar e gordura e água com sacarose, 7 animais receberam tratamento placebo (HSF, n=7) e outros 7 animais receberam o extrato de folhas de bergamota (HSF+B, n=7). Esse procedimento foi realizado por 10 semanas. A administração desse extrato, diluído em água potável, foi realizada diariamente por gavagem, na concentração de 50 mg/Kg de peso, o placebo foi composto apenas com água potável e administrado da mesma forma. Foram avaliados parâmetros nutricionais (peso, ingestão de ração e água e calorias ingeridas), índice de adiposidade, concentração de adipocitocinas pró-inflamatórias, indicadores do estresse oxidativo no tecido adiposo e hipotálamo e comorbidades como glicemia, triglicérides, insulina, leptina e resistência insulínica pelo cálculo do HOMA-IR. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando valor de $p < 0,05$. Para comparação entre todos os grupos, as variáveis estatisticamente significativas foram submetidas ao teste *post-hoc* de Tukey. Ao término do experimento, os animais do grupo HSF + B, apresentaram melhora da inflamação e do estresse oxidativo no hipotálamo e no tecido adiposo, diminuição da glicemia, triglicérides e HOMA-IR. Os níveis de leptina plasmáticos também reduziram com o tratamento do extrato. Sendo assim, diante desses resultados, podemos concluir que o extrato das folhas de bergamota se apresenta efetivo sobre a resistência à leptina associada à obesidade.

Palavras chave: obesidade; resistência leptina; bergamota

Abstract

Obesity, resulting from the consumption of diets rich in sugar and fat, induces inflammation and oxidative stress that, upon reaching the hypothalamus, alter the functions of leptin. The suggested mechanism is the failure in the phosphorylation of this hormone, caused by the excessive production of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines, a characteristic feature of excess fat mass. Bergamot (*Citrus bergamia*), has antioxidant and anti-inflammatory action with providing benefits in some metabolic diseases. The aim of this study was to evaluate the therapeutic effect of bergamot leaf extract on leptin resistance in an experimental model of obesity induced by a diet high in sugar and fat. Male Wistar rats (n=28) were divided into 2 groups to receive a control diet (C, n=14 animals) and a high sugar and fat diet (HSF, n=14 animals) for 20 weeks. At the end of this period, a statistical difference was detected in plasma leptin levels between the groups; thus, the animals were subdivided again into 4 groups; in the control group, 7 animals received the control diet with placebo treatment (C, n=7) and another 7 animals received the control diet with bergamot leaf extract (C+B, n=7). The same distribution occurred in the HSF group, maintaining a diet rich in sugar and water with sucrose, 7 animals received placebo treatment (HSF, n=7) and another 7 animals received bergamot leaf extract (HSF+B, n=7). This procedure was performed for 10 weeks. The administration of this extract, diluted in drinking water, was performed daily by gavage at a concentration of 50 mg/Kg of weight. The placebo was composed only with drinking water and administered in the same way. Nutritional parameters (weight, feed and water intake and calories ingested), adiposity index and concentration of pro-inflammatory adipocytokines and indicators of oxidative stress in adipose tissue and hypothalamus and comorbidities such as blood glucose, triglycerides, insulin, leptin and insulin resistance were evaluated by calculating the HOMA-IR. Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, considering a p-value < 0.05. For comparison between all groups, the statistically significant variables were submitted to Tukey's post-hoc test. At the end of the experiment, the animals that received the treatment with bergamot leaf extract, showed improvement in inflammation and oxidative stress in the hypothalamus and adipose tissue. In the metabolic and nutritional parameters, a decrease in blood glucose, triglycerides and HOMA-IR can also be observed. Plasma leptin levels also reduced with extract treatment. Thus, given these results, we can conclude that the extract of bergamot leaves is effective on leptin resistance associated with obesity.

Keywords: obesity; leptin resistance; bergamot

Capítulo 1 - Revisão de literatura

Visão geral da obesidade

A obesidade, doença que se tornou pandêmica nas últimas décadas, é definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal que pode acarretar prejuízos à saúde (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) identifica o quadro de obesidade baseado no índice de massa corporal (IMC), calculado através da relação entre o peso corpóreo (Kg) e a estatura (m^2) do indivíduo. Os resultados iguais ou superiores a $30 \text{ Kg}/m^2$ são classificados como obesos e subdivididos em diferentes estágios, os quais são caracterizados como grau I (moderado excesso de peso, IMC entre $30 - 34,9 \text{ Kg}/m^2$), grau II (obesidade leve ou moderada, IMC entre $35 - 39,9 \text{ Kg}/m^2$) e grau III (obesidade mórbida, o IMC excede $40 \text{ Kg}/m^2$) (2). No cenário mundial, a estimativa é de que 2,3 bilhões de pessoas sejam acima do peso, e 700 milhões sejam obesas em 2025 (3). O crescimento exponencial dessa doença se deve a modificação no estilo de vida decorrente da industrialização e urbanização, especialmente nas sociedades ocidentais acarretando sobrecarga nos sistemas de saúde (4).

