



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

Juliana Silva Siqueira

Efeito do extrato das folhas de bergamota (*Citrus bergamia*) sobre o estado RedOx-Inflamatório nos órgãos alvo da obesidade

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

Orientadora: Profa. Dra. Camila Renata Corrêa
Coorientadora: Profa. Dra. Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron

**Botucatu
2023**

Juliana Silva Siqueira

Efeito do extrato das folhas de bergamota (*Citrus bergamia*) sobre o estado RedOx-Inflamatório nos órgãos alvo da obesidade

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

Botucatu, 16 de fevereiro de 2023

Orientadora: Profa.Dra. Camila Renata Corrêa
Coorientadora: Profa.Dra. Fabiane Valentini Francisqueti-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

Siqueira, Juliana Silva.

Efeito do extrato das folhas de bergamota (*Citrus bergamia*) sobre o estado RedOx-Inflamatório nos órgãos alvo da obesidade / Juliana Silva Siqueira. - Botucatu, 2023

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

1. Compostos bioativos. 2. Dieta ocidental. 3. Estresse oxidativo. 4. Inflamação.

Palavras-chave: Composto bioativo; Dieta ocidental; Estresse oxidativo; Inflamação.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Julio Cesar e Solange, por todo carinho, paciência e dedicação durante toda jornada de aprendizado mútuo até aqui. Pai e mãe, este trabalho é também fruto de todo amor e incentivo que direcionaram a mim para que seguisse o sonho de pequena cientista. O bônus de trilhar meu caminho cada vez mais longe de casa nunca substituirá o ônus do abraço de saudade dos finais de semana.

À minha orientadora, Camila Renata Corrêa, que me recebeu no laboratório de braços abertos e desde o início confiou em mim e em meu trabalho. Através de nosso convívio, me desenvolvi profissionalmente e pessoalmente por meio de sua experiência, resiliência e ética durante períodos turbulentos, fazendo com que essa caminhada se tornasse extremamente proveitosa.

À minha co-orientadora, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron, Fabi, que me ensinou tudo que tive curiosidade em descobrir e aprender. Fabi, você nasceu com o dom de ensinar e fico muito feliz em ter tido a oportunidade de ser sua discípula, e da professora Camila, durante esse período.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha família, por me lembrarem todos os dias que rir de nossos fracassos e conquistas é a melhor forma de ser leve e feliz. Amo vocês.

Às professoras Camila e Fabiane por tudo que me ensinaram com paciência e carinho e continuam ensinando desde a iniciação científica. Vocês marcaram essa trajetória e lembrarei de vocês a cada passo que tiver daqui pra frente com muita alegria e gratidