



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

**Taynara Aparecida Vieira**

**Remodelamento cardíaco em modelo experimental de  
obesidade: Efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de  
bergamota**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Camila Renata Côrrea Camacho  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lilian Cristina Pereira  
Coorientador: Prof. Dr. Artur Junio Togneri Ferron

**Botucatu  
2023**

Taynara Aparecida Vieira

Remodelamento cardíaco em modelo experimental de  
obesidade: Efeito anti-inflamatório do extrato das folhas  
de bergamota

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Renata Côrrea Camacho  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Cristina Pereira  
Coorientador: Prof. Dr. Artur Junio Togneri Ferron

Botucatu  
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vieira, Taynara Aparecida.

Remodelamento cardíaco em modelo experimental de  
obesidade : efeito anti-inflamatório do extrato das folhas  
de bergamota / Taynara Aparecida Vieira. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de  
Botucatu

Orientador: Camila Renata Corrêa Camacho

Coorientador: Lilian Cristiana Pereira

Coorientador: Artur Junio Togneri Ferron

Capes: 40105008

1. Citrus. 2. Colágeno. 3. Inflamação. 4. Obesidade. 5.  
Remodelação ventricular.

Palavras-chave: Bergamota; Colágeno; Inflamação; Obesidade  
; Remodelamento cardíaco.

**Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, Lázaro e Disney, que são meus maiores exemplos de vida. Hoje eu sei que tudo que fizeram por mim sempre foi para o meu bem. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me ajudarem a conquistar os meus objetivos e sonhos.

À minha querida irmã Tatiane, ao meu cunhado Wilson e aos meus sobrinhos Kauã e Bianca, por sempre estarem presentes e por vibrarem pelas minhas conquistas.

Ao meu noivo, Mateus, pelo apoio, carinho, paciência e principalmente compreensão. Obrigada pela fé que sempre depositou em mim e por acreditar que sou capaz.

À minha orientadora e coorientadores, que desde o começo sempre estiveram ao meu lado ajudando, apoiando e me fazendo crescer.

**“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado”**

**Roberto Shinyashiki**

**Agradecimientos**

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Renata Côrrea, que me acolheu com todo carinho em sua equipe. Obrigada por todos os ensinamentos, pelas oportunidades e disposição em me orientar durante toda a realização desse trabalho.

Aos meus coorientadores, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Cristina Pereira e Prof. Dr. Artur Junio Togneri Ferron, que me ensinaram da teoria à prática. Obrigada por todo conhecimento científico, por acreditarem em mim e, por me apoiarem e incentivarem a lutar pelos meus objetivos.

À equipe do Lab RedOx, meus agradecimentos à Juliana Silva Siqueira, Erika Tiemi Nakandakare Maia, Núbia Alves Grandini, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron e demais membros da equipe por me receberem com estima e, mesmo diante das dificuldades, sempre se dispuseram em me ajudar.

À equipe do laboratório Toxicam.

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e vibraram pelas minhas conquistas.

**Muito obrigada!!**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Adipocinas e suas funções fisiológicas .....	18
<b>Figura 2:</b> Modulação fenotípica do tecido adiposo: magro com função metabólica normal, obeso com disfunção metabólica leve e obeso com disfunção metabólica completa .....	19
<b>Figura 3:</b> Anatomia interna do tecido cardíaco .....	21
<b>Figura 4:</b> Imagem representativa transversal de um coração saudável e com hipertrofia concêntrica e excêntrica .....	23
<b>Figura 5:</b> Fibrose cardíaca .....	26
<b>Figura 6:</b> Bergamota ( <i>Citrus bergamia</i> ) .....	29
<b>Figura 7:</b> Estrutura química dos flavonoides .....	30
<b>Figura 8:</b> Modelo de hipótese .....	32
<b>Figura 9:</b> Parâmetros inflamatórios cardíacos .....	56
<b>Figura 10:</b> Metaloproteinase 2 ativa (MMP-2 ativa) .....	57
<b>Figura 11:</b> Expressão relativa do colágeno III/ $\beta$ -actina .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Implicações de compostos funcionais na inflamação e nas alterações cardíacas em modelos <i>in vivo</i> .....	27
<b>Tabela 2:</b> Parâmetros nutricionais e metabólicos .....	54
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros cardiovasculares.....	55

## LISTA DE ABREVEATURAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TAG	Triacilglicerol
AGL	Ácidos graxos livres
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i>
bAT	<i>Brown-like Adipose Tissue</i>
WAT	<i>White Adipose tissue</i>
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
IL	Interleucina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
MCP-1	Proteína quimio atracente de monócitos-1
TLR-4	<i>Toll-like receptor 4</i>
IC	Insuficiência cardíaca
MMPs	Metaloproteinases de matriz
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
HMG	3-hidroxi-3-metilglutaril
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
FB	Extrato das folhas de bergamota
MEC	Matriz extracelular cardíaca
PS	Ponto de separação
ELISA	Método de ensaio imunoenzimático
HOMA-IR	<i>Homeostatic model assessment of insulin resistance</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RIPA	Tampão de extração <i>Radioimmuno precipitation assay</i>
NaCl	Cloreto de sódio

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1- Revisão de literatura</b> .....	<b>14</b>
<b>1. Obesidade</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Tecido adiposo</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Inflamação e tecido adiposo</b> .....	<b>18</b>
<b>4. Coração</b> .....	<b>20</b>
4.1 Anatomia .....	20
<b>5. Remodelamento cardíaco na obesidade</b> .....	<b>22</b>
5.1 Hipertrofia excêntrica .....	22
5.2 Hipertrofia concêntrica .....	23
<b>6. Matriz extracelular cardíaca</b> .....	<b>23</b>
6.1 Metaloproteinases de matriz (MMPs) .....	24
6.2 Colágeno intersticial .....	25
<b>7. Bergamota (<i>Citrus bergamia</i>)</b> .....	<b>28</b>
<b>8. Justificativa e hipótese</b> .....	<b>31</b>
<b>9. Objetivo geral</b> .....	<b>32</b>
9.1 Objetivos específicos .....	33
<b>10. Referências bibliográficas</b> .....	<b>33</b>
<b>Capítulo 2- Artigo científico</b> .....	<b>44</b>
Remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade: Efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota .....	45
Conclusão .....	60

## RESUMO

**Introdução:** Tendo em vista a importância da inflamação na patogênese dos distúrbios relacionados à obesidade, incluindo o remodelamento e a disfunção cardíaca, a busca por diferentes estratégias terapêuticas anti-inflamatórias naturais são promissoras. A bergamota (*Citrus bergamia*) é uma fruta cítrica utilizada para a produção de óleo essencial e estudos demonstram resultados propícios com ação antioxidante e anti-inflamatória. **Objetivo:** Investigar o efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de bergamota (FB) no remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade. **Metodologia:** Ratos *Wistar* machos (n=32) foram distribuídos em 2 grupos: dieta controle (C, n=16 animais) e dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=16 animais) por 20 semanas. Após detectado remodelamento cardíaco por ecocardiografia, os grupos foram redistribuídos em: controle + placebo (C, n=6); controle + extrato das folhas de bergamota (C+FB, n=6); HSF + placebo (HSF, n=6); HSF + extrato das folhas de bergamota (HSF+ FB, n=6) por 10 semanas. A concentração do extrato foi 50mg/kg de peso, diluído em água e administrado diariamente por gavagem; os grupos placebo receberam água também por gavagem. Foram avaliados: parâmetros nutricionais e metabólicos, parâmetros cardiovasculares, marcadores inflamatórios cardíacos, atividade da metaloproteinase-2 (MMP-2) miocárdica e a expressão proteica do colágeno tipo III miocárdico. **Resultados:** O grupo HSF apresentou obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial sistólica, resistência à insulina, remodelamento e disfunção cardíaca; além dessas alterações, apresentou inflamação cardíaca e diminuição da atividade da MMP-2 ativa; a suplementação com FB foi eficaz em melhorar no grupo HSF a resistência à insulina, o remodelamento, a função cardíaca, bem como a inflamação, a atividade da MMP-2 ativa e a expressão proteica de colágeno tipo III miocárdico. **Conclusão:** O efeito anti-inflamatório da suplementação com FB melhorou a atividade das metaloproteinases atenuando o remodelamento e a disfunção cardíaca induzidos pela obesidade.

**Palavras-chave:** Obesidade; Inflamação; Remodelamento cardíaco; Colágeno; Bergamota.

## ABSTRACT

**Background:** In view of the importance of inflammation in the pathogenesis of obesity-related disorders, including cardiac remodeling and dysfunction, the search for different natural anti-inflammatory therapeutic strategies presents promising possibilities. Bergamot (*Citrus bergamia*) is a citrus fruit used for the production of essential oil and studies show favorable results with antioxidant and anti-inflammatory action. **Aim:** To investigate the anti-inflammatory effect of bergamot leaf extract (FB) on cardiac remodeling in an experimental model of obesity. **Methods:** Male *Wistar* rats (n=32) were distributed into 2 groups: control diet (C, n=16 animals) and High sugar-fat diet (HSF, n=16 animals) for 20 weeks. After cardiac remodeling was detected by echocardiography, the groups were redistributed into: control + placebo (C, n=6); control + bergamot leaf extract (C+FB, n=6); HSF + placebo (HSF, n=6); HSF + bergamot leaf extract (HSF+ FB, n=6) for 10 weeks. The extract concentration was 50mg/kg of weight, diluted in water and administered daily by gavage; placebo groups also received water by gavage. The following were evaluated: nutritional and metabolic parameters, cardiovascular parameters, cardiac inflammatory markers, myocardial metalloproteinase-2 (MMP-2) activity and myocardial type III collagen protein expression. **Results:** The HSF group presented obesity, dyslipidemia, systolic arterial hypertension, insulin resistance, remodeling and cardiac dysfunction; in addition to these alterations, he presented cardiac inflammation and a decrease in active MMP-2 activity; FB supplementation was effective in improving insulin resistance, remodeling, cardiac function, as well as inflammation, active MMP-2 activity and myocardial collagen type III protein expression in the HSF group. **Conclusion:** The anti-inflammatory effect of FB supplementation improved the activity of metalloproteinases, attenuating obesity-induced cardiac remodeling and dysfunction.

**Keywords:** Obesity; Inflammation; Cardiac remodeling; Collagen; Bergamot.

## **Capítulo 1- Revisão de literatura**

## 1. Obesidade

A população mundial vivencia atualmente um processo de transição nutricional, caracterizado pelo aumento do consumo de açúcares simples e gorduras do tipo saturadas que, na maioria das vezes, estão contidos em alimentos ultraprocessados e bebidas açucaradas. Essa condição alimentar associada ao sedentarismo são considerados agentes principais no desenvolvimento da obesidade<sup>1</sup>.

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença caracterizada pelo aumento excessivo de massa adiposa que pode prejudicar a saúde<sup>2</sup>. A sua prevalência tem aumentado de maneira pandêmica em todas as faixas etárias nas últimas quatro décadas e, atualmente, representa um grande problema de saúde pública no mundo<sup>3-6</sup>. Segundo uma pesquisa realizada pela OMS em 2016, cerca de 650 milhões de adultos eram obesos e mais de 1,9 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso<sup>7</sup>. No Brasil, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), o percentual de pessoas obesas em idade adulta mais do que dobrou em 17 anos, passando de 12,2%, entre 2002 e 2003 para 26,8%, em 2019<sup>8</sup>. Além do percentual, em 2011, os gastos hospitalares e ambulatoriais do Sistema Único de Saúde (SUS) com a obesidade chegaram a R\$ 487,9 milhões, dos quais quase 24% eram atribuíveis à obesidade mórbida. E em 2018, os custos diretos atribuíveis a obesidade e outras comorbidades como hipertensão arterial e diabetes totalizaram R\$ 3,45 bilhões, considerando gastos do SUS com hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos<sup>4,9</sup>. A partir desses resultados, a perspectiva é que esses números continuem crescendo e que em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos ao redor do mundo estejam acima do peso, sendo 700 milhões de indivíduos com obesidade<sup>10</sup>.

O desenvolvimento do quadro de obesidade engloba diferentes dimensões, como a biológica, social, cultural, comportamental, de saúde pública e política<sup>3,11,12</sup>. A sua instauração está associada ao desenvolvimento de diversas comorbidades e complicações como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, resistência à insulina, Diabetes Mellitus tipo II, doenças cardiovasculares, renais e hepáticas<sup>13-15</sup>, que podem ser desencadeadas por alterações no tecido adiposo<sup>16</sup>.

## 2. Tecido adiposo

O tecido adiposo atualmente é um dos principais focos das pesquisas em obesidade, a partir de uma revolução no entendimento da sua função biológica<sup>16</sup>. Anteriormente, acreditava-se que sua função era limitada apenas como local de armazenamento para o excesso calórico consumido. No entanto, nas últimas décadas o tecido adiposo foi elucidado e consolidado como um órgão dinâmico metabolicamente, que além de caracterizar-se como principal local de armazenamento para o excesso de energia, tem função endócrina, parácrina e autócrina<sup>16,17</sup>. Neste sentido, o tecido é composto por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, macrófagos residentes, células do estroma vascular e tecido nervoso<sup>18</sup>, sendo os adipócitos as principais unidades do tecido adiposo especializados em armazenar gordura na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma, além de desempenharem atividades metabólicas importantes como a lipogênese (consiste na biossíntese e armazenamento de TAG) e lipólise (consiste na quebra de TAG e liberação de ácidos graxos livres (AGL))<sup>15,18</sup>.

Em mamíferos, o tecido adiposo é subdividido em três tipos, classificados de acordo com as suas funções, coloração, vascularização e estrutura, sendo o tecido adiposo marrom (*Brown Adipose Tissue* – BAT), o bege (*Brown-like Adipose Tissue* – bAT) e o branco (*White adipose tissue* – WAT)<sup>19</sup>.

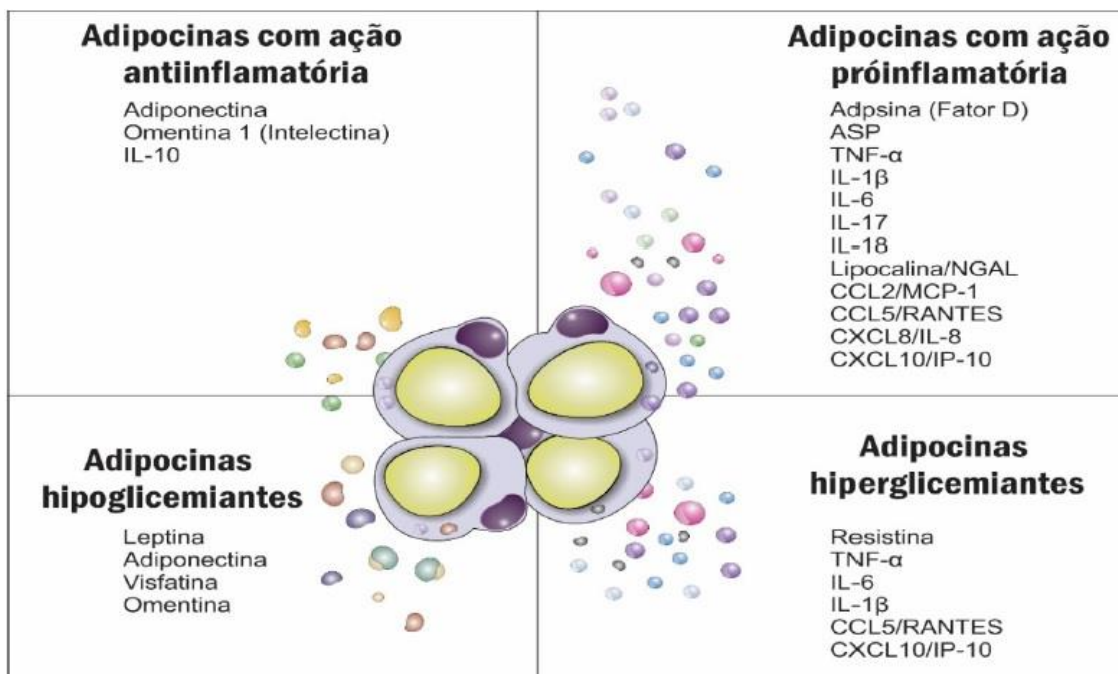
O tecido adiposo marrom dispõe de 4,3% da massa adiposa total, tem essa coloração ao fato de ser mais vascularizado e possuir alto teor de mitocôndrias, que, por sua vez, possuem citocromos, que são responsáveis por dar a cor marrom<sup>19,20</sup>. Os adipócitos marrons são mais vascularizados e inervados, e não tem a função de armazenar energia, mas dissipar energia por meio da termogênese, sendo localizado em locais superficiais e profundos afim de conseguir a regulação da temperatura corporal<sup>19,21</sup>.