Dentre os fatores etiológicos da obesidade estão condições psicossociais, ecológicos, socioeconômicos, genéticos, hormonais e culturais (5). No entanto, a principal causa fundamental envolve o desequilíbrio entre a energia ingerida e o gasto energético, condição que favorece o aumento dos estoques de gordura no tecido adiposo desencadeando ampliação da massa adiposa, conseqüentemente, a obesidade (6). Diversos mecanismos têm sido apontados como consequência negativa da expansão da gordura corporal, dentre eles a inflamação (1) e o estresse oxidativo (5). Esses dois fenômenos são considerados pilares no desenvolvimento das complicações e comorbidades, que acompanham essa doença. Sendo assim, compreender as características e funções do tecido adiposo é de extrema relevância para que em um futuro próximo, intervenções possam ser

empregadas para um possível retardamento ou prevenção nas manifestações de suas complicações e comorbidades.

Tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) é um órgão complexo que exerce diversas funções no âmbito celular, tecidual e sistêmico. É constituído basicamente por adipócitos, pré-adipócitos, células do sistema imunológico, fibroblastos e células do endotélio vascular (7). Em mamíferos, esse tecido é subdividido em três tipos que são classificados de acordo com a sua coloração, assim temos o tecido adiposo branco (*White adipose tissue – WAT*), marrom (*Brown Adipose Tissue - BAT*) e bege (*Brown-like Adipose Tissue – bAT*) (8).

O WAT representa a maior parte da massa tecidual adiposa nos seres humanos, encontrado em áreas viscerais, subcutâneas e regiões gluteofemorais, com importante função no armazenamento de triglicérides e mobilização de energia (9). Outro papel essencial atribuído a ele, é referente a sua atividade endócrina, por secretar diversas substâncias conhecidas como adipocinas; dentre elas estão a adiponectina, leptina, glicocorticoides, angiotensina, resistina, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6, ácidos graxos livres, entre outras (10). Dessa forma, a partir da ação dessas substâncias produzidas por ele, esse tecido possui a capacidade de participar da função fisiológica de diversos processos como a regulação do apetite, manutenção do peso corpóreo, no sistema de coagulação, angiogênese, fibrinólise, imunidade, controle do tônus vascular e metabolismo de lipídios (11).

O tecido adiposo marrom dispõe de 4,3% da massa adiposa total, sendo predominantemente localizado em regiões supraclaviculares e interescapular (12). Diferente do WAT, os adipócitos marrons são mais vascularizados e inervados, com ação voltada à termogênese, por serem

ricos em mitocôndrias (13). Essas organelas, através da proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein* - UCP1) oxidam lipídios para gerar calor, tornando esse tecido com função oxidativa, possibilitando o aumento da taxa metabólica e do gasto energético (7).

Recentemente, tem-se estudado um novo tipo de tecido adiposo conhecido como tecido adiposo bege e sua capacidade de transdiferenciação ou "*brown conversion*", o qual apresenta características intermediárias entre o WAT e BAT, com comportamento semelhante ao WAT referente ao armazenamento de excesso de energia, porém com ação termogênica quando há o aumento da função mitocondrial e da expressão de UCP1 (7). Sendo assim, sua característica varia de acordo com as condições metabólicas, pois mesmo apresentando baixa quantidade de UCP1, se comparado com o BAT, são altamente reativas sob estimulação (1), tornando-se um alvo terapêutico para obesidade e doenças metabólicas. O bAT representa 3,1% da gordura corporal total em homens adultos e 7,5% em mulheres (14). Pesquisadores observaram adipócitos característicos de tecido adiposo bege, na região supraclavicular, no entanto, ainda são escassos os estudos sobre essa coloração de tecido. Evidências apontam que a exposição ao frio pode estimular o aumento da expressão gênica de UCP1 na gordura subcutânea, favorecendo a transição de tecido branco para bege (15).

Com essa explanação sobre a função e as características dos tipos de tecido adiposo, podemos atribuir que, em condições fisiológicas, é um órgão complexo e fascinante com importante papel no funcionamento fisiológico. A literatura descreve que diante de um desequilíbrio onde ocorre aumento da ingestão calórica e a diminuição do gasto energético, o tecido adiposo se expande pelos mecanismos de hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Essa expansão torna esse órgão disfuncionante trazendo diversas complicações, pois é o gatilho inicial para o desenvolvimento fisiopatológico dos distúrbios relacionados à obesidade (16,17).

Em um cenário de disfunção do tecido adiposo, característico da obesidade, há alterações no metabolismo de lipídios, redução do fluxo sanguíneo tecidual, menor expressão de genes angiogênicos e baixa densidade capilar acarretando a falta de suprimento de oxigênio com possível necrose tecidual (18). Além disso, principalmente devido à hipertrofia, ocorre o aumento da produção de alguns hormônios, citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, implicando em um processo inflamatório e de desequilíbrio do sistema redox, os quais se tornam sistêmicos com a cronicidade desse processo (19). No entanto, estudos relatam que a expansão do tecido adiposo por hiperplasia não necessariamente induz o aumento do risco de doenças metabólicas e cardiovasculares, sendo a hipertrofia adipocitária um fator mais relevante para a fisiopatologia dessas doenças associadas à obesidade, já que promovem uma sobrecarga nos adipócitos. Esse fato possivelmente explica a proporção sutil de indivíduos obesos que não apresentam comorbidades e síndrome metabólica (18,19).