Já o tecido adiposo bege, estudado recentemente, possui células adiposas semelhantes aos adipócitos marrons, porém com coloração bege e positivas para expressão de proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein* - UCP1). Mostraram-se prováveis de aparecerem em resposta a determinados estímulos como exercício, exposição ao frio ou alguns hormônios e podem-se

acumular em depósitos típicos de tecido adiposo branco e por isso são chamados de adipócitos bege ou “*brite*”, uma combinação dos termos marrom e branco, por terem características intermediárias entre os dois tipos de tecido<sup>19</sup>. Por terem a capacidade de absorver glicose e ácidos graxos para produzir calor como os adipócitos marrons, os adipócitos bege acabam desempenhando um papel decisivo na regulação do metabolismo da glicose e lipídios em todo o corpo, representando uma estratégia válida para tratar a obesidade e Diabetes Mellitus tipo II quando ativados<sup>22</sup>.

O tecido adiposo branco 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 TAG e mobilização de energia<sup>23</sup>. Possui menor vascularização e inervação do que o tecido marrom, além de ser responsável por secretar diversas substâncias conhecidas como adipocinas, compostos biologicamente ativos, que regulam a homeostase metabólica<sup>17,19,24</sup>.

As adipocinas são definidas como proteínas secretadas (e sintetizadas) pelo tecido adiposo, podendo ser uma citocina, como por exemplo a interleucina- 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a leptina, adiponectina, resistina, e a proteína quimio atraiante de monócitos-1 (MCP-1), dentre outras<sup>17,25</sup>. Na Figura 1 estão representadas as adipocinas e suas funções no organismo.



**Figura 1:** Adipocinas e suas funções fisiológicas. FIAF: fator adipocitário induzido pelo jejum; ASP: proteína estimulante da acilação; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; PAI-I: inibidor do ativador de plasminogênio I; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; NGF: fator de crescimento neural; IL-6: interleucina 6; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta; IL-10: interleucina 10; IL-17: interleucina 17; IL-18: interleucina 18; PCR: proteína c reativa; NGAL: lipocalina associada à gelatinase neutrofílica; MCP-1: proteína quimio atraiante de monócitos-1; RANTES: regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais; IL-8: interleucina 8; IP-10: proteína 10 induzida por interferon. Fonte: ISLEIDE et al., 2019<sup>25</sup>.

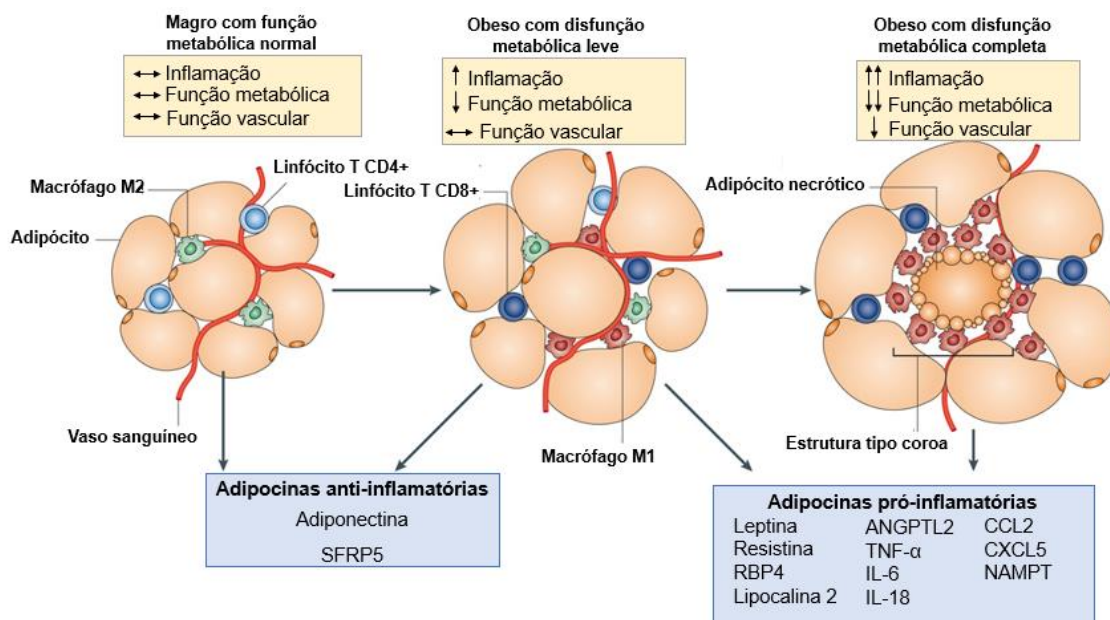
Dessa forma, o tecido adiposo é reconhecido como um órgão importante de uma complexa rede que participa da regulação de uma variedade de funções biológicas<sup>17</sup>. Neste sentido, dentre as adipocinas produzidas pelo tecido adiposo, a adiponectina é a mais abundante, atuando na resposta inflamatória e na regulação do balanço energético, desenvolvendo um papel anorexígeno e anti-inflamatório e também aumentando a sensibilidade à insulina<sup>16,26</sup>. Em casos onde a homeostase deste tecido é alterada, a secreção dessas substâncias pode ser modificada, resultando em uma disfunção do tecido adiposo<sup>27,28</sup>.

### 3. Inflamação e tecido adiposo

De acordo com a literatura, o tecido adiposo é capaz de armazenar o excesso de energia vinda de um balanço energético positivo sob a forma de TAG<sup>29,30</sup>. Porém, em situações de aporte excessivo de nutrientes, há aumento do tamanho dos adipócitos (hipertrofia) e também do número (hiperplasia) até o tecido atingir uma inflexibilidade para se expandir tornando-se

disfuncionante<sup>31,32</sup>. Esses adipócitos hipertrofiados acabam liberando uma maior quantidade de adipocinas como a leptina e resistina, enquanto os macrófagos residentes respondem a esse estímulo liberando citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  e quimiocinas como MCP-1, que agem recrutando monócitos circulantes que chegam ao tecido adiposo e se diferenciam em macrófagos<sup>17,29,33–36</sup>.

Os macrófagos possuem a capacidade de alterar seu perfil de secreção de citocinas de acordo com o estímulo que recebem, por exemplo o perfil M1 é conhecido por uma atividade pró-inflamatória (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ ), já o perfil M2 anti-inflamatória (IL-10, IL-4, IL-13). Desta forma, quando o tecido adiposo sofre uma disfunção, há o predomínio de macrófagos M1, que são responsáveis por ampliar e manter o quadro de inflamação e os níveis elevados de IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>34,37,38</sup> (Figura 2).



**Figura 2:** Modulação fenotípica do tecido adiposo: magro com função metabólica normal, obeso com disfunção metabólica leve e obeso com disfunção metabólica completa. SFRP5: proteína secretada relacionada ao receptor frizzled-5; RBP4: proteína ligante de retinol 4; ANGPTL2: proteína 2 semelhante à angiopoietina; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa de IL-6: intereucina; IL-18: interleucina 18; CCL2: ligante de quimiocina 2; CXCL5: ligando 5 de quimiocina CXC; NAMPT: nicotinamida fosforibosiltransferase. Fonte: OUCHI et al., 2011<sup>39</sup>.

O aumento local crônico, conseqüentemente desencadeia o aumento sérico dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que podem influenciar significativamente no desenvolvimento de distúrbios concomitantes à obesidade<sup>25,33,40,41</sup>, afetando diversos órgãos, principalmente o coração<sup>42</sup>.

Evidências demonstram que o acúmulo de gordura corporal está associado ao desenvolvimento de complicações em resposta ao comprometimento do coração, principalmente por alterações hemodinâmicas, estruturais e funcionais ou indiretamente pelo processo inflamatório<sup>42-47</sup>. Estudos publicados pelo nosso grupo de pesquisa com animais submetidos a dieta rica em açúcar e gordura mostrou que o coração, durante o quadro de obesidade, é capaz de produzir citocinas pró-inflamatórias através de uma via conhecida como tipo *Toll 4 (Toll-like receptor 4- TLR-4)*<sup>42</sup> e essa condição inflamatória está relacionada ao comprometimento do coração por alterarem a estrutura e a função cardíaca<sup>45,47</sup>.

## **4. Coração**

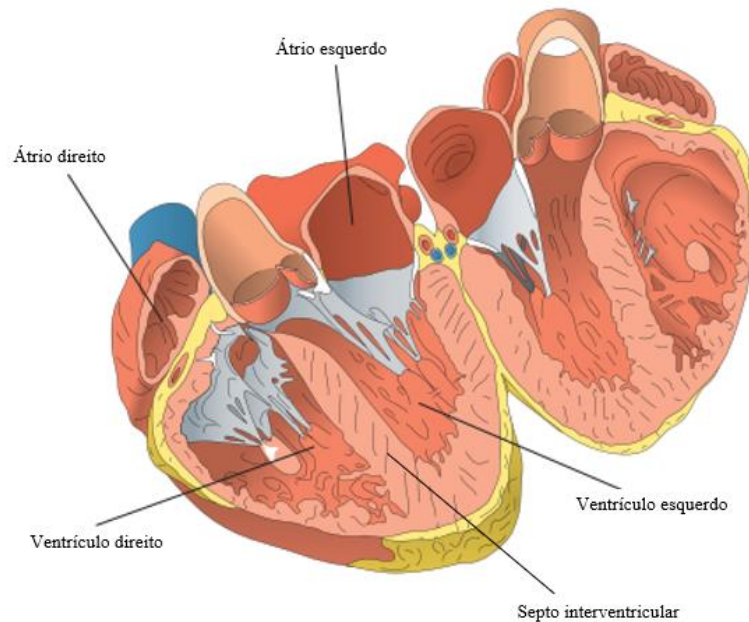
O coração é um órgão em forma de cone e oco, que funciona de modo similar a duas bombas, contrátil e propulsora, sendo sua principal função o bombeamento de sangue entre suas cavidades, e através da circulação pulmonar e periférica<sup>48,49</sup>.

### **4.1 Anatomia**

Localizado na cavidade torácica, posteriormente ao osso esterno e superiormente ao músculo diafragmático<sup>50</sup>, o coração é dividido em ápice, base e mais três faces: esternocostal, diafragmática e pulmonar<sup>49</sup>, onde sua base, a parte superior do órgão, tem delimitação não bem definida correspondendo a região de inserção de grandes vasos, ou seja, vasos por onde o sangue entra e sai do coração<sup>50</sup>.

Internamente, a cavidade cardíaca é subdividida em quatro câmaras: 2 átrios e 2 ventrículos localizados à direita e à esquerda, onde o átrio direito se comunica com o ventrículo direito por meio do óstio atrioventricular direito, e o esquerdo através do óstio atrioventricular esquerdo<sup>49</sup>.

Os átrios são câmaras responsáveis por receberem o sangue e transmitirem para os ventrículos e entre eles existe uma parede divisória chamada de septo interatrial. Já os ventrículos são considerados as câmaras de ejeção de sangue pulmonar e sistêmico e são separados pelo septo interventricular<sup>51</sup> (Figura 3).



**Figura 3:** Anatomia interna do tecido cardíaco. Fonte: adaptado de DUTRA et al., 2019<sup>49</sup>.

O átrio direito recebe o sangue da veia cava (superior e inferior) e do seio coronário, já o átrio esquerdo recebe o sangue das veias pulmonares direitas e esquerdas. O ventrículo direito compõe a maior parte da face esternocostal, uma parte da face diafragmática e quase toda a margem inferior do coração, sendo responsável por conduzir o sangue pela artéria tronco pulmonar, enquanto o ventrículo esquerdo compõe o ápice do coração e exerce uma função vital de conduzir o sangue pela artéria aorta para todos os tecidos do corpo. Entre o átrio direito e o ventrículo direito está localizada a valva atrioventricular direita (tricúspide), e entre o átrio esquerdo e o ventrículo esquerdo está a valva atrioventricular esquerda (mitral), que têm como funções proteger as cavidades e impedir retorno do sangue dos ventrículos para os átrios<sup>50,51</sup>.

Em relação às paredes das cavidades cardíacas, as do átrio direito são diferentes do átrio esquerdo, onde a parede posterior é formada por tecido liso e a parede anterior de tecido rugoso, enquanto a outra possui parede posterior e anterior de tecido liso. Já a parede ventricular esquerda é mais espessa do que a direita, devido à maior força necessária para bombear sangue para a circulação sistêmica<sup>49,52</sup>.

Portanto, condições fisiológicas e/ou fisiopatológicas que promovam modificações na carga funcional do coração requerem respostas adaptativas,

que conseqüentemente culminam no remodelamento cardíaco<sup>43,44,53,54</sup>, visto que afetam diretamente a estrutura e função cardíaca por determinar aumento na pré e na pós-carga cardíaca<sup>55</sup>.

## **5. Remodelamento cardíaco na obesidade**

De maneira conceitual o remodelamento cardíaco é uma alteração na expressão gênica em resposta a uma agressão, resultando em mudanças moleculares, celulares e intersticiais miocárdicas, e que se expressa por variações no tamanho, massa (hipertrofia cardíaca), forma e função do coração<sup>56,57</sup>. É um mecanismo adaptativo à sobrecarga hemodinâmica, permitindo ao coração manter suas funções em vigência de aumento de carga e um fator de risco para o desenvolvimento de disfunção ventricular e insuficiência cardíaca (IC)<sup>56</sup>.

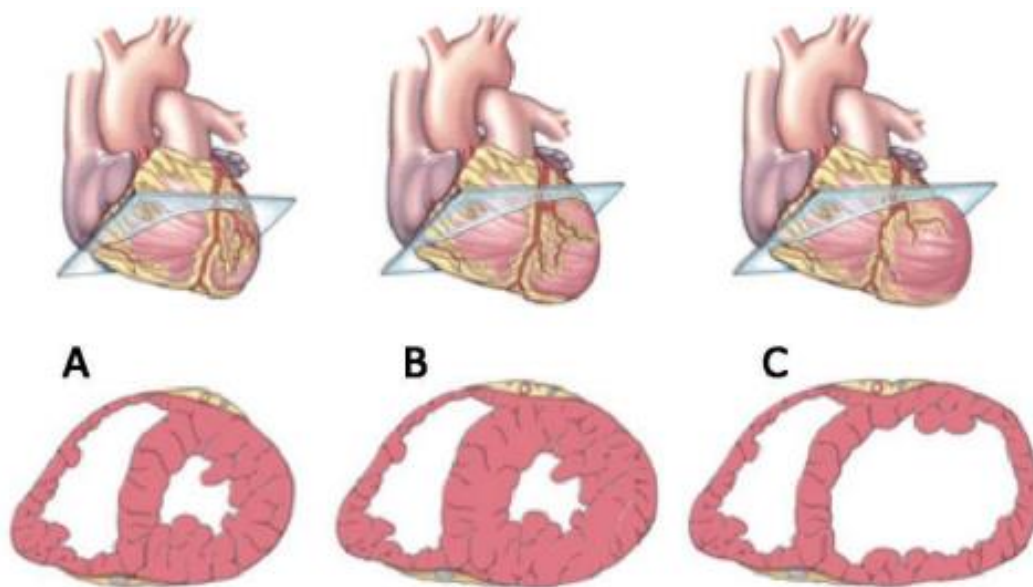
Em indivíduos obesos, o remodelamento pode promover alterações na função diastólica (enchimento ventricular) e sistólica (esvaziamento ventricular), que variam de acordo com o grau e tempo de agressão<sup>58-61</sup>. Assim, o remodelamento pode ser descrito como fisiológico (adaptativo) ou patológico (não adaptativo). O primeiro é uma alteração compensatória nas dimensões e função do coração em resposta a estímulos fisiológicos como exercício, gravidez e o próprio crescimento. Já o patológico ocorre quando o estresse é acentuado e persistente, culminando em deterioração da capacidade funcional, como pode ocorrer em diversos tipos de doenças<sup>62,63</sup>. Ainda sobre o remodelamento, são observadas hipertrofias que podem ser classificadas quanto às suas características como: excêntricas e concêntricas<sup>61,64,65</sup>.