Pesquisas apontam que além da hipertrofia e hiperplasia, o alto consumo de ácidos graxos saturados, também pode contribuir para disfunção do tecido adiposo e manifestação de comorbidades. O mecanismo envolvido é que esse tipo de gordura pode ativar os receptores Toll-like (TLRs) por apresentarem a mesma composição transmembrana das bactérias, lipopolissacarídeos (LPS) (20). Esses receptores são expressos em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e adipócitos, e quando ativados, acionam a resposta imune inata produzindo citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, potencializando o quadro inflamatório e o desequilíbrio redox (21). A ativação desses mecanismos ocorre através do recrutamento de quinases associadas ao receptor de IL-1 β para ativar o receptor de TNF, que conseqüentemente promove ativação do complexo IKK e, assim, ocorre a fosforilação do I κ B e a sua degradação resulta no fator de transcrição nuclear (NF- κ B) que, no núcleo, induz a

liberação de citocinas pró-inflamatórias. Nesse sentido, podemos definir que a inflamação oriunda da obesidade desencadeada pelos fatores descritos acima, é uma metainflamação, uma vez que é desencadeada por fatores metabólicos e não por agentes patogênicos (22). Acompanhado da metainflamação, outra adipocina que sofre alteração em sua secreção decorrente da expansão do TA é a leptina, conhecida como o hormônio que atua no controle da fome (23).

Leptina e a resistência na Obesidade

A leptina (do grego *leptos* = magro) é uma proteína constituída de 167 resíduos de aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 16 kDa, tendo seu gene localizado no cromossomo 7q31 em seres humanos. Trata-se de uma das primeiras adipocinas descobertas através de pesquisas científicas realizadas no laboratório de Jeffrey Friedman em 1994, na universidade Rockefeller em Nova Iorque (24).

Esse hormônio está envolvido em vários processos fisiológicos, com importante papel no metabolismo de glicose e gorduras, no sistema imunológico, reprodutor, cardiovascular e inclusive no controle do sistema hematopoiético, porém sua atribuição mais relevante está na regulação do consumo de alimentos e na homeostasia energética (25).

A leptina é produzida principalmente pelos adipócitos e sua maior liberação ocorre durante a noite e nas primeiras horas do dia, com tempo de meia vida plasmática de 30 minutos. Sua secreção é estimulada pela insulina e outros peptídeos gástricos como, por exemplo, a grelina, logo após a ingestão alimentar (26). Ao ser produzida no tecido adiposo, a leptina é disponibilizada na corrente sanguínea e sua ação, em mamíferos, ocorre principalmente no hipotálamo, sistema nervoso central (SNC). Ao atravessar a barreira hematoencefálica, a leptina se liga aos receptores específicos de cadeia longa, denominados ObRb ou LEPR-B (*Leptin*

Receptor Long Isoform), os únicos que possuem todos os domínios de proteínas necessários para a sinalização (27,28). Após a ligação da leptina ao seu domínio extracelular, há ativação da JAK2 (Janus quinase-2), que fosforila outros resíduos de tirosina (Tyr985, Tyr 1077 e Tyr1138), assim ativando *signal transducers and activators of transcription* (STAT3), o qual se transloca para o núcleo e inicia a transcrição de genes alvo, ativando os neurônios pró-opiomelanocortina (POMC) que inibem a atividade orexígena de neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada à *Agouti* (AgRP), resultando na inibição do apetite e aumento do gasto energético (29). Ademais, a ativação de POMC induz a expressão e secreção de peptídeos derivados do hormônio estimulador de melanócitos-alfa (α -MSH), os quais são liberados em terminais do axônio e se ligam aos receptores de melanocortina 3 e 4 (MC3R e MC4R), que também modulam o gasto energético e o consumo alimentar, respectivamente (30). Além disso, a partir da translocação nuclear de STAT3, também ocorre a transcrição do *supressor of cytokine signaling 3* (SOCS-3) que inibe os receptores LEPR-B, atuando como um sinalizador negativo para ação da leptina, controlando a ação desse hormônio (Figura 1) (26,31). Ainda nesse feedback negativo, há participação de outra molécula com importante papel no metabolismo da leptina e insulina, a proteína tirosina fosfatase 1B (*Protein tyrosine phosphatase 1B* - PTP1B) (24), estando envolvida em uma série de atividades enzimáticas transcricionais e translacionais, e pode ser alterada por processos de oxidação e fosforilação. Essa proteína permanece restrita à região citoplasmática, próxima ao retículo endoplasmático, por conter segmentos C-terminal hidrofóbicos (32).

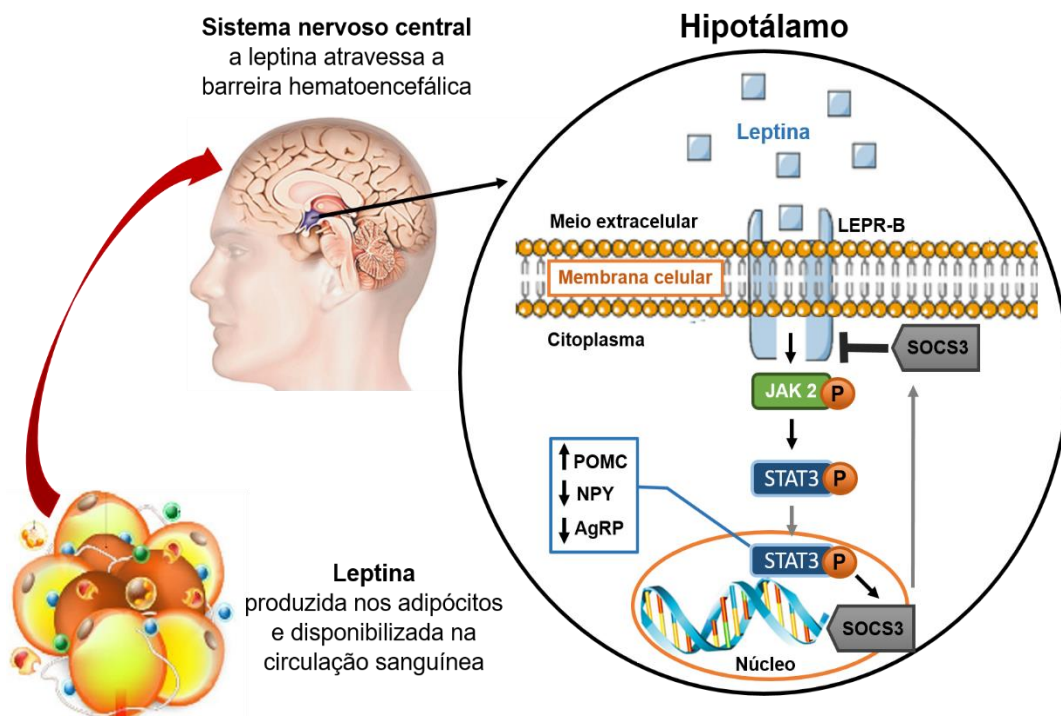


Figura 1. Mecanismo fisiológico da SOCS-3 no controle da ação da leptina. Ao ser produzida pelos adipócitos e disponibilizada na circulação sanguínea, a leptina atravessa a barreira hematoencefálica e age no hipotálamo, em receptores LEPR-B, ativando a JAK2 que fosforila resíduos de tirosina e recruta STAT3, o qual se transloca para o núcleo e inicia a transcrição de genes anorexígenos e SOCS3, que exerce ação inibitória ao receptor de leptina, controlando a ação desse hormônio.

No ambiente extracelular, o MC3R é expresso na placenta, intestino, timo, TA e principalmente no SNC. A literatura sugere que o MC3R expresso pelo TA tenha influência no aumento do gasto energético e na lipólise mediados pelo α -MSH, relata-se também sobre a evidência de seu efeito auto-regulatório por ser expresso nos neurônios POMC e NYP/AGRP (33). O MC4R é encontrado sobretudo no hipotálamo, sendo ativado pelo α -MSH, e atua reduzindo o consumo alimentar. Mutações nesse receptor representam o distúrbio genético mais comum de obesidade humana de início precoce, e sua inativação resulta em obesidade associada a hiperfagia, hiperinsulinemia e hiperglicemia (27).

Para mais, há evidências sobre a ação da leptina na regulação

energética via estimulação da perda de energia sob forma de calor, induzida pelo sistema nervoso simpático ou tireoide, por meio da expressão de proteínas desacopladoras da mitocôndria (UCP-1), do tecido adiposo branco (UCP-2) e/ou do músculo (UCP-3), as quais favorecem a termogênese, desacoplando a cadeia transportadora de elétrons da síntese de adenosina trifosfato (ATP) (34).

As concentrações de leptina são correspondentes ao volume de células adiposas, e aumentam proporcionalmente ao percentual de gordura corporal. Adicionalmente, fatores como a idade, o gênero, a rotina de exercício físico, a ingestão calórica e o Índice de Massa Corporal (IMC) também interferem nas concentrações de leptina (26). Sendo assim, visto que obesos apresentam maior concentração plasmática desse hormônio, deveriam apresentar maior controle sobre os mecanismos de fome e saciedade. No entanto, tal ação esperada não acontece e, embora esse mecanismo não tenha sido totalmente elucidado, apontam-se alguns fatores que colaboram para esse cenário (35), como a ausência de interação entre a leptina e seus receptores-alvo por deficiência no seu transporte através da barreira hematoencefálica, dessensibilização do receptor por exposição crônica ao aumento de leptina plasmática ou uma falha em sua sinalização devido à superexpressão de reguladores inibitórios, levando a uma exposição crônica de hiperleptinemia que caracteriza o quadro de resistência à leptina (27,36).

Em condições de obesidade, induzida por dieta rica em açúcar e gordura, os mecanismos mais prováveis relacionados a essa resistência hormonal são a inflamação e o estresse oxidativo. A princípio, o consumo de dieta rica em gordura contribui amplamente para esse cenário, já que os ácidos graxos saturados presentes nessa dieta são capazes de causar estresse do retículo endoplasmático (RE) por ativação de TLR (37) estimulando o fator nuclear kappa B (NF- κ B) a produzir citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, o RE é considerado uma estrutura chave por

regular a síntese de proteínas, metabolismo de lipídeos, gliconeogênese e sinalização de cálcio, assim tendo um impacto direto na obesidade (38,39). O acúmulo de colesterol no RE, advindo dessa dieta, possivelmente afeta as proteínas transmembranas da célula, permitindo que as citocinas pró-inflamatórias presentes no hipotálamo amplifiquem a inflamação intracelular que, juntamente com o desequilíbrio redox, contribuem para o estresse do RE e alteração das funções dessa organela, fator este que induz à superexpressão de SOCS-3 e inibição da sinalização do receptor de leptina (40,41).

Com o aumento do peso, o estado inflamatório e pró-oxidante se encontram ativos e estão constantemente se retroalimentando. À vista disso, estudos têm relacionado a obesidade com o estresse do RE que também se relaciona com as outras complicações (Figura 2), como a resistência à leptina e insulina, inflamação crônica de baixo grau e desequilíbrio energético, colaborando para o agravamento da própria obesidade (41,42).