### **5.1 Hipertrofia excêntrica**

Ocorre o aumento de massa e da espessura da parede ventricular com aumento dos diâmetros cavitários devido à deposição em séries dos miócitos. Esta condição é associada à sobrecarga de volume, onde a existência de um volume cavitário maior permite uma fração ejetada maior, embora o aumento de raio tenda a reduzir a capacidade de desenvolvimento de pressão<sup>66,67</sup> (Figura 4).

## 5.2 Hipertrofia concêntrica

Ocorre redução dos diâmetros cavitários, sendo seus miócitos dispostos em paralelo, permitindo ao ventrículo desenvolver maior pressão ventricular. Esta condição é associada ao aumento da resistência vascular, pois a tensão ativa produzida pelo aumento da massa ventricular é maior e, conseqüentemente em menor raio da cavidade, resultando em um aumento da pressão<sup>66,67</sup> (Figura 4).



**Figura 4:** Imagem representativa transversal de um coração saudável e com hipertrofia concêntrica e excêntrica. A: Coração normal; B: Coração com hipertrofia concêntrica; C: Coração com hipertrofia excêntrica. Fonte: OLLOQUIEGUI, 2016<sup>68</sup>.

Diferentes mecanismos têm sido apontados como participantes no processo de remodelação, como as alterações nas proteínas contráteis, dessensibilização  $\beta$ -adrenérgica, prejuízos no acoplamento excitação-contração-relaxamento<sup>63,69</sup>, e principalmente alterações na matriz extracelular por degradação ou fibrose<sup>57,63,69,70</sup>.

A presença de fibrose e de hipertrofia é observada na obesidade<sup>71</sup>, além de uma infiltração intersticial de células inflamatórias como macrófagos, linfócitos T e níveis elevados de citocinas inflamatórias (como IL-6, TNF- $\alpha$ ), os quais parecem exercer um papel influenciador na atividade das metaloproteinases da matriz extracelular<sup>72-75</sup>.

## 6. Matriz extracelular cardíaca

A matriz extracelular é primordial para integridade estrutural do coração, desempenhando um papel importante na manutenção da geometria ventricular esquerda e da função ventricular<sup>76,77</sup>. Sua função biológica é o suporte estrutural, sendo capaz de manter a arquitetura do tecido, preenchendo os espaços entre as células, conferindo adesão e forma, permite a migração, proliferação e diferenciação das células adjacentes<sup>72</sup>.

A matriz é composta por elementos estruturais, como colágeno, e outras proteínas, como a fibronectina, proteoglicanos e proteínas matricelulares<sup>76,78</sup>, além de uma família de enzimas de decomposição da matriz extracelular, chamadas de metaloproteinases de matriz (MMPs)<sup>79</sup>.

## 6.1 Metaloproteinases de matriz (MMPs)

São uma família de mais de 25 espécies de proteases dependentes de zinco, essenciais para a remodelação normal do tecido e estão envolvidas em diversas enfermidades, como câncer, doenças inflamatórias e cardiovasculares<sup>76,77</sup>. Elas são secretadas na forma de pró-enzimas inativas, denominadas zimogênios, que são ativadas no ambiente pericelular dos tecidos por segmentação do pró-peptídeo, ou seja, por quebra de uma ligação de cisteína-Zn<sup>++</sup> que bloqueia a reatividade do local ativo, fazendo com que os zimogênios (inativos) se transformem em MMPs (ativas)<sup>76,80</sup>. As MMPs são classificadas em 5 grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e a sua homologia interna em: colagenases (MMP- 1, 8, 13 e 18), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelisinases (MMP - 3, 10 e 11), tipo-membrana (MT-MMP 1 a 4, 14 a 17) e a matrilisina (MMP- 7)<sup>81</sup>. As MMPs mais abundantes no miocárdio são as MMP-2 e MMP-9, conhecidas por estarem associadas às alterações cardíacas causadas por diferentes agressões, como a MMP-2, uma das mais importantes para o processo de remodelamento cardíaco<sup>75-77,82</sup>.

A atividade das MMPs pode ser regulada por fatores genéticos e epigenéticos, bem como a nível pós-transcricional por hormônios, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e interações célula-célula e célula-matriz, podendo ser reguladas também por inibidores fisiológicos endógenos, como por exemplo os Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs)<sup>72,81</sup>, que se

ligam às proteases através da proporção molar estequiométrica 1:1, formando um sistema importante para o controle da atividade endógena das MMPs *in vivo*. Ao se ligarem às MMPs, os TIMPs bloqueiam o sítio ativo, impedindo o acesso ao substrato específico<sup>72,83</sup>. Dessa forma, o equilíbrio entre a produção de MMPs e de TIMPs representa o ponto principal para manutenção da homeostase da matriz<sup>84</sup>.

Os TIMPs são proteínas pequenas e multifuncionais divididas em diferentes tipos como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, sendo expressos por uma variedade de tipos celulares e presentes na maioria dos tecidos e fluidos corporais, sendo o TIMP-4 a forma mais abundante encontrada no coração<sup>83,85,86</sup>. Todas as MMPs podem ser inibidas por TIMPs, entretanto, não com a mesma eficácia, visto que o TIMP-2 é o inibidor mais efetivo para a MMP-2 e o TIMP-4 tem efeito inibitório tanto sobre a MMP-2 quanto a MMP-9<sup>82,87</sup>.

Em alguns processos patológicos, como em condição de obesidade, o cenário inflamatório alterado pode culminar em desequilíbrio entre as MMPs e TIMPs, resultando em alterações quantitativas e/ou qualitativas na composição da matriz, com conseqüente remodelamento cardíaco e alteração na função cardíaca<sup>72,84,88,89</sup>.

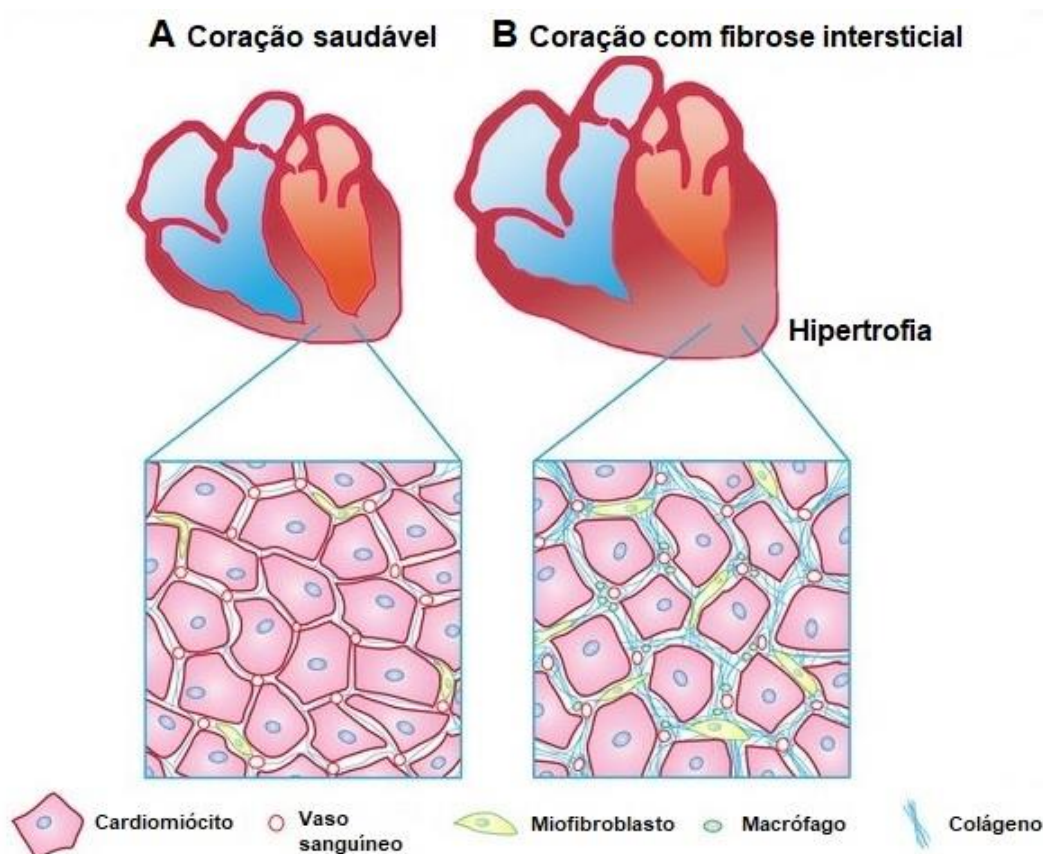
## 6.2 Colágeno intersticial

No interstício cardíaco existe uma rede complexa e organizada de fibras de colágeno, principal componente da matriz, predominantemente do tipo I e III, sendo o tipo I o mais abundante, correspondendo a aproximadamente 80% do colágeno total<sup>90,91</sup>. Em uma condição estável, o colágeno contribui para a manutenção da arquitetura e função cardíaca, tendo como principais funções a regulação da apoptose, resistir a deformações patológicas, manter o alinhamento das estruturas e regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força durante o encurtamento da fibra cardíaca<sup>78</sup>.

Produzida por fibroblastos, as fibras colágenas são firmemente justapostas, com fortes ligações químicas e resistentes à degradação causada pela maioria das proteases, destacando-se as MMPs 2 e 9<sup>81,90,91</sup>. Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 clivam a elastina, o colágeno tipo IV e várias outras

moléculas de matriz e a MMP-2 digere o colágeno intersticial tipos I, II e III<sup>81</sup>. Em situações onde a atividade dessas MMPs é alterada<sup>91-95</sup>, o colágeno pode sofrer alterações resultando no aumento da síntese e/ou diminuição da degradação ou vice-versa<sup>96</sup>, culminando no processo de fibrose cardíaca<sup>72,77,97</sup>.

A fibrose cardíaca é uma característica patológica comum da doença cardíaca em estágio final, que resulta em disfunção cardíaca grave<sup>97</sup>. Nesse tipo de situação ocorre a deposição de colágeno, principalmente do tipo III, remodelação da matriz extracelular e o aumento da rigidez do tecido, de modo prejudicial à função do órgão, reduzindo a elasticidade e distensibilidade do tecido<sup>72,97,98</sup> (Figura 5).



**Figura 5:** Fibrose cardíaca. A: O miocárdio saudável consiste em um arranjo compacto de cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas e miofibroblastos; B: A fibrose intersticial é caracterizada por um aumento progressivo do espaço extracelular. Os miofibroblastos e macrófagos têm um papel principal no aumento da produção e degradação das células extracelulares. Fonte: adaptado de GRAAF et al., 2014<sup>99</sup>.

Alguns trabalhos têm analisado a expressão dos colágenos do tipo I e/ou III em modelos de obesidade experimental<sup>91,92,100,101</sup>, estudos realizados por Carroll e Tyagi<sup>101</sup> e Martínez-Martínez et al.<sup>92</sup>, utilizando dietas ricas em

gordura, demonstraram elevação da expressão de colágeno miocárdico do tipo I e III. Em contrapartida, Silva et al.<sup>100</sup> e Silva-Bertani et al.<sup>91</sup>, empregando uma dieta rica em gordura, apresentaram diminuição da expressão de colágeno do tipo I miocárdico.

Portanto, além de limitadas, são controversas as informações sobre o comportamento da expressão desses tipos de colágeno no coração de animais obesos. Tendo em vista o grande impacto ocasionado pelas doenças cardíacas, torna-se relevante a identificação de estratégias terapêuticas que auxiliem no tratamento do remodelamento cardíaco presente em modelo de obesidade<sup>75,102</sup>. Neste contexto, surge a utilização de alimentos funcionais, cujo consumo acarreta em benefícios a saúde<sup>103</sup>. A tabela (Tabela 1) a seguir elucida alguns exemplos de compostos funcionais atuando na inflamação e nas alterações cardíacas.

**Tabela 1: Implicações de compostos funcionais na inflamação e nas alterações cardíacas em modelos *in vivo*.**

Estudos	Compostos (dose/ período)	Animais	Métodos	Resultados
104	Sulforafano (0,5 mg/kg/5 d/12 semanas)	Coelhos brancos da Nova Zelândia	Animais com insuficiência cardíaca crônica suplementados com sulforafano	<ul style="list-style-type: none"> <li>Melhorou o remodelamento e a função cardíaca;</li> <li>Reduziu os níveis de citocinas inflamatórias cardíacas.</li> </ul>
45	Tomate- oleorresina (10 mg/kg PC/d/30 semanas)	Ratos <i>Wistar</i> machos	Animais submetidos à dieta controle ou dieta rica em açúcar e gordura e tratados com tomate-oleorresina.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Melhorou o remodelamento e a função cardíaca;</li> <li>Reduziu os níveis de citocinas inflamatórias e quimiocinas cardíacas.</li> </ul>

105	Tomate ou licopeno (1 mg/kg PC/d/3 meses)	Ratos <i>Wistar</i> machos	Animais submetidos ao infarto do miocárdio suplementados com tomate ou licopeno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Melhoram o remodelamento e a função diastólica;</li> <li>• Reduziram os níveis de citocinas inflamatórias cardíacas.</li> </ul>
106	Gama-Orizanol (0,5% (p/p) /20 semanas)	Ratos <i>Wistar</i> machos	Animais submetidos à dieta controle ou dieta rica em açúcar e gordura, suplementadas com Gamma-Orizanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preveniu a disfunção cardíaca.</li> </ul>
47	Farelo de arroz (11% (p/p) / 20 semanas)	Ratos <i>Wistar</i> machos	Animais submetidos à dieta controle ou dieta rica em açúcar e gordura, suplementadas com farelo de arroz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Preservou a estrutura e a função cardíaca;</li> <li>• Preservou o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias cardíacas.</li> </ul>
107	Quercetina (0,8 g/kg/16 semanas)	Ratos <i>Wistar</i> machos	Animais submetidos à dieta rica em amido de milho ou em carboidratos e gorduras, suplementadas com quercetina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Melhorou a estrutura e a função cardíaca</li> </ul>

Mg: miligramas; kg: quilogramas; D: dias; PC: peso corporal; G: gramas; P/P: peso/peso.