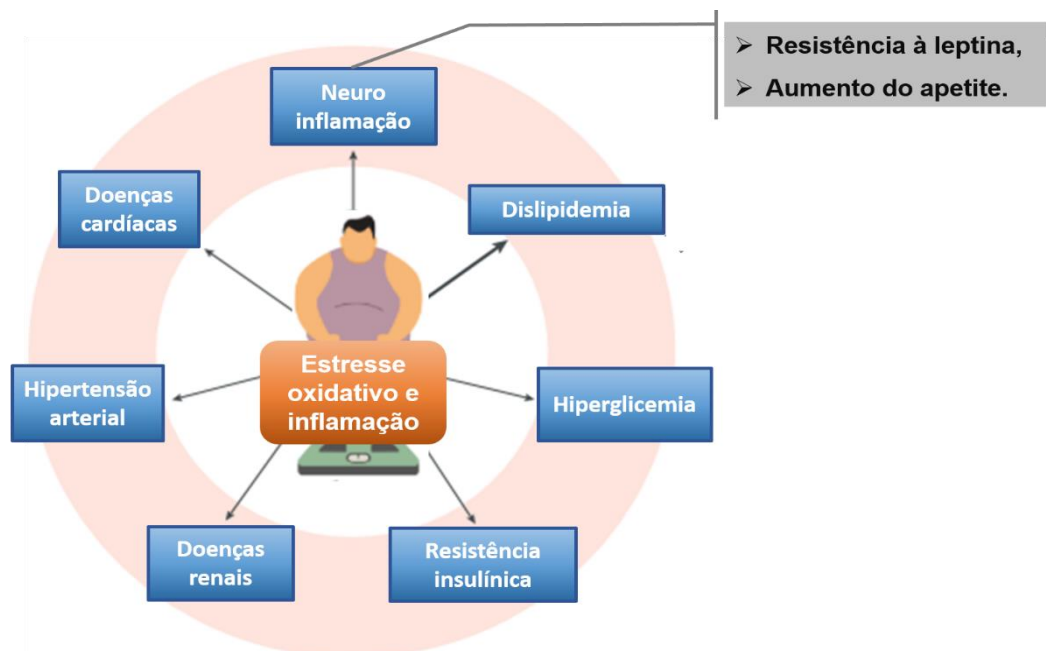


Figura 2. Comorbidades gerais associadas à obesidade, advindos do cenário inflamatório e pró-oxidativo, com ênfase na neuroinflamação que está associada ao quadro de resistência à leptina e conseqüente aumento do apetite.

Para consolidar esse mecanismo, estudos demonstraram que há aumento da expressão de SOCS3 no núcleo arqueado de animais submetidos à dieta rica em gordura, e a sua superexpressão induz a resistência à leptina, obesidade e intolerância à glicose. Em contrapartida, a deleção dessa proteína em neurônios combate a obesidade induzida por dieta (26,27). O estresse do RE e o aumento sistêmico de citocinas pró-inflamatórias também promovem a expressão de *protein-tyrosine-phosphatase 1* (PTP1)-B no hipotálamo, que inibe a sinalização pela leptina e insulina por desfosforilar moléculas sinalizadoras, como a JAK2 (Figura 3). Sendo assim, baixos níveis da proteína PTP1-B favorecem a atividade relacionada à leptina e melhora tal sensibilidade hipotalâmica, combatendo o quadro de obesidade induzida por dieta (43,44).

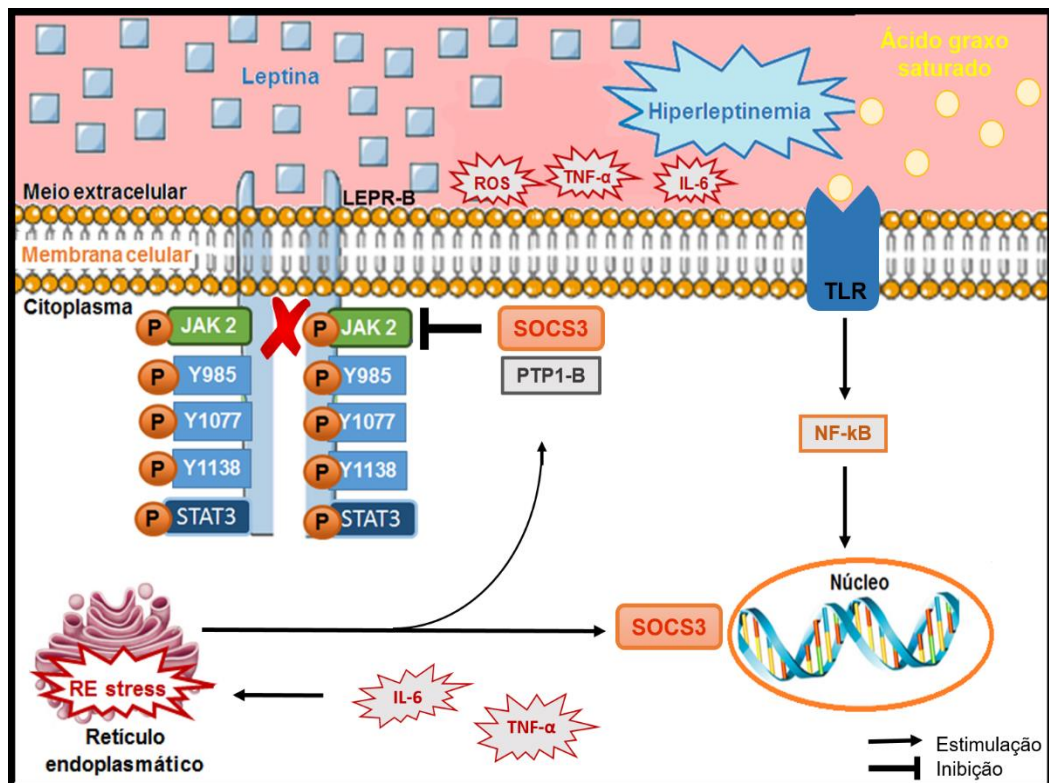


Figura 3. Mecanismo de resistência à leptina através da falha em sua sinalização. Na obesidade, os ácidos graxos saturados presentes na dieta hiperlipídica ativam TLR, que estimulam NF-kB a produzir citocinas pró-inflamatórias, causando estresse do RE. Por sua vez, esse estresse promove a superexpressão de SOCS3 e PTP1-B, ambos reguladores negativos de JAK2, bloqueando a sinalização do receptor de leptina, assim resultando em hiperleptinemia.

Outro fator relacionado a essa condição é a sinalização de IL-6, uma glicoproteína importante ao sistema imunológico que atua na diferenciação celular em resposta às inflamações sistêmicas, afetando o metabolismo lipídico, resistência insulínica e atividade mitocondrial, interferindo também no sistema neuroendócrino (45). Com a sinalização de IL-6, há ativação de JAK e, conseqüentemente, de diversas vias de sinalização intracelular, visto que a estimulação da via IL-6/JAK/STAT3 influencia na transcrição de genes envolvidos na proliferação, diferenciação, recrutamento e sobrevivência, denota-se essencial o papel da SOCS3 na modulação dessa via. Ainda, após a ligação de IL-6 com seus receptores, há ativação da via JAK/MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) que ativa fatores de transcrição envolvidos no aumento da síntese de proteínas. Além disso, a IL-6 induz a ativação da via Akt/PKB (proteína quinase B), através da cascata de fosforilação envolvendo PI3K (Fosfoinosítideo 3-quinase), capaz de modular a expressão de genes que atuam na sobrevivência celular, assim associando a sinalização de IL-6 com diversas doenças inflamatórias (46).

Na tentativa de minimizar esses efeitos negativos da inflamação e do estresse oxidativo na obesidade, o uso de compostos bioativos com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias tem sido cada vez mais investigada (47,48).

Bergamota (*Citrus bergamia*)

A bergamota (Figura 4) é um citrus encontrado no Sul da Itália, na região da Calábria, e também no Brasil na região de Cordeirópolis, São Paulo. Assim como outros citrus, a bergamota contém óleos essenciais, pectinas, pigmentos, ceras, cumarinas, psoralenos e polifenóis. Seu fruto é utilizado principalmente para a extração dos óleos essenciais voltado à indústria cosmética, enquanto que seu suco é pouco consumido por

apresentar sabor amargo (49). Porém, nos últimos anos, seu significativo teor de flavonoides tem despertado a atenção de pesquisadores por apresentar potencial atividade antioxidante e anti-inflamatória (50).



Figura 4. Folhas e fruto da bergamota (*Citrus bergamia*).

Fonte: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Cruz das Almas - Bahia, Brasil.

Flavonoides são compostos polifenólicos amplamente presentes no reino vegetal, sendo uma classe de metabólitos secundários que desempenham importantes funções para a sobrevivência da planta, como atrair polinizadores, combater estresses e infecções ambientais, além de regular o crescimento celular (51). A estrutura dos flavonoides é composta por dois anéis benzênicos ligados por um anel heterocíclico contendo oxigênio. Esses compostos podem ser categorizados em diferentes subclasses dependendo das ligações químicas realizadas em sua estrutura, classificando-as como flavanois, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonois e antocianidinas. No geral, os flavonoides são metabolizados no intestino e no fígado, mas a sua biodisponibilidade varia de acordo com cada subclasse, oferecendo diversos efeitos benéficos para a saúde humana (52).

À vista disso, estudos relatam sobre efeitos hipolipêmico e hipoglicêmico da bergamota (49,53) mostrando-se eficaz no tratamento dos

parâmetros que compõem a síndrome metabólica. Esse benefício é atribuído ao perfil polifenólico do suco dessa fruta, contendo uma série de flavanonas e flavonas que não são encontradas na laranja e no limão. Sendo assim, dentre os polifenóis mais importantes, estão as flavanonas, como a naringina, neohesperidina, neoeriocitrina e glicosídeo de eriodictiol; e as flavonas, apigenina, luteolina, crisoeriol e glicosídeos de diosmetina (54). Além destes, também foram identificados derivados de flavonoides diglicosilados como a melitidina e brutieridina, cuja estrutura química se assemelha a das estatinas, assim comprovando que a bergamota difere dos demais citrus tanto pela sua composição quanto pelo elevado teor desses compostos (49,55).