## 7. Bergamota (*Citrus bergamia*)

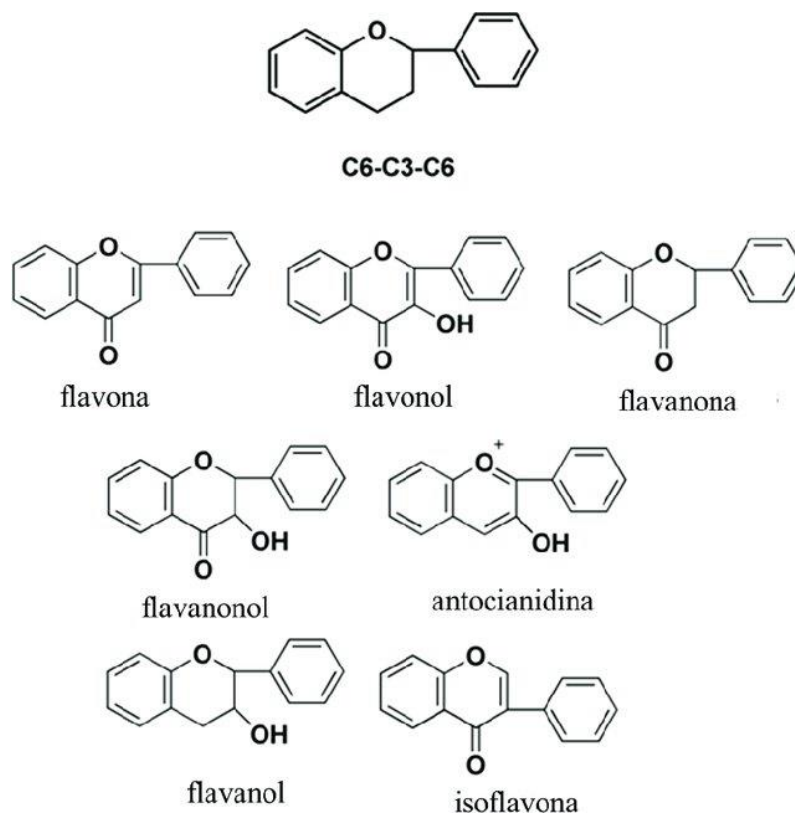
A Bergamota (*Citrus bergamia*) (Figura 6), é uma fruta cítrica utilizada para a produção de óleo essencial. Embora nativa do Sudeste Asiático, a

planta é cultivada no sul da Itália, na região da Calábria<sup>108,109</sup>. Atualmente a Itália é responsável por mais de 95% da produção mundial de óleo essencial de bergamota, obtido a partir da casca e amplamente utilizado na indústria de cosméticos, indústria farmacêutica e na indústria alimentícia como aroma<sup>108,110</sup>.



**Figura 6:** Bergamota (*Citrus bergamia*). Fonte: retirada do acervo da *Herbal & Antioxidant derivatives* (H&AD srl ©)<sup>111</sup>.

Semelhante a outras frutas cítricas, a bergamota contém óleos essenciais, pectinas, pigmentos, ceras, cumarinas, psoralenos e polifenóis<sup>109</sup>. Porém ela se difere das demais não apenas pela composição de seu perfil de flavonoides presentes no suco da fruta, mas também pelo teor particularmente alto desses compostos<sup>109,112</sup>. Os flavonoides são compostos polifenólicos amplamente presentes no reino das plantas. Sua estrutura base é composta por dois anéis benzênicos que estão ligados por um anel heterocíclico contendo oxigênio (C6-C3-C6) (Figura 7). Atualmente, são divididos em diferentes subclasses, como por exemplo em flavononas, flavonas, isoflavonóis, dependendo da conexão entre os anéis, da estrutura do anel e dos padrões de hidroxilação e glicosilação dos três anéis<sup>113</sup> (Figura 7).



**Figura 7:** Estrutura química dos flavonoides. Fonte: MAGALHÃES & DOS SANTOS, 2021<sup>114</sup>.

O perfil dos flavonoides presentes na bergamota é característico e único, contendo uma série de flavanonas e flavonas, que não são encontradas na laranja e no limão. Entre os flavonoides mais importantes estão a neoeriocitrina, neohesperidina, naringina, rutina, neodiosmina, roifolina, eriodictiol, hesperetina e poncirina. Além disso, alguns conjugados de diglicosídeos flavonóides 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) de neohesperidina e naringina, brutieridina e melitidina, foram identificados tanto no suco quanto no albedo (camada branca entre a casca e a polpa)<sup>109</sup>.

Dessa forma, levando em consideração a composição fenólica da bergamota, nos últimos anos a comunidade científica tem focado uma atenção crescente no suco de bergamota, que apesar de ser pouco consumido devido ao seu sabor amargo, possui compostos bioativos os quais desempenham atividades hipolipêmicas, hipoglicêmicas, anti-inflamatórias e antioxidantes mostrando-se eficazes no tratamento dos parâmetros que compõem a síndrome metabólica<sup>115,116</sup>, cujo benefício é atribuído devido ao perfil polifenólico do suco dessa fruta, que além de conter um alto teor desses compostos, possui derivados de flavonoides diglicosilados como brutieridina e

melitidina, cuja estrutura química assemelha-se à das estatinas, drogas inibidoras do colesterol<sup>109,117</sup>.

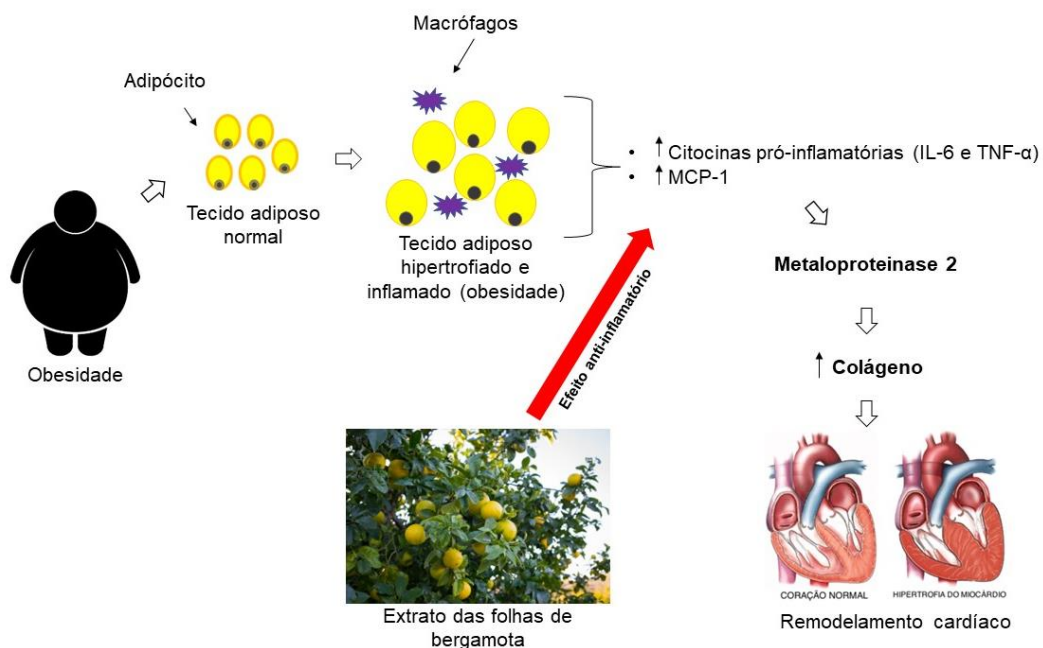
Um estudo realizado por Mollace e colaboradores sobre o efeito do extrato de bergamota em ratos *Wistar* e em 237 pacientes que sofriam de hiperlipidemia induzida por dieta associada ou não à hiperglicemia, mostrou-se eficaz ao reduzir os níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (*Low density lipoprotein- LDL*), os níveis de triglicerídeos e uma diminuição significativa dos níveis de glicose no sangue, além de melhorar a vasodilatação reativa, representando assim uma abordagem fitoterápica eficiente no combate aos distúrbios hiperlipêmicos e hiperglicêmicos<sup>115</sup>. Já outros estudos com diferentes modelos experimentais mostraram que a bergamota enquanto fruto foi eficaz em reduzir de forma significativa os níveis de citocinas pró-inflamatórias<sup>110,118-120</sup>.

A partir dessa crescente evidência científica dos efeitos positivos do fruto da bergamota na saúde humana, acredita-se que nos próximos anos haverá um aumento da sua demanda como ingrediente complementar. Entretanto, considerando-se a disponibilidade limitada devido a sua produção ser realizada uma vez por ano, outras partes da bergamota devem ser abordadas considerando uma fonte alternativa de atividade biológica semelhante ao do fruto<sup>117</sup>. Alguns estudos analíticos mostraram que para algumas plantas, como aquelas que produzem bagas, a composição fenólica da folha é semelhante a do fruto ou até mesmo mais rica ou superior, indicando que podem ser utilizadas como fonte alternativa ao desenvolvimento de suplementos alimentares, nutracêuticos ou alimentos funcionais<sup>117,121,122</sup>. Sendo assim, um estudo com o extrato das folhas de bergamota torna-se de extrema relevância científica, uma vez que não há trabalhos na literatura abordando a ação do extrato das folhas no tratamento da inflamação em modelo de obesidade e comorbidades, bem como em doenças cardíacas.

## **8. Justificativa e hipótese**

Em situações de aporte excessivo de nutrientes, há hipertrofia do tecido adiposo que, desencadeia inicialmente, um processo inflamatório local, acompanhado de uma infiltração de macrófagos e aumento da síntese de

citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 e de quimiocinas como MCP-1, que posteriormente podem afetar e comprometer a função de outros órgãos, como o coração. A inflamação por sua vez acaba modulando a atividade da MMP-2 no miocárdio, que culmina no aumento da expressão proteica de colágeno do tipo III, sendo este responsável pelo processo de remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade. Assim, diante desse cenário, a hipótese desse trabalho é que o extrato das folhas de bergamota, devido às propriedades anti-inflamatórias, é capaz de atenuar o remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade (Figura 8).



**Figura 8:** Modelo de hipótese. A obesidade, causada por aporte excessivo de nutrientes, leva a hipertrofia do tecido adiposo que, desencadeia inicialmente, um processo inflamatório local, acompanhado de uma infiltração de macrófagos e aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 e de quimiocinas como MCP-1, que posteriormente podem afetar e comprometer a função de outros órgãos, como o coração. A inflamação por sua vez acaba modulando a atividade da MMP-2 no miocárdio, que culmina no aumento da expressão proteica de colágeno, sendo este responsável pelo processo de remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade. Assim, diante desse cenário, a hipótese desse trabalho é que o extrato das folhas de bergamota, devido às propriedades anti-inflamatórias, é capaz de atenuar o remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade.

## 9. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de bergamota no remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade.

## 9.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota sobre os parâmetros metabólicos da obesidade;
- Avaliar o efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota sobre o estado inflamatório no tecido cardíaco;
- Avaliar a atividade enzimática da MMP-2 miocárdica em modelo experimental de obesidade;
- Avaliar a expressão proteica do colágeno tipo III miocárdico em modelo experimental de obesidade.

## 10. Referências bibliográficas

1. Mandavia, C. H., Pulakat, L., DeMarco, V. & Sowers, J. R. Over-nutrition and Metabolic Cardiomyopathy. *Metabolism* **61**, 1205–1210 (2012).
2. World Health Organization. Obesity and overweight. 2020. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (2020).
3. Brasil. Ministério da Saúde. Promoção da Saúde e da Alimentação Adequada e Saudável- Excesso de peso e obesidade. 2022. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/ape/promocaosaude/excesso>. (2022).
4. Nilson, E. A. F., Santin Andrade, R. da C., de Brito, D. A. & de Oliveira, M. L. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. *Rev. Panam. Salud Publica* **43**, 1–7 (2019).
5. Sichieri, R., Nascimento, S. do & Coutinho, W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. *Caderneta de Saúde Pública* **23**, 1721–1727 (2007).
6. Brasil. Ministério da Saúde. *Perspectivas e desafios no cuidado às pessoas com obesidade no Sus: resultados do Laboratório de Inovação no manejo da obesidade nas Redes de Atenção à Saúde/Ministério da Saúde*. (Organização Pan-Americana da Saúde, 2014).
7. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact sheets: obesity and overweight [Internet]. Geneva: WHO. 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. 2021 (2021).

8. Pesquisa Nacional de Saúde: 2019: atenção primária à saúde e informações antropométricas: Brasil / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 66p. 2020 (2020).
9. de Oliveira, M. L., Santos, L. M. P. & da Silva, E. N. Direct healthcare Cost of obesity in Brazil: An application of the cost-of-illness method from the perspective of the public health system in 2011. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
10. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. Mapa da Obesidade. 2022. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>. (2022).
11. Nogueira Wanderley, Emanuela Ferreira & Vanessa Alves. Obesidade: uma perspectiva plural Obesity: a plural perspective. *Cien. Saude Colet.* **15**, 185–194 (2010).
12. Kudel, I., Alves, J. S., Goncalves, T. D. M., Kull, K. & Nørtoft, E. The association between body mass index and health and economic outcomes in Brazil. *Diabetol. Metab. Syndr.* 1–11 (2018) doi:10.1186/s13098-018-0322-9.
13. Calder, P. C. *et al.* Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br. J. Nutr.* **106**, S5-78 (2011).
14. Herrera, M. C. A., Subhan, F. B. & Chan, C. B. Dietary Patterns and Cardiovascular Disease Risk in People with Type 2 Diabetes. *Curr Obes Rep* **6**, 1–9 (2017).
15. Moreno-indias, I. & Tinahones, F. J. Impaired Adipose Tissue Expandability and Lipogenic Capacities as Ones of the Main Causes of Metabolic Disorders. *J. of Diabetes Res.* **2015**, 1–13 (2015).
16. Prado, W. L. do, Lofrano, M. C., Oyama, L. M. & Dâmaso, A. R. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. *Rev Bras Med Esporte* **15**, 378–383 (2009).
17. Francisqueti, F. V., Nascimento, A. F. do & Correa, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. *Nutrire* **40**, 81–89 (2015).
18. Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C. & Lima, F. B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras*

- Endocrinol Metab* **50**, 216–229 (2006).
19. Frigolet, M. E. & Gutiérrez-Aguilar, R. The colors of adipose tissue. *Gac. Med. Mex.* **156**, 142–149 (2020).
  20. Bartelt, A. & Heeren, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 24–36 (2014).
  21. Perdikari, A. *et al.* BATLAS: Deconvoluting Brown Adipose Tissue. *Cell Rep.* **25**, 784–797 (2018).
  22. Cheng, L. *et al.* Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. *Adipocyte* **10**, 48–65 (2021).
  23. Priest, C. & Tontonoz, P. Inter-organ cross-talk in metabolic syndrome. *Nat. Metab.* **1**, 1177–1188 (2019).
  24. Halberg, N., Wernstedt, I. & Scherer, P. E. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**, 1–15 (2009).
  25. Isleide, N., Maurício, H., Blanch, G. T. & Cruvinel, W. D. M. Adipocinas e sua relação com a obesidade. *EVS Puc Go* **46**, 53–64 (2019).
  26. Penna, P. M., Hermsdorff, H. H. M. & Saron, M. L. G. O papel de adipocinas na relação entre obesidade e resistência à insulina: uma revisão integrativa. *Cad. UniFOA* **15**, 131–141 (2020).
  27. Klöting, N. & Blüher, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **15**, 277–287 (2014).
  28. Lafontan, M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab.* **40**, 16–28 (2014).
  29. Galic, S., Oakhill, J. S. & Steinberg, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* **316**, 129–139 (2010).
  30. Coelho, M., Oliveira, T. & Fernandes, R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Arch. Med. Sci.* **9**, 191–200 (2013).
  31. Codoñer-Franch, P., Valls-Belles, V., Arilla-Codoñer, A. & Alonso-Iglesias, E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link. *Transl. Res.* **158**, 369–384 (2011).
  32. Goossens, G. H. & Blaak, E. E. Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: a matter of oxygen? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **6**, 1–5 (2015).