Outros trabalhos experimentais também observaram efeitos benéficos do suco do fruto de bergamota sobre parâmetros metabólicos em animais submetidos a dietas obesogênicas, dentre os quais, prevenção da hiperlipidemia, sugerindo que esse consumo promove a redução do risco de doenças cardiovasculares (56). Ao mesmo passo, Musolino e colaboradores demonstraram uma melhora da resistência periférica à insulina, juntamente com uma melhora da função hepática em camundongos submetidos à dieta ocidental (57). No entanto, estudos analíticos mostram que para algumas plantas, como as que produzem bagas, a composição fenólica da folha é semelhante a do fruto ou até mesmo mais rica, apresentando potencial utilização como fonte alternativa para o desenvolvimento de suplementos alimentares, nutracêuticos ou alimentos funcionais (58,59). Baseado nisso, um estudo caracterizando os compostos bioativos presentes no extrato de folhas e fruto da bergamota, mostrou que as folhas possuem uma quantidade maior de polifenóis além de apresentarem uma maior capacidade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* (54). Sendo assim, uma vez que não há trabalhos *in vivo* envolvendo a ação do extrato das folhas da bergamota no tratamento da inflamação e do estresse oxidativo em obesidade e comorbidades, uma investigação

torna-se relevante. Resultados positivos podem vislumbrar um produto sustentável, com ação farmacológica para sanar danos encontrados na obesidade impedindo complicações.

Referências bibliográficas

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766–81.
2. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* [Internet]. 2019;92:6–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
3. Mapa da Obesidade - Abeso [Internet]. [cited 2022 Feb 10]. Available from: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>
4. Kopp W. How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. Vol. 12, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2019. p. 2221–36.
5. Di Domenico M, Pinto F, Quagliuolo L, Contaldo M, Settembre G, Romano A, et al. The Role of Oxidative Stress and Hormones in Controlling Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(August):1–13.
6. Tomiyama AJ. Stress and Obesity. *Annu Rev Psychol*. 2019;70:703–18.
7. Raposo HF. Adipose tissue : its colors and versatility. 2020;45(1):1–12.
8. Steven BH, Thomas AW. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity.pdf. 2017.
9. Priest C, Tontonoz P. Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. *Nat Metab* [Internet]. 2019;1(12):1177–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-019-0145-5>

10. Csige I, Ujvárosy D, Szabó Z, Lorincz I, Paragh G, Harangi M, et al. The Impact of Obesity on the Cardiovascular System. *J Diabetes Res*. 2018;2018:12.
11. Grigoras A, Amalinei C, Balan RA, Giusca SE, Caruntu ID. Perivascular adipose tissue in cardiovascular diseases-an update. Vol. 22, *Anatolian Journal of Cardiology*. 2019. p. 219–31.
12. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(1):24–36.
13. Perdikari A, Leparc GG, Balaz M, Pires ND, Lldell ME, Sun W, et al. *BATLAS Deconvoluting Brown Adipose Tissue.pdf*. 2018.
14. Halpern B, Mancini MC, Halpern A. Brown adipose tissue: What have we learned since its recent identification in human adults. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(9):889–99.
15. Suchacki KJ, Stimson RH. Nutritional regulation of human brown adipose tissue. Vol. 13, *Nutrients*. 2021.
16. White U, Ravussin E. Dynamics of adipose tissue turnover in human metabolic health and disease. Vol. 62, *Diabetologia*. 2019. p. 17–23.
17. Amorim RG, Guedes G da S, Vasconcelos SM de L, Santos JC de F. Kidney disease in diabetes mellitus: Cross-linking between hyperglycemia, redox imbalance and inflammation. *Arq Bras Cardiol*. 2019;112(5):577–87.
18. Goossens GH, Blaak EE. Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: A matter of oxygen? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6(APR):1–5.
19. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health | Enhanced Reader [Internet]. 2019. Available from: moz-extension://3dca473d-faab-e94b-8490-a5e8eae653b2/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fwww.nature.com%2Farticles%2Fs41580-018-0093-z.pdf
20. Jayarathne S, Koboziev I, Park OH, Oldewage-Theron W, Shen CL, Moustaid-Moussa N. Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Properties of Food Bioactive Components: Effects on Adipose Tissue. *Prev Nutr Food Sci*. 2017;22(4):251–62.

21. Kumar V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 2019;332(March):16–30.
22. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell [Internet].* 2012;148(5):852–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>
23. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in inflammation and vice versa. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences.* 2020. p. 1–24.
24. Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: Underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2019;12:191–8.
25. Trinh T, Broxmeyer HE. Role for Leptin and Leptin Receptors in Stem Cells During Health and Diseases.pdf. 2021. p. 511–22.
26. Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol [Internet].* 2017;13(6):338–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.222>
27. Engin A. Diet-Induced Obesity and the Mechanism of Leptin Resistance. *Med Biol [Internet].* 2017;960. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48382-5>
28. Shin MK, Eraso CC, Mu YP, Gu C, Yeung BHY, Kim LJ, et al. Leptin Induces Hypertension Acting on Transient Receptor Potential Melastatin 7 Channel in the Carotid Body. *Circ Res.* 2019;125(11):989–1002.
29. Pan W, Allison MB, Sabatini P, Rupp A, Adams J, Patterson C, et al. Transcriptional and physiological roles for STAT proteins in leptin action. *Mol Metab [Internet].* 2019;22(January):121–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.007>
30. Dragano NRV, Haddad-Tovolli R, Velloso LA. Leptin, Neuroinflammation and Obesity. *Front Horm Res.* 2017;48:84–96.
31. Friedman JM. Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nat Metab [Internet].* 2019;1(8):754–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-019-0095-y>

32. Feldhammer M, Uetani N, Miranda-Saavedra D, Tremblay ML. Ptp1b: A simple enzyme for a complex world. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(5):430–45.
33. Baldini G, Phelan KD. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. 2019;
34. Nikanorova AA, Barashkov NA, Pshennikova VG, Nakhodkin SS, Gotovtsev NN, Sazonov NN, et al. The Role of Nonshivering Thermogenesis Genes on Leptin Levels Regulation in Residents of the Coldest Region of Siberia.pdf. 2021.
35. Liu H, Du T, Li C, Yang G. STAT3 phosphorylation in central leptin resistance. Vol. 18, *Nutrition and Metabolism*. 2021.
36. Zhao S, Kusminski CM, Elmquist JK, Scherer PE. Leptin: Less is more. *Diabetes*. 2020;69(5):823–9.
37. Henrique P, Alves R, Junio A, Ferron T, Costa MR, Hasimoto FK, et al. Relationship between Innate Immune Response Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) and the Pathophysiological Process of Obesity Cardiomyopathy. 2021;4(1):91–9.
38. Lemmer IL, Willemsen N, Hilal N, Bartelt A. A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. Vol. 47, *Molecular Metabolism*. 2021.
39. Mullins CA, Gannaban RB, Khan MS, Shah H, Siddik MAB, Hegde VK, et al. Neural underpinnings of obesity: The role of oxidative stress and inflammation in the brain. *Antioxidants*. 2020;9(10):1–21.
40. Zieba DA, Biernat W, Barć J. Roles of leptin and resistin in metabolism, reproduction, and leptin resistance. *Domest Anim Endocrinol*. 2020;73.
41. Ye Z, Liu G, Guo J, Su Z. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress as a key mediator of obesity-induced leptin resistance. Vol. 19, *Obesity Reviews*. 2018. p. 770–85.
42. Gong T, Torres DJ, Berry MJ, Pitts MW. Free Radical Biology and Medicine Hypothalamic redox balance and leptin signaling - Emerging role of selenoproteins. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2018;127(February):172–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.038>

43. Sufyan M, Benchoula K, Serpell CJ, Eng W. AgRP / NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2022;915(October 2021):174611. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174611>
44. Aberdein N, Dambrino RJ, Carmo JM, Wang Z, Mitchell LE, Drummond HA, et al. Role of PTP1B in POMC neurons during chronic high-fat diet : sex differences in regulation of liver lipids and glucose tolerance. 2022;(11):478–88.
45. Kern L, Mittenbuhler MJ, Vesting AJ, Ostermann AL, Wunderlich CM, Wunderlich FT. Obesity-Induced TNF and IL-6 Signaling_ The Missing Link between Obesity and Inflammation.pdf. 2019.
46. Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncol*. 2020;98(3):131–7.
47. Francisqueti FV, Minatel IO, Ferron AJT, Bazan SGZ, Silva V dos S, Garcia JL, et al. Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet. *Nutrients*. 2017;9(12).
48. Francisqueti FV, Ferron AJT, Hasimoto FK, Alves PHR, Garcia JL, dos Santos KC, et al. Gamma oryzanol treats obesity-induced kidney injuries by modulating the adiponectin receptor 2/PPAR- α axis. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
49. Ballistreri G, Amenta M, Fabroni S, Consoli V, Grosso S, Vanella L, et al. Evaluation of lipid and cholesterol-lowering effect of bioflavonoids from bergamot extract. 2021. p. 5378–83.
50. Ferlazzo N, Cirimi S, Calapai G, Ventura-Spagnolo E, Gangemi S, Navarra M. Anti-inflammatory activity of Citrus bergamia derivatives: Where do we stand? Vol. 21, *Molecules*. 2016.
51. Górnaiak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids.pdf. 2019. p. 241–72.
52. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids.pdf. 2019.
53. Musolino V, Gliozzi M, Nucera S, Carresi C, Maiuolo J, Mollace R, et al. The effect of bergamot polyphenolic fraction on lipid transfer protein system and vascular oxidative stress in a rat model of hyperlipemia.

2019. p. 1–8.

54. Baron G, Altomare A, Mol M, Garcia JL, Correa C, Raucci A, et al. Analytical profile and antioxidant and anti-inflammatory activities of the enriched polyphenol fractions isolated from bergamot fruit and leave. *Antioxidants*. 2021;10(2):1–27.
55. Interdipartimentale C. Protective Effects of Bergamot (Citrus bergamia Risso & Poiteau) Juice in Rats Fed with High-Fat Diet Authors. 2019;
56. Rondanelli M, Peroni G, Riva A, Petrangolini G, Allegrini P, Fazia T, et al. Bergamot phytosome improved visceral fat and plasma lipid profiles in overweight and obese class I subject with mild hypercholesterolemia: A randomized placebo controlled trial. *Phyther Res*. 2020;(October):1–12.
57. Musolino V, Gliozzi M, Scarano F, Bosco F, Scicchitano M, Nucera S, et al. Bergamot Polyphenols Improve Dyslipidemia and Pathophysiological Features in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–14.
58. Carolo dos Santos K, Santiloni Cury S, Costa Rodrigues Ferraz AP, Corrente JE, Mariani Gonçalves B, De Araújo Machado LH, et al. Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018(4):1–9.
59. Formisano C, Rigano D, Lopatriello A, Sirignano C, Ramaschi G, Arnoldi L, et al. Detailed Phytochemical Characterization of Bergamot Polyphenolic Fraction (BPF) by UPLC-DAD-MS and LC-NMR. *J Agric Food Chem*. 2019;67(11):3159–67.