33. Popko, K., Plywaczewski, R., Stoklosa, A., Pyrzak, B. & Demkow, U. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res* **15**, 120–122 (2010).
34. Castoldi, A., Souza, C. N. de, Câmara, N. O. S. & Moraes-Vieira, P. M. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front. Immunol.* **6**, 1–11 (2016).
35. Jayarathne, S., Koboziev, I., Park, O. & Oldewage-theron, W. Review Article Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Properties of Food Bioactive Components : Effects on Adipose Tissue. *Food Bioact. Compd. Reduce Inflamm.* **22**, 251–262 (2017).
36. Paniagua, J. A. Nutrition , insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J. Diabetes* **7**, 483–514 (2016).
37. Kraakman, M. J., Murphy, A. J., Jandeleit-dahm, K. & Kammoun, H. L. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes : weighing down our understanding of macrophage function ? *Front. Immunol.* **5**, 1–6 (2014).
38. Liu, Y., Zou, X., Chai, Y. & Yao, Y. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 520–529 (2014).
39. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* **11**, 85–95 (2011).
40. Kamei, N. *et al.* Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* **281**, 26602–26614 (2006).
41. Kanda, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue , insulin resistance , and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* **116**, 1494–1505 (2006).
42. Alves, P. H. R. *et al.* Relação entre Resposta Imune Inata do Receptor Toll-Like-4 (TLR-4) e o Processo Fisiopatológico da Cardiomiopatia da Obesidade. *Arq. Bras. Cardiol.* **117**, 91–99 (2021).
43. Wong, C. & Marwick, T. H. Obesity cardiomyopathy : pathogenesis and pathophysiology. *Nat. Publ. Gr.* **4**, 436–443 (2007).
44. Lavie, C. J. *et al.* Impact of Obesity and the Obesity Paradox on

- Prevalence and Prognosis in Heart Failure. *JACC Hear. Fail* **1**, 93–102 (2013).
45. Ferron, A. J. T. *et al.* Tomato-oleoresin anti-inflammatory effect recovers obesity-induced cardiac dysfunction by modulating myocardial calcium handling. *Cell. Physiol. Biochem.* **54**, 1013–1025 (2020).
  46. Ferron, A. J. T. *et al.* Cardiac dysfunction induced by obesity is not related to  $\beta$ -adrenergic system impairment at the receptor-signalling pathway. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
  47. Garcia, J. L. *et al.* Rice (*Oryza sativa* L.) bran preserves cardiac function by modulating pro-inflammatory cytokines and redox state in the myocardium from obese rats. *Eur. J. Nutr.* **61**, 901–913 (2022).
  48. Shadrin, I., Khodabukus, A. & Bursac, N. Striated Muscle Function, Regeneration, and Repair. *Cell Mol Life Sci.* **73**, 4175–4202 (2016).
  49. Dutra, A. F., Nicola, A. L. P., Sousa, L. A., Yamaguti, S. T. F. & Da Silva, A. P. L. *Anatomia E Fisiologia Cardiovascular. Anatomia e fisiologia cardiovascular* (2019).
  50. Dangelo, J. G. & Fattini, C. A. *Anatomia humana sistêmica e segmentar.* (2011).
  51. Moore, K. L., Dalley, A. F. & Agur, A. M. *Clinically oriented anatomy. Lippincott.* (2007).
  52. Zimmerman, J. The functional and surgical anatomy of the heart. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **39**, 348–366 (1966).
  53. Zhang, R. & Reisin, E. Obesity-Hypertension: The Effects on Cardiovascular and Renal Systems. *Am J Hipertens.* **13**, 1308–1314 (2000).
  54. Pereira, B. L. B. Influência da suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio. (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2015).
  55. Moehlecke, Mi., Mazzuttl, G. & Schaan, B. D. O coração na obesidade: mecanismos e consequências. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo* **24**, 36–43 (2014).
  56. Mendes, O. D. C. *et al.* Remodelamento Cardíaco: Análise Seriada e

- Índices de Detecção Precoce de disfunção ventricular. *Arq. Bras. Cardiol.* **94**, 62–70 (2010).
57. Schirone, L. *et al.* A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1–16 (2017) doi:10.1155/2017/3920195.
  58. Alpert, M. A. Obesity cardiomyopathy: Pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **321**, 225–236 (2001).
  59. Alpert, M. A., Omran, J. & Bostick, B. P. Effects of Obesity on Cardiovascular Hemodynamics, Cardiac Morphology, and Ventricular Function. *Curr. Obes. Rep.* **5**, 424–434 (2016).
  60. Wong, C. Y. *et al.* Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation* **110**, 3081–3087 (2004).
  61. Chahal, H. *et al.* Obesity and right ventricular structure and function: The MESA- right ventricle study. *Chest* **141**, 388–395 (2012).
  62. Shimizu, I. & Minamino, T. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **97**, 245–262 (2016).
  63. Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 387–407 (2018).
  64. Murdolo, G. *et al.* Left Ventricular Hypertrophy and Obesity: Only a Matter of Fat? *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* **22**, 29–41 (2015).
  65. Nova, R., Madiyono, B., Sastroasmoro, S. & Sjarif, D. R. The impact of obesity on left ventricular mass and left ventricular systolic function in children. *Paediatr. Indones.* **45**, 171 (2016).
  66. Mill, J. G. & Vassallo, D. V. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens* **8**, 63–75 (2001).
  67. McMuller, J. . & Jennings, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **34**, 255–262 (2007).
  68. Olloquiegui, X. I. Estudio clínico y experimental de la hipertrofia ventricular izquierda por sobrecarga de presión y de su regresión. (Universidad de Cantabria, 2016).
  69. Mann, D. L. & Felker, G. M. *A companion to Braunwald's Heart Disease.*

(ELSEVIER, 2016).

70. Matsubara, L. S. *et al.* Remodelação miocárdica na sobrecarga crônica de pressão ou de volume no coração de ratos. *Arq. Bras. Cardiol.* **86**, 126–130 (2006).
71. Cavallera, M., Wang, J. & Frangogiannis, N. G. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: Pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities. *Transl. Res.* **164**, 323–335 (2014).
72. Medeiros, N. I. de, Gomes, J. de A. S. & Fares, R. C. G. A importância das metaloproteinases no remodelamento do miocárdio. *Pós Em Rev. Do Cent. Univ. Newt. Paiva* **2**, 167–170 (2012).
73. Kuusisto, J. *et al.* Low-grade inflammation and the phenotypic expression of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* **98**, 1007–1013 (2012).
74. Erten, Y. *et al.* An association between inflammatory state and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients. *Ren. Fail.* **27**, 581–589 (2005).
75. Polegato, B. F. Mecanismos envolvidos a cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos. (Univerdade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, Câmpus de Botucatu, 2011).
76. Cogni, A. L. *et al.* Metaloproteinases 2 e 9 são Preditoras de Remodelação Ventricular Esquerda após o Infarto do Miocárdio. *Arq. Bras. Cardiol.* **100**, 315–321 (2013).
77. Wang, X. *et al.* Protective effect of lycopene on cardiac function and myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats via the modulation of p38 and MMP-9. *J. Mol. Histol.* **45**, 113–120 (2014).
78. Zornoff, L. A. M., Paiva, S. A. R., Duarte, D. R. & Spadaro, J. Remodelação Ventricular Pós-Infarto do Miocárdio: Conceitos e Implicações Clínicas. *Arq. Bras. Cardiol.* **92**, 157–164 (2009).
79. Alberts, B. *et al.* Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. in *Biologia molecular da célula* (ed. ARTMED) 1131–1204 (2010).
80. Murphy, G. & Knäuper, V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the ‘Hemopexin’ domain? *Matrix Biol.* **15**, 511–518 (1997).

81. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
82. Johansson, N., Ahonen, M. & Kähäri, V. M. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 5–15 (2000).
83. Spinale, F. G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev.* **87**, 1285–1342 (2007).
84. Navarro, V. P., Nelson-Filho, P., Silva, L. A. B. & Freitas, A. C. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Rev. Odontol. da UNESP* **35**, 233–238 (2006).
85. Mishra, P. K., Metreveli, N. & Tyagi, S. C. MMP-9 gene ablation and TIMP-4 mitigate PAR-1-mediated cardiomyocyte dysfunction: A plausible role of dicer and miRNA. *Cell Biochem. Biophys.* **57**, 67–76 (2010).
86. Dantas, D. *et al.* Doxycycline Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Improving Myocardial Energy Metabolism in Rats. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **9**, 1–15 (2022).
87. Bourboulia, D. & Stetler-Stevenson, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin. Cancer Biol.* **20**, 161–168 (2010).
88. Shaker, O. & Sourour, D. A. How to Protect Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Male Albino Rats? *J Cardiovasc Pharmacol* **55**, 262–268 (2010).
89. Burke, R. M., Burgos Villar, K. N. & Small, E. M. Fibroblast contributions to ischemic cardiac remodeling. *Cell. Signal.* **77**, 1–12 (2021).
90. Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. R. & Zornoff, L. A. M. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* **106**, 62–69 (2016).
91. Silva-Bertani, D. C. T. da *et al.* A Redução do Colágeno Tipo I está Associada ao Aumento da Atividade da Metaloproteinase-2 e da Expressão Proteica de Leptina no Miocárdio de Ratos Obesos. *Arq Bras*

- Cardiol.* **115**, 61–70 (2019).
92. Martínez-Martínez, E. *et al.* Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: Potential role in obesity. *J. Hypertens.* **32**, 1104–1114 (2014).
  93. Hayashidani, S. *et al.* Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **285**, 1229–1235 (2003).
  94. DeLeon-Pennell, K. Y., Meschiari, C. A., Jung, M. & Lindsey, M. L. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **147**, 75–100 (2017).
  95. Zhao, S. *et al.* Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J. Cardiol.* **63**, 373–378 (2014).
  96. Silva, D. C. T. da. Influência da atividade das metaloproteinases 2 e 9 na diminuição do colágeno tipo I miocárdico em ratos obesos. (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, 2013).
  97. Cheng, Y., Zhu, Y., Zhang, J., Duan, X. & Zhang, Y. Grande Acúmulo de Colágeno e Aumento da Ativação de Mastócitos nos Corações de Ratos com Hiperlipidemia. *Arq. Bras. Cardiol.* **109**, 404–409 (2017).
  98. Eschalier, R. *et al.* Features of Cardiac Remodeling, Associated With Blood Pressure and Fibrosis Biomarkers, Are Frequent in Subjects With Abdominal Obesity. *Hypertension* **63**, 740–746 (2014).
  99. de Graaf, W. L., Vandoorne, K., Arslan, F., Nicolay, K. & Strijkers, G. J. Contrast-Enhanced T1-Mapping MRI for the Assessment of Myocardial Fibrosis. *Curr. Cardiovasc. Imaging Rep.* **7**, 1–12 (2014).
  100. Da Silva, D. C. T. *et al.* Influência do tempo de exposição à obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre os colágenos tipo I e III miocárdico. *Arq. Bras. Cardiol.* **102**, 157–164 (2014).
  101. Carroll, J. F. & Tyagi, S. C. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am. J. Hypertens.* **18**, 692–698 (2005).
  102. Duran, J., Martinez, A. & Adler, E. Cardiovascular manifestations of mitochondrial disease. *Biology (Basel)*. **8**, 1–27 (2019).

103. Brasil. Ministério da Saúde. Alimentos funcionais. 2009. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/alimento-funcionais/>. (2022).
104. Ma, T. *et al.* Sulforaphane, a natural isothiocyanate compound, improves cardiac function and remodeling by inhibiting oxidative stress and inflammation in a rabbit model of chronic heart failure. *Med. Sci. Monit.* **24**, 1473–1483 (2018).
105. Pereira, B. L. B. *et al.* Tomato (*Lycopersicon esculentum*) or lycopene supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction through different mechanistic pathways. *J. Nutr. Biochem.* **46**, 117–124 (2017).
106. Francisqueti, F. V. *et al.* Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals Submitted to High Sugar-Fat Diet. *Nutrients* **9**, 1–10 (2017).
107. Panchal, S. K., Poudyal, H. & Brown, L. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Nutr.* **142**, 1026–1032 (2012).
108. Mannucci, C. *et al.* Clinical Pharmacology of Citrus bergamia: A Systematic Review. *Phyther. Res.* **31**, 27–39 (2017).
109. Ballistreri, G. *et al.* Evaluation of lipid and cholesterol-lowering effect of bioflavonoids from bergamot extract. *Nat. Prod. Res.* **35**, 5378–5383 (2021).
110. Impellizzeri, D. *et al.* The anti-inflammatory and antioxidant effects of bergamot juice extract (BJe) in an experimental model of inflammatory bowel disease. *Clin. Nutr.* **34**, 1146–1154 (2015).
111. H&AD-Herbal & Antioxidant Derivatives. Available from: H&AD srl ©. <https://www.head-natural.com/> (2022).
112. Lamiquiz-Moneo, I. *et al.* Effect of bergamot on lipid profile in humans: A systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**, 3133–3143 (2020).
113. Maleki, S. J., Crespo, J. F. & Cabanillas, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* **299**, 1–11 (2019).
114. Magalhães, B. E. A. de & Santos, W. N. L. dos. Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico de infusões e decocções de ervas medicinais. in *PRODUTOS NATURAIS E SUAS APLICAÇÕES: DA COMUNIDADE*

*PARA O LABORATÓRIO* 234–347 (Editora Científica Digital, 2021).  
doi:10.37885/210203148.

115. Mollace, V. *et al.* Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: From animal models to human studies. *Fitoterapia* **82**, 309–316 (2011).
116. Musolino, V. *et al.* Bergamot Polyphenols Improve Dyslipidemia and Pathophysiological Features in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci. Rep.* **10**, 1–14 (2020).
117. Baron, G. *et al.* Analytical profile and antioxidant and anti-inflammatory activities of the enriched polyphenol fractions isolated from bergamot fruit and leave. *Antioxidants* **10**, 1–27 (2021).
118. Impellizzeri, D. *et al.* Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Flavonoid-Rich Fraction of Bergamot Juice (BJe) in a Mouse Model of Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury. *Front. Pharmacol.* **07**, (2016).
119. Risitano, R. *et al.* Flavonoid Fraction of Bergamot Juice Reduces LPS-Induced Inflammatory Response through SIRT1-Mediated NF-κB Inhibition in THP-1 Monocytes. *PLoS One* **9**, (2014).
120. Leo, M. De, Piragine, E., Pirone, A., Braca, A. & Pistelli, L. Protective Effects of Bergamot (*Citrus bergamia* Risso & Poiteau) Juice in Rats Fed with High-Fat Diet. *Planta Med.* **86**, 180–189 (2020).
121. Ferlemi, A. V. & Lamari, F. N. Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* **5**, 1–20 (2016).
122. Formisano, C. *et al.* Detailed Phytochemical Characterization of Bergamot Polyphenolic Fraction (BPF) by UPLC-DAD-MS and LC-NMR. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 3159–3167 (2019).

## **Capítulo 2- Artigo científico**

## Remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade: Efeito terapêutico do extrato das folhas de bergamota

Taynara Aparecida Vieira<sup>1</sup>; Erika Tiemi Nakandakare-Maia<sup>1</sup>; Juliana Silva Siqueira<sup>1</sup>; Thiago Luiz Novaga Palácio<sup>1</sup>; Ana Paula Dantas Ribeiro<sup>1</sup>; Marina Gaiato Monte<sup>1</sup>; Giovanna Baron<sup>2</sup>; Giancarlo Aldini<sup>2</sup>; Silméia Garcia Zanati Bazan<sup>1</sup>; Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron<sup>1</sup>; Lilian Cristina Pereira<sup>1</sup>; Artur Junio Togneri Ferron<sup>1</sup>; Camila Renata Corrêa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu.

<sup>2</sup>Universidade de Milão, Itália.

### Resumo

**Introdução:** Tendo em vista a importância da inflamação na patogênese dos distúrbios relacionados à obesidade, incluindo o remodelamento e disfunção cardíaca, a busca por diferentes estratégias terapêuticas anti-inflamatórias naturais são promissoras. A bergamota (*Citrus bergamia*) é uma fruta cítrica utilizada para a produção de óleo essencial e estudos demonstram resultados propícios com ação antioxidante e anti-inflamatória. **Objetivo:** Investigar o efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de bergamota (FB) no remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade. **Metodologia:** Ratos *Wistar* machos (n=32) foram distribuídos em 2 grupos: dieta controle (C, n=16 animais) e dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=16 animais) por 20 semanas. Após detectado remodelamento cardíaco por ecocardiografia, os grupos foram redistribuídos em: controle + placebo (C, n=6); controle + extrato das folhas de bergamota (C+FB, n=6); HSF + placebo (HSF, n=6); HSF + extrato das folhas de bergamota (HSF+ FB, n=6) por 10 semanas. A concentração do extrato foi 50mg/kg de peso, diluído em água e administrado diariamente por gavagem; os grupos placebo receberam água também por gavagem. Foram avaliados: parâmetros nutricionais e metabólicos, parâmetros cardiovasculares, marcadores inflamatórios cardíacos, atividade da metaloproteinase-2 (MMP-2) miocárdica e a expressão proteica do colágeno tipo III miocárdico. **Resultados:** O grupo HSF apresentou obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial sistólica, resistência à insulina, remodelamento e disfunção cardíaca; além dessas alterações, apresentou inflamação cardíaca e diminuição da atividade da MMP-2 ativa; a suplementação com FB foi eficaz em melhorar no grupo HSF a resistência à insulina, o remodelamento, a função cardíaca, bem como a inflamação, a atividade da MMP-2 ativa e a expressão proteica de colágeno tipo III miocárdico. **Conclusão:** O efeito anti-inflamatório da suplementação com FB melhorou a atividade das metaloproteinases atenuando o remodelamento e a disfunção cardíaca induzidos pela obesidade.

**Palavras-chave:** Obesidade; Inflamação; Remodelamento cardíaco; Colágeno; Bergamota.

## Introdução

Pesquisas mostram que o excesso de gordura corporal causa anormalidades cardíacas como alterações hemodinâmicas, morfológicas e funcionais, por diferentes mecanismos, associados à liberação de citocinas pró-inflamatórias e à expressão proteica de colágeno<sup>1-4</sup>. Em situações de aporte excessivo de nutrientes, há hipertrofia do tecido adiposo que desencadeia, inicialmente, um processo inflamatório local, caracterizado pelo aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) e de proteína quimio atraiante de monócitos-1 (MCP-1), que estão fortemente envolvidas na etiologia da cardiomiopatia relacionada à obesidade. Estudos recentes publicados por nosso grupo de pesquisa demonstram que esse quadro culmina com a produção cardíaca de citocinas inflamatórias através da ativação da via do tipo *Toll 4* (*Toll-like receptor 4* - TLR-4)<sup>1,5,6</sup>. O colágeno é o principal componente da matriz extracelular cardíaca (MEC), principalmente do tipo I e III, importantes para a manutenção da arquitetura e função cardíaca. Em contextos onde ocorra alterações no colágeno intersticial miocárdico, resultado da elevação de sua síntese ou uma diminuição da degradação, acaba conduzindo ao aumento da rigidez do tecido, culminando no processo de remodelamento cardíaco bem estabelecido na literatura em modelos de sobrecarga de pressão e volume<sup>3,7-10</sup>.

Apesar de ser evidente que uma variedade de alterações e/ou danos no desempenho cardíaco ocorram com a elevação das citocinas pró-inflamatórias e do colágeno intersticial, os mecanismos relacionados à modulação dessas respostas não estão bem estabelecidos em modelo de obesidade. Uma das possibilidades é o envolvimento de enzimas proteolíticas chamadas de metaloproteinases de matriz (MMPs), conhecidas por serem responsáveis pela degradação das fibras de colágeno e que podem ser moduladas por citocinas pró-inflamatórias em diferentes modelos<sup>11-13</sup>, em especial a MMP-2, uma das mais abundantes no miocárdio e que está relacionada ao processo de remodelamento<sup>13,14</sup>.

Desta forma, considerando a importância da inflamação na patogênese dos distúrbios relacionados à obesidade, incluindo o remodelamento e disfunção cardíaca, a busca por diferentes estratégias terapêuticas anti-inflamatórias naturais apresentam possibilidades promissoras. Assim, a Bergamota (*Citrus bergamia*), é uma fruta cítrica utilizada para a produção de óleo essencial, que se difere das demais não apenas

pela composição de seu perfil de flavonoides presentes no suco da fruta, mas também pelo teor particularmente alto desses compostos, que vem despertando interesse científico por desempenharem atividades hipolipêmicas, hipoglicêmicas, anti-inflamatórias e antioxidantes mostrando-se eficazes no tratamento dos parâmetros que compõem a síndrome metabólica<sup>15-18</sup>. Recentemente, algumas investigações mostraram maior concentração dos compostos fenólicos na folha em comparação ao fruto, indicando um maior potencial terapêutico<sup>19,20</sup>.

Portanto, diante da escassez de trabalhos que abordem o efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de bergamota (FB) no tratamento de doenças cardíaca associadas à obesidade, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito anti-inflamatório do FB no remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade.

## **Materiais e métodos**

### **Animais e protocolo experimental**

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo, Brasil (CEUA: 1393/2021), e cumpriram as recomendações do *Guide for the Care and Use of Experimental Animals*.

Neste estudo, foram utilizados ratos *Wistar* machos (n=32), com 30 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos para receberem dieta controle (C, n=16 animais), e a dieta rica em açúcar e gordura (*High Sugar-Fat Diet*) (HSF, n=16) por um período de 20 semanas. Na 20<sup>a</sup> semana, foi detectado remodelamento cardíaco por ecocardiografia e os animais foram novamente redistribuídos em 4 grupos para iniciar o tratamento com o extrato das folhas de bergamota por mais 10 semanas: dieta controle + placebo (C, n=6 animais), dieta controle + extrato das folhas de bergamota (C+FB, n=6 animais), *High Sugar-Fat Diet* + placebo (HSF, n=6 animais), *High Sugar-Fat Diet* + extrato das folhas de bergamota (HSF+FB, n=6 animais). Os animais foram alojados em gaiolas individuais sob temperatura (24 ± 2°C) e umidade controladas (55±5%), ciclo claro-escuro (12-12hs) e receberam ração e água *ad libitum*. Os grupos HSF também receberam 25% de sacarose na água potável,

enquanto os controles receberam água potável sem qualquer suplementação. Esse modelo dietético segue o padrão já estabelecido e publicado por nosso grupo de pesquisa<sup>21</sup>.

Ao final de 30 semanas, os animais foram anestesiados com tiopental (120mg/Kg/IP) e eutanasiados por decapitação após verificação da ausência dos reflexos palpebral, podal, interdigital e caudal, afim de coletar o sangue e amostras cardíacas necessários para as avaliações.

### **Critério de seleção dos animais**

Após 20 semanas de protocolo experimental, foi construído um intervalo de confiança de 95% para o remodelamento cardíaco nos animais HSF e C, chamado de ponto de separação (PS), que corresponde ao ponto médio entre o limite superior do grupo controle e o limite inferior do grupo HSF. A partir deste ponto, os animais controles com espessura relativa do ventrículo esquerdo, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e índice de massa do ventrículo esquerdo acima do PS e os animais HSF com valores de espessura relativa do ventrículo esquerdo, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e índice de massa do ventrículo esquerdo abaixo do PS foram excluídos dos grupos C e HSF, respectivamente, garantindo a homogeneidade dos grupos tratado e controle. Esse critério foi adotado porque na experimentação biológica mesmo garantindo todas as condições igualitárias para respostas fisiológicas idênticas, podem ocorrer erros de classificação. Portanto, animais submetidos ao mesmo modelo de experimentação animal nem sempre apresentam a resposta esperada. Assim, 8 animais de cada grupo foram excluídos do experimento.

### **Composição das dietas**

O modelo dietético padronizado pelo nosso grupo de pesquisa era composto por dois tipos de dietas: controle e HSF. A dieta controle continha farelo de soja, sorgo, casca de soja, dextrina, óleo de soja, vitaminas e minerais. Já a dieta HSF foi constituída de farelo de soja, sorgo, casca de soja, dextrina, vitaminas e minerais em quantias distintas, acrescida de frutose, banha suína e além de 25% de sacarose na água de beber. Os nutrientes e a composição nutricional de cada dieta foram descritos em nosso estudo anterior<sup>21</sup>.

## **Extrato das folhas de bergamota e administração**

Para a extração dos polifenóis, as folhas de bergamota foram colhidas em uma fazenda localizada na região de Reggio Calabria, Itália, picadas e adicionadas a uma solução de água/etanol. Em seguida, o etanol foi destilado e a solução de água clarificada foi passada por uma camada de resinas absorventes de poliestireno com poros, diâmetro compreendido entre 100 e 150 Angstrom. Os polifenóis retidos foram extraídos por eluição do leito de resinas com etanol puro. A solução etanólica obtida foi destilada a temperatura de até 40°C, obtendo-se um concentrado de água residual e polifenóis, que foi seco por pulverização, assim resultando em um pó com menos de 4,0% de umidade<sup>19</sup>. Esse extrato seco foi obtido na H&AD (*Herbal & Antioxidant Derivatives Srl*) localizada em *Località Chiusi*, 89032 Bianco (RC), Itália ([www.head-sa.com](http://www.head-sa.com)).

A administração ocorreu diariamente por gavagem com o extrato diluído em água potável na concentração de 50 mg/Kg de peso. Essa dose foi estabelecida de acordo com dados da literatura que utilizaram essa concentração em estudos com o suco da fruta, uma vez que não existem trabalhos que utilizaram o extrato das folhas de bergamota<sup>17,22</sup>.

## **Parâmetros nutricionais e metabólicos**

O perfil nutricional foi avaliado de acordo com a ingestão calórica, ingestão hídrica, ingestão alimentar, peso corporal, eficiência alimentar e índice de adiposidade. A ingestão calórica foi determinada multiplicando o valor energético de cada dieta (g x Kcal) pelo consumo diário de alimentos. Para o grupo HSF, a ingestão calórica também incluiu as calorias da água (0,25 x 4 x mL consumidas); as ingestões hídricas e alimentares foram calculadas diariamente a partir das sobras individuais de cada animal. O peso corporal foi verificado e registrado semanalmente, permitindo o acompanhamento do ganho de peso durante todo o período experimental. Para analisar a capacidade de conversão da energia ingerida em peso corporal, a eficiência alimentar foi calculada dividindo-se o ganho total de peso corporal pela energia total ingerida x 100. O índice de adiposidade foi utilizado como indicador de obesidade na 30ª semana, permitindo avaliar precisamente a quantidade de gordura corporal dos animais. Após a eutanásia foram dissecados os depósitos de gordura epididimal, visceral e retroperitoneal dos animais. A soma dos depósitos normalizada pelo peso

corporal [(epididimal+retroperitoneal+visceral) /peso corporal x 100] foi considerada o índice de adiposidade<sup>23</sup>.

Após jejum de 8 horas, o sangue foi coletado e o plasma utilizado para dosagem dos parâmetros bioquímicos. Os níveis de triglicerídeos foram medidos com um sistema analisador enzimático automático (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). O modelo homeostático de resistência à insulina (*homeostatic model assessment of insulin resistance- HOMA-IR*) foi considerado marcador de resistência à insulina, calculado de acordo com a fórmula:  $HOMA-IR = (\text{glicemia de jejum (mmol/L)} \times \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/mL})) / 22.5^4$ .

### **Pressão arterial sistólica**

A análise da pressão arterial sistólica (PAS) caudal foi realizada por meio da técnica de pletismografia, utilizando-se eletroesfigmomanômetro Narco Bio-System® PE 300, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, Houston, TX, USA). Os animais foram aquecidos (38-40°C), durante 5 minutos, em uma caixa de madeira (50x40 cm) forrada com maravalha de Pinus autoclavada, com a finalidade de causar vasodilatação da artéria caudal<sup>24</sup>. Em seguida, o manguito conectado a transdutor de pulso foi acoplado à cauda do animal, sendo posteriormente insuflado (200 mmHg) e desinsuflado, respectivamente, para registro das pulsações arteriais. Os registros foram coletados em polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA). A média de três leituras de pressão foram obtidas para cada animal.

### **Estudo ecocardiográfico**

A análise foi realizada com animais vivos por ecocardiograma transtorácico, utilizando um sistema Vivid S6 equipado com um transdutor ultrassônico multifrequência de 5,0 a 11,5 MHz (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel). Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg). Apenas um examinador realizou todos os exames. Para as medidas estruturais do coração, as imagens foram obtidas no modo unidimensional (modo M) guiadas pelas imagens no modo bidimensional com o transdutor na posição paraesternal, eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor modo M logo abaixo do plano da válvula mitral ao nível dos músculos papilares<sup>25-27</sup>.

Foram analisados os seguintes parâmetros estruturais do VE: diâmetro diastólico do VE (DDVE), espessura diastólica da parede posterior (EDPP), espessura diastólica do septo-interventricular (EDSIV), índice de massa do VE (Índice MVE) e espessura relativa da parede do VE (Esp.Rel.VE). A função sistólica do VE foi avaliada pela fração de ejeção (FE) e velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). A função diastólica do VE foi avaliada pelo tempo de relaxamento isovolumétrico do VE (TRIV), tempo de desaceleração da onda E (TDE), pela relação entre as velocidades de entrada diastólica precoce (onda E) e tardia da mitral (onda A) (relação E/A) e a relação entre a velocidade diastólica E do fluxo mitral e a velocidade diastólica E' do anel mitral (relação E/E')<sup>28</sup>.

### **Parâmetros inflamatórios cardíaco**

O tecido cardíaco foi homogeneizado (ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA® Werke Staufen/Alemanha) em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4 e centrifugado a 800 x g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi usado para análise. Os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e proteína quimio atraiante de monócitos-1 (MCP-1) foram medidos usando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kits comerciais específicos (R&D SystemsR, Minneapolis, MN, USA). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de microplaca (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram corrigidos pela quantidade de proteínas.

### **Atividade da metaloproteinase 2 miocárdica**

A atividade da MMP-2 miocárdica foi determinada pela técnica de Zimografia conforme descrito por Tyagi et al<sup>29</sup>. Foram usadas seis amostras em cada grupo para garantir que todas as amostras fossem analisadas na mesma corrida de eletroforese para evitar variações entre géis. Resumidamente, os tecidos do ventrículo esquerdo foram homogeneizados em tampão de lise (Tris 50mM, pH 7,4, NaCl 0.2M, Triton-X 0,1% e CaCl<sub>2</sub> 10mM). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado e o sobrenadante transferido para tubos eppendorfs e armazenados em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford, utilizando as curvas de BSA *Protein Standard* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão. Após a

quantificação da concentração proteica, as amostras das proteínas foram diluídas em tampão (Tris 0,5M, pH 6,8, 100% de glicerol e 0,05% de azul de bromo-fenol) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, 33 USA). As amostras, contendo 20µg de proteínas, foram distribuídas em gel de SDS-poliacrilamida 8%, com 1% de gelatina. A corrida eletroforética foi efetuada a 100V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), aproximadamente por 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%) até o azul de bromofenol atingir o fundo do gel. Esse gel foi removido e lavado duas vezes por 30 minutos com Triton-X 100 e depois, lavado duas vezes de 5 minutos com solução Tris 50mM, pH 8,4. O gel então, foi incubado a 37°C *overnight* em solução de ativação (Tris 50mM, pH 8,4 e CaCl<sub>2</sub> 5mM). A coloração do gel foi feita com 0,5% de *comassie blue*, por 2h e a descoloração com solução de 30% de metanol e 10% ácido acético até o clareamento das bandas sobre fundo escuro. O processo de coloração e descoloração foi realizado em temperatura ambiente, em agitador. Em seguida, o gel foi fotografado e a intensidade da ação gelatinolítica (bandas claras) analisada em analisador de imagem UV-UVP White Darkhon. As análises quantitativas das bandas proteicas (blots) foram realizadas pelo fotodocumentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

### **Expressão proteica do colágeno tipo III miocárdico**

O tecido do ventrículo esquerdo foi analisado por western blot para quantificar os níveis proteicos de colágeno tipo III. Resumidamente, amostras congeladas do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão de extração *radioimmuno precipitation assay* (RIPA) em um dispositivo Polytron (Ika Ultra Turrax<sup>TM</sup> T25 Basic, Wilmington, EUA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína realizada por método de Bradford. As amostras extraídas foram armazenadas a -80°C.

Antes da utilização, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli e aplicadas em gel de poliacrilamida com concentração variando de 8 a 15%, a depender do peso da proteína a ser analisada (colágeno III tem peso molecular alto e a concentração do gel pode ser um pouco menor). Foi realizada eletroforese em sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, EUA), a 4°C, a 50 V por 30 minutos e a 120 V por 2 horas.

Após a eletroforese, os géis foram transferidos para as membranas de nitrocelulose por meio da utilização de sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, EUA) em sistema de transferência úmido por 90min, a 120 V e a 4°C, utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e Sódio dodecil sulfato 0,1%). A seguir, as membranas foram bloqueadas em solução de leite em pó desnatado a 2% em temperatura ambiente por 2 horas, para prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário, e lavadas com tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20. Foram acrescentados anticorpos primários monoclonais de coelhos para colágeno III (1:1.000) e  $\beta$ -actina (1:1.000) da Abcam (Cambridge, USA) e, em seguida, as membranas foram incubadas por uma noite a 4°C sob constante agitação. No dia subsequente, após três lavagens com solução basal (Tris 1 M pH 8,0; NaCl 2,5 M e detergente Tween 20), as membranas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente com os anticorpos secundários anti-coelho conjugados com peroxidase (diluição 1:5.000) adequados para a ligação com os anticorpos primários utilizados, de acordo com as recomendações do fabricante e novamente lavadas duas vezes em solução basal.

A imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, EUA). O fotodocumentador utilizado foi o ImageQuant LAS 4000 (General Eletrikcs) e as imagens geradas foram analisadas pelo programa ImageJ (Java-based image-processing and analysis software, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) e as bandas foram quantificadas por densitometria. Como controle endógeno, foi utilizada a proteína  $\beta$ -actina. Os resultados obtidos para a proteína alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva  $\beta$ -actina.

### **Análise estatística**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou mediana (intervalo interquartil) conforme a distribuição amostral. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância *Two Way* ANOVA e complementadas com post-hoc de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas usando Sigma Stat para Windows Versão 3.5. (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA). O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Os parâmetros nutricionais e metabólicos estão apresentados na tabela 2. Nota-se que o grupo HSF apresentou peso corporal final, ganho de peso, ingestão hídrica, ingestão calórica, índice de adiposidade, triglicerídeos e resistência à insulina aumentados, no entanto, a ingestão alimentar foi diminuída quando comparado ao controle. Por outro lado, o grupo HSF+FB apresentou melhora na resistência à insulina mostrado pelo HOMA-IR em comparação ao HSF.

**Tabela 2: Parâmetros nutricionais e metabólicos**

	Grupos				Efeitos		
	C	C+FB	HSF	HSF+FB	Dieta	FB	Interação
<b>Peso corporal inicial (g)</b>	183 ± 26	211 ± 23	195 ± 21	199 ± 27	0,994	0,357	0,162
<b>Peso corporal final (g)</b>	464 ± 55	519 ± 43	594 ± 93*	575 ± 62	0,002	0,998	0,035
<b>Ganho de peso (g)</b>	281 ± 42	309 ± 34	399 ± 84*	376 ± 43	<0,001	0,651	0,052
<b>Ingestão alimentar (g/dia)</b>	23,2 ± 2,4	25,8 ± 1,1	13,1 ± 1,7*	12,6 ± 1,2 <sup>Ω</sup>	<0,001	0,712	0,034
<b>Ingestão hídrica (mL/dia)</b>	34,2 ± 2,7	38,0 ± 6,4	51,7 ± 3,6*	49,5 ± 5,8 <sup>Ω</sup>	<0,001	0,567	0,134
<b>Ingestão calórica (Kcal/dia)</b>	84,5 ± 8,6	93,3 ± 5,0	108,6 ± 6,0*	104,2 ± 10,2 <sup>Ω</sup>	<0,001	0,960	0,022
<b>Eficiência alimentar (%)</b>	1,53 ± 0,18	1,53 ± 0,15	1,75 ± 0,37	1,73 ± 0,23	0,153	0,785	0,477
<b>Índice de adiposidade (%)</b>	3,93 ± 1,52	3,95 ± 0,81	8,58 ± 2,64*	7,20 ± 3,75 <sup>Ω</sup>	<0,001	0,733	0,624
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	26,7 ± 5,1	31,7 ± 2,4	87,0 ± 26,3*	68,8 ± 34,7 <sup>Ω</sup>	<0,001	0,472	0,212
<b>HOMA-IR</b>	2,30 ± 1,02	3,66 ± 1,88	6,49 ± 1,39*	3,70 ± 0,76 <sup>#</sup>	<0,001	0,102	<0,001

Dados são expressos em média ± desvio padrão (n=6 animais/grupo). Os dados foram comparados por *Two-way* ANOVA com post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). C: controle + placebo; C+FB: Controle + extrato das folhas de bergamota; HSF: *High Sugar-Fat Diet* + placebo; HSF+FB: *High Sugar-Fat Diet* + extrato das folhas de bergamota. FB: extrato das folhas de bergamota. \* vs C; # vs HSF; <sup>Ω</sup> vs C+FB.

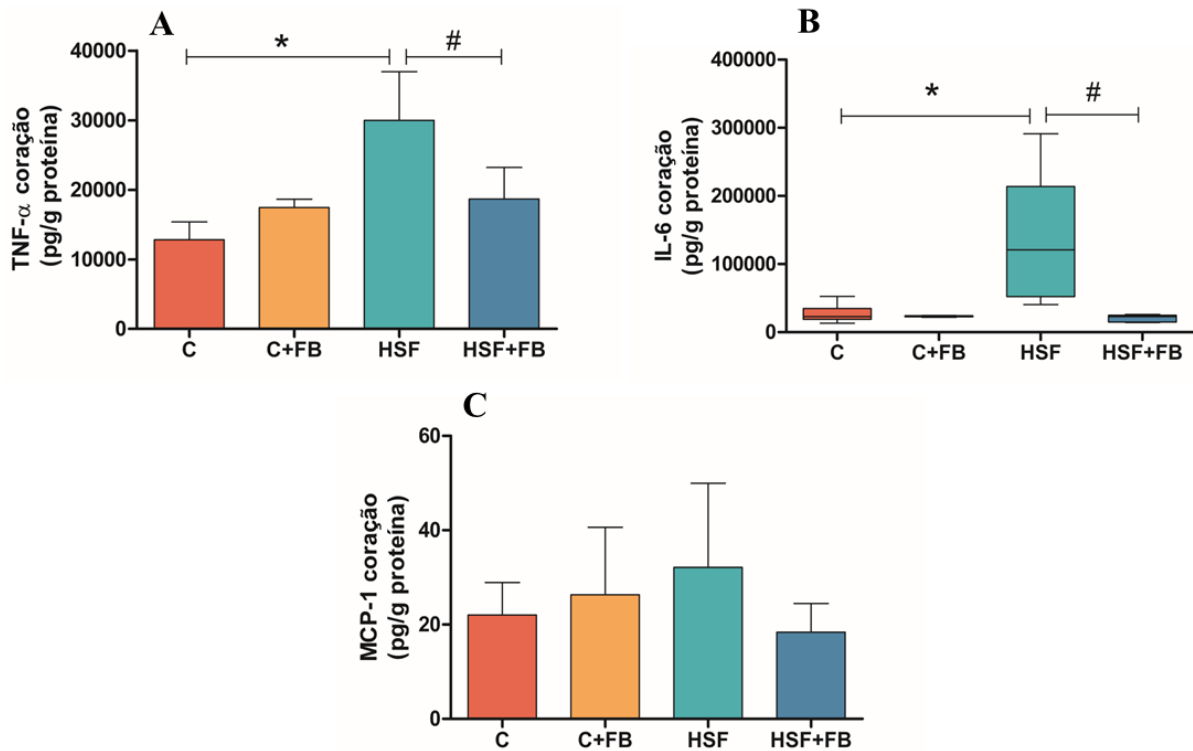
A tabela 3 representa os parâmetros cardiovasculares. É possível observar que o grupo HSF apresentou remodelação cardíaca caracterizada por alterações nas variáveis morfológicas (DDVE, EDPP, EDSIV, Índice MVE, Esp.rel.VE), disfunção sistólica e diastólica (FE, VEPP, TRIV, TDE, E/E') e aumento da PAS. Entretanto, o tratamento com o extrato das folhas de bergamota no grupo HSF+FB foi capaz de atenuar o remodelamento cardíaco e recuperar as funções sistólica e diastólica em relação ao grupo HSF.

**Tabela 3: Parâmetros cardiovasculares**

	Grupos								Efeitos		
	C		C+FB		HSF		HSF+FB		Dieta	FB	Interação
<b>DDVE (mm)</b>	6,90 ±	0,28	6,83 ±	0,54	7,79 ±	0,34*	7,43 ±	0,03 <sup>Ω</sup>	<0,001	0,149	0,313
<b>EDPP (mm)<sup>1</sup></b>	1,50	(1,53-1,45)	1,51	(1,53-1,50)	1,82	(2,04-1,79)*	1,53	(1,53-1,53) <sup>#</sup>	<0,001	0,007	0,002
<b>EDSIV (mm)<sup>1</sup></b>	1,53	(1,53-1,53)	1,53	(1,55-1,50)	1,97	(1,79-2,14)*	1,58	(1,53-1,60) <sup>#</sup>	<0,001	0,003	0,003
<b>Índice MVE</b>	1,47 ±	0,23	1,36 ±	0,26	1,90 ±	0,29*	1,38 ±	0,15 <sup>#</sup>	0,034	0,004	0,055
<b>Esp.rel.VE</b>	0,43 ±	0,02	0,43 ±	0,05	0,49 ±	0,04*	0,41 ±	0,01 <sup>#</sup>	0,143	0,012	0,008
<b>FE (%)</b>	0,94 ±	0,02	0,93 ±	0,01	0,90 ±	0,02*	0,94 ±	0,01 <sup>#</sup>	0,005	0,042	0,001
<b>VEPP (mm/s)</b>	83,8 ±	6,3	81,2 ±	3,4	60,8 ±	11,2*	76,3 ±	4,7 <sup>#</sup>	<0,001	0,038	0,005
<b>TRIV (ms)<sup>1</sup></b>	22,3	(23,0-22,0)	21,8	(22,0-21,0)	31,6	(37,0-30,0)*	21,5	(23,0-20,0) <sup>#</sup>	0,001	<0,001	<0,001
<b>TDE (ms)</b>	43,5 ±	0,8	43,5 ±	3,1	55,5 ±	8,1*	44,8 ±	3,9 <sup>#</sup>	0,003	0,013	0,013
<b>E/A</b>	1,88 ±	0,39	1,81 ±	0,34	1,96 ±	0,48	1,84 ±	0,41	0,771	0,568	0,895
<b>E/E'</b>	13,7 ±	1,3	13,4 ±	2,1	22,6 ±	4,7*	14,1 ±	1,2 <sup>#</sup>	<0,001	<0,001	0,001
<b>PAS</b>	120 ±	4	125 ±	4	141 ±	7*	139 ±	10 <sup>Ω</sup>	<0,001	0,639	0,272

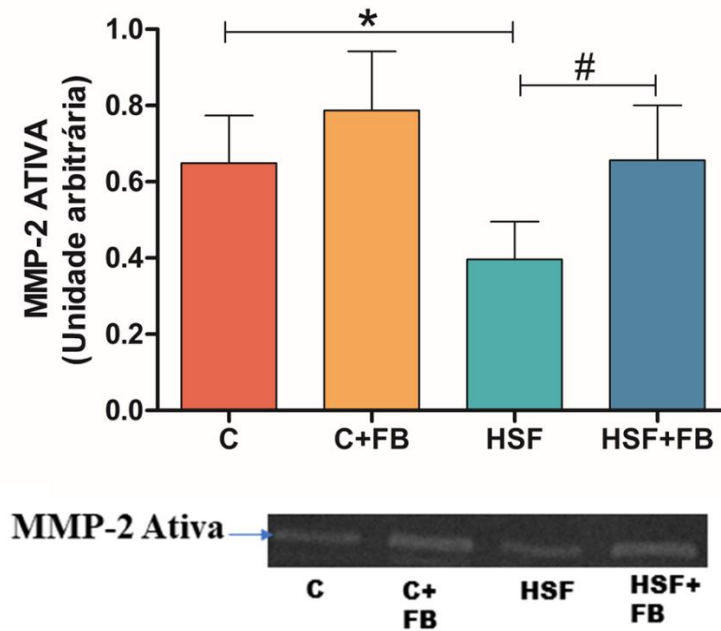
DDVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; EDPP: Espessura diastólica da parede posterior; EDSIV: Espessura diastólica do septo-interventricular; Índice MVE: Índice de massa do ventrículo esquerdo; Esp.rel.VE: Espessura relativa do ventrículo esquerdo; FE: Fração de ejeção; VEPP: Velocidade de encurtamento da parede posterior; TRIV: Tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: Tempo de desaceleração da onda E; Relação E/A: razão diastólica da velocidade de influxo mitral; Relação E/E': razão entre a velocidade diastólica precoce E do fluxo mitral e a velocidade diastólica precoce E' do anel mitral; PAS: Pressão arterial sistólica. Dados são expressos em média ± desvio padrão ou <sup>1</sup>Mediana (intervalo interquartilico) (n=6 animais/grupo). Os dados foram comparados por *Two-way* ANOVA com post-hoc de Tukey ( $p<0,05$ ). C: controle + placebo; C+FB: controle + extrato das folhas de bergamota; HSF: *High Sugar-Fat Diet* + placebo; HSF+FB: *High Sugar-Fat Diet* + extrato das folhas de bergamota. FB: extrato das folhas de bergamota. \* vs C; <sup>#</sup>vs HSF; <sup>Ω</sup>vs C+FB.

A figura 9 mostra os parâmetros inflamatórios cardíacos. Em relação aos níveis de TNF-  $\alpha$  (Fig.9A) e IL-6 (Fig.9B), observa-se que o grupo HSF apresentou níveis mais elevados em relação ao grupo controle, representando um estado inflamatório. Em contrapartida, o tratamento com o extrato das folhas de bergamota foi eficaz em atenuar a concentração de parâmetros inflamatórios cardíacos no grupo HSF+FB em relação ao grupo HSF. Não foram observadas alterações significativas nos níveis de MCP-1 (Fig.9C).



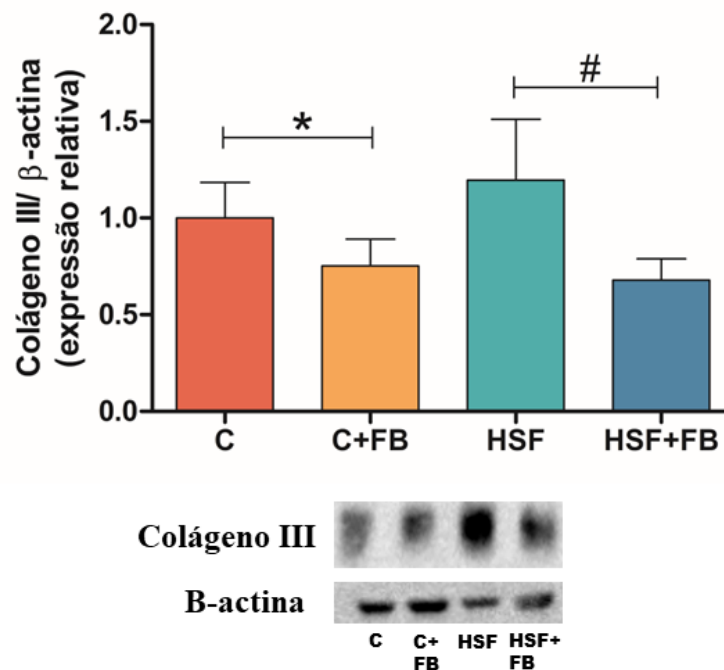
**Figura 9:** Parâmetros inflamatórios cardíacos. A- Fator de necrose tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ , pg/g proteína); B- Interleucina-6 (IL-6, pg/g proteína); C- Proteína quimio atrante de monócitos-1 (MCP-1, pg/g proteína). Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão ou mediana (intervalo interquartilico) (n= 6 animais/grupo). Os dados foram comparados por *Two-way* ANOVA com post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). C: controle + placebo; C+FB: controle + extrato das folhas de bergamota; HSF: *High Sugar-Fat Diet* + placebo; HSF+FB: *High Sugar-Fat Diet* + extrato das folhas de bergamota. \*vs C; #vs HSF.

A figura 10 mostra a atividade da Metaloproteinase 2 (MMP-2) no tecido cardíaco, em sua forma ativa. É possível observar que o grupo HSF apresentou diminuição da atividade da MMP-2 quando comparado ao controle. No entanto, a suplementação com o extrato das folhas de bergamota ocasionou o aumento da forma ativa no grupo obeso, quando comparado ao grupo HSF.



**Figura 10:** Metaloproteinase 2 ativa (MMP-2 ativa). Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=6 animais/grupo). Os dados foram comparados por *Two-way* ANOVA com post-hoc de Tukey ( $p<0,05$ ). C: controle + placebo; C+FB: controle + extrato das folhas de bergamota; HSF: *High Sugar-Fat Diet* + placebo; HSF+FB: *High Sugar-Fat Diet* + extrato das folhas de bergamota. \*vs C; #vs HSF.

A figura 11 mostra a expressão relativa do colágeno III/  $\beta$ -actina no tecido cardíaco. Nota-se que o grupo C apresentou maior expressão proteica de colágeno quando comparado ao grupo C+FB. Já o grupo HSF+FB mostrou uma diminuição na expressão, quando comparado ao grupo HSF.



**Figura 11:** Expressão relativa do colágeno III/β-actina. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (n=6 animais/grupo). Os dados foram comparados por *Two-way* ANOVA com post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). C: controle + placebo; C+FB: controle + extrato das folhas de bergamota; HSF: *High Sugar-Fat Diet* + placebo; HSF+FB: *High Sugar-Fat Diet* + extrato das folhas de bergamota. \*vs C; #vs HSF.

## Discussão

De acordo com a literatura, dietas ricas em gorduras e carboidratos, podem ser responsáveis pela pandemia de obesidade e de distúrbios relacionados ao excesso de gordura corporal, como resistência à insulina, diabetes tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemia, dentre outras<sup>21,30-32</sup>. Os achados do presente estudo corroboram com a literatura, já que os grupos HSF desenvolveram obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial sistólica e resistência à insulina, mostrando a eficácia do modelo dietético em proporcionar a obesidade e seus distúrbios relacionados<sup>21</sup>; em contrapartida, os animais HSF suplementados com o FB demonstraram melhora na resistência à insulina. A literatura reporta que tanto a fruta quanto o extrato das folhas de bergamota compartilham a mesma classe de compostos polifenólicos, e alguns deles, como flavonas e flavanonas, em maiores concentrações na folha, mostram resultados promissores por desempenharem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios que culminam com a melhora da captação da glicose<sup>17,19,22</sup>.

Diversos estudos em modelo experimental e humano tem buscado estabelecer um modelo dietético capaz de induzir o remodelamento e a disfunção cardíaca<sup>1,3-6,22,33-35</sup>. Essa condição foi confirmada neste estudo, uma vez que o grupo HSF apresentou remodelação cardíaca (através do aumento do DDVE, EDPP, EDSIV,

Índice MVE e da Esp.rel.Ve), acompanhada do comprometimento da função ventricular sistólica e diastólica (através da diminuição da FE, VEPP e aumento do TRIV, TDE e da razão entre E/E'). Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito anti-inflamatório do extrato das folhas de bergamota no remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade. Os resultados mostraram que a suplementação com extrato das folhas de bergamota no grupo HSF foi eficaz em atenuar a remodelação cardíaca e recuperar as funções sistólica e diastólica. De acordo com a literatura, o remodelamento induzido pela obesidade pode ser explicado por vários mecanismos<sup>1,4-6,33</sup>, dentre eles o estado inflamatório crônico e de baixo grau<sup>36</sup> caracterizado pelo aumento da produção de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>1,5,6</sup>, que atuam em processos importantes no coração, como o desenvolvimento da disfunção ventricular esquerda, remodelação ventricular e na hipertrofia do miócito<sup>6,37</sup>. Os nossos achados confirmam as evidências da associação entre remodelamento cardíaco e a inflamação, uma vez que os níveis cardíacos de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram maiores no grupo HSF, sendo responsável pelas alterações cardíacas, além disso o grupo HSF+FB mostrou recuperação das alterações cardíacas concomitante a menor nível de citocinas inflamatórias, confirmando o potencial anti-inflamatório do extrato das folhas de bergamota.

Uma das hipóteses que explica o envolvimento das citocinas inflamatórias no processo de remodelamento cardíaco é a sua capacidade de modular a deposição de colágeno via atividade das MMPs de matriz, que desempenham um papel fundamental na atividade colagenolítica cardíaca, especialmente a atividade da MMP-2 conhecida por ser importante para o processo de remodelamento podendo degradar os colágenos intersticiais tipo I e III, responsáveis pela rigidez cardíaca<sup>7,11,13,14</sup>. Diferentes modelos têm sido utilizados para investigar a participação da via MMP-Colágeno no remodelamento cardíaco<sup>11,12,38-40</sup>, dentre eles o mais utilizado é modelo de infarto do miocárdio com resultados bem estabelecidos<sup>7,38,41</sup>, entretanto poucos estudos tem investigado a participação desta via em modelos de obesidade<sup>11,42</sup>.

Em nosso trabalho podemos notar que a atividade da MMP-2 em sua forma ativa estava diminuída no grupo HSF e aumentada no grupo HSF+FB, confirmando a capacidade das citocinas inflamatórias em modular a atividade das metaloproteinases. Como consequência, a expressão relativa do colágeno tipo III apresentou diminuição significativa nos grupos que foram suplementados com o extrato das folhas de

bergamota. Alguns trabalhos que analisaram a expressão proteica de colágeno I e III no coração de animais obesos<sup>11,42,43</sup>, mostraram que não houve alterações na expressão do colágeno III mas houve no colágeno I<sup>43</sup>, já outros autores exibiram aumento em ambos os tipos de colágenos<sup>11,42</sup>.

Portanto, a escassez e divergências entre os trabalhos apresentados na literatura fortalecem a importância deste trabalho, neste sentido, nossos achados confirmam nossa hipótese que a capacidade anti-inflamatória do extrato das folhas de bergamota foi responsável pela modulação da atividade da MMP-2 e consequentemente a expressão de colágeno tipo III cardíaco, sendo este um dos mecanismos responsáveis pelo esclarecimento do remodelamento e disfunção cardíaca em modelo experimental de obesidade. Além disso, estudos futuros são necessários para abordar os mecanismos pelos quais as citocinas inflamatórias são responsáveis pela modulação da atividade das metaloproteinases no processo de remodelamento cardíaco em modelo experimental de obesidade.

## Conclusão

Assim, é possível concluir que o efeito anti-inflamatório da suplementação com extrato das folhas de bergamota melhorou a atividade das metaloproteinases atenuando o remodelamento e a disfunção cardíaca induzidos pela obesidade.

## Referências bibliográficas

1. Garcia, J. L. *et al.* Rice (*Oryza sativa* L.) bran preserves cardiac function by modulating pro-inflammatory cytokines and redox state in the myocardium from obese rats. *Eur. J. Nutr.* **61**, 901–913 (2022).
2. Ferron, A. J. T. *et al.* Cardiac dysfunction induced by obesity is not related to  $\beta$ -adrenergic system impairment at the receptor-signalling pathway. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
3. Oliveira, S. M. de *et al.* Cardiac remodeling in obesity-resistance model is not related to collagen I and III protein expression. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 1–9 (2021) doi:10.36660/ijcs.20200058.
4. Ferron, A. J. T. *et al.* Protective effect of tomato-oleoresin supplementation on oxidative injury recovers cardiac function by improving  $\beta$ -adrenergic response in a diet-obesity induced model. *Antioxidants* **8**, 1–12 (2019).

5. Ferron, A. J. T. *et al.* Tomato-oleoresin anti-inflammatory effect recovers obesity-induced cardiac dysfunction by modulating myocardial calcium handling. *Cell. Physiol. Biochem.* **54**, 1013–1025 (2020).
6. Alves, P. H. R. *et al.* Relação entre Resposta Imune Inata do Receptor Toll-Like-4 (TLR-4) e o Processo Fisiopatológico da Cardiomiopatia da Obesidade. *Arq. Bras. Cardiol.* **117**, 91–99 (2021).
7. Cogni, A. L. *et al.* Metaloproteinases 2 e 9 são Preditoras de Remodelação Ventricular Esquerda após o Infarto do Miocárdio. *Arq. Bras. Cardiol.* **100**, 315–321 (2013).
8. Matsubara, L. S. *et al.* Remodelação miocárdica na sobrecarga crônica de pressão ou de volume no coração de ratos. *Arq. Bras. Cardiol.* **86**, 126–130 (2006).
9. Mill, J. G. & Vassallo, D. V. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens* **8**, 63–75 (2001).
10. Burke, R. M., Burgos Villar, K. N. & Small, E. M. Fibroblast contributions to ischemic cardiac remodeling. *Cell. Signal.* **77**, 1–12 (2021).
11. Martínez-Martínez, E. *et al.* Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: Potential role in obesity. *J. Hypertens.* **32**, 1104–1114 (2014).
12. Silva-Bertani, D. C. T. da *et al.* A Redução do Colágeno Tipo I está Associada ao Aumento da Atividade da Metaloproteinase-2 e da Expressão Proteica de Leptina no Miocárdio de Ratos Obesos. *Arq Bras Cardiol.* **115**, 61–70 (2019).
13. Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573 (2006).
14. Medeiros, N. I. de, Gomes, J. de A. S. & Fares, R. C. G. A importância das metaloproteinases no remodelamento do miocárdio. *Pós Em Rev. Do Cent. Univ. Newt. Paiva* **2**, 167–170 (2012).
15. Mannucci, C. *et al.* Clinical Pharmacology of Citrus bergamia: A Systematic Review. *Phyther. Res.* **31**, 27–39 (2017).
16. Mollace, V. *et al.* Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: From animal models to human studies. *Fitoterapia* **82**, 309–316 (2011).
17. Musolino, V. *et al.* Bergamot Polyphenols Improve Dyslipidemia and

- Pathophysiological Features in a Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci. Rep.* **10**, 1–14 (2020).
18. Lamiquiz-Moneo, I. *et al.* Effect of bergamot on lipid profile in humans: A systematic review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**, 3133–3143 (2020).
  19. Baron, G. *et al.* Analytical profile and antioxidant and anti-inflammatory activities of the enriched polyphenol fractions isolated from bergamot fruit and leave. *Antioxidants* **10**, 1–27 (2021).
  20. Ferlemi, A. V. & Lamari, F. N. Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* **5**, 1–20 (2016).
  21. Francisqueti, F. V. *et al.* Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals Submitted to High Sugar-Fat Diet. *Nutrients* **9**, 1–10 (2017).
  22. Siqueira, J. S. *et al.* Bergamot leaf extract treats cardiorenal metabolic syndrome and associated pathophysiological factors in rats fed with a high sugar fat diet. *Mol. Cell. Endocrinol.* **556**, 1–10 (2022).
  23. Luvizotto, R. D. A. M. *et al.* Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br. J. Nutr.* **110**, 1803–1809 (2013).
  24. Santos, P. P. Dos *et al.* Vitamin D induces increased systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical properties. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
  25. Da Silva Rodrigues, J. C. *et al.* Influence of an exercise program on cardiac remodeling and functional capacity in patients with stroke (CRONuS trial): Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **20**, 1–9 (2019).
  26. Lang, R. M. *et al.* Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography’s guidelines and standards committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiograph. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **18**, 1440–1463 (2005).
  27. Nagueh, S. F. *et al.* Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **29**, 277–314 (2016).
  28. Sahn, D. J., DeMaria, A., Kisslo, J. & Weyman, A. Recommendations regarding

- quantitation in M-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* **58**, 1072–1083 (1978).
29. Tyagi, S. C., Matsubara, L. & Weber, K. T. Direct Extraction and Estimation of Collagenase ( s ) Activity by Zymography in Microquantities of Rat Myocardium and Uterus. *Clin. Biochem.* **26**, 191–198 (1993).
  30. Sonestedt, E. *et al.* Diet quality and change in blood lipids during 16 years of follow-up and their interaction with genetic risk for dyslipidemia. *Nutrients* **8**, 1–14 (2016).
  31. Xia, J. *et al.* Global transcriptomic profiling of cardiac hypertrophy and fatty heart induced by long-term high-energy diet in bama miniature pigs. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
  32. Apovian, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am. J. Manag. Care* **22**, s176–s185 (2016).
  33. Ferron, A. J. T. *et al.* Association between cardiac remodeling and metabolic alteration in an experimental model of obesity induced by western diet. *Nutrients* **10**, 1–12 (2018).
  34. Francisqueti-ferron, F. V. *et al.* Gamma-oryzanol as a potential modulator of oxidative stress and inflammation via PPAR- $\gamma$  in adipose tissue: a hypothetical therapeutic for cytokine storm in COVID-19? *Mol. Cell. Endocrinol.* **520**, 1–8 (2021).
  35. Alpert, M. A., Karthikeyan, K., Abdullah, O. & Ghadban, R. Obesity and Cardiac Remodeling in Adults: Mechanisms and Clinical Implications. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **61**, 114–123 (2018).
  36. Francisqueti, F. V., Nascimento, A. F. do & Correa, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. *Nutrire* **40**, 81–89 (2015).
  37. Li, H., Chen, C. & Wang, D. W. Inflammatory Cytokines , Immune Cells , and Organ Interactions in Heart Failure. *Front. Physiol.* **12**, 1–13 (2021).
  38. Hayashidani, S. *et al.* Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **285**, 1229–1235 (2003).
  39. DeLeon-Pennell, K. Y., Meschiari, C. A., Jung, M. & Lindsey, M. L. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **147**, 75–100 (2017).

40. Zhao, S. *et al.* Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. *J. Cardiol.* **63**, 373–378 (2014).
41. Leancă, S. A. *et al.* Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: From Physiopathology to Treatment. *Life* **12**, 1–23 (2022).
42. Carroll, J. F. & Tyagi, S. C. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am. J. Hypertens.* **18**, 692–698 (2005).
43. Da Silva, D. C. T. *et al.* Influência do tempo de exposição à obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre os colágenos tipo I e III miocárdico. *Arq. Bras. Cardiol.* **102**, 157–164 (2014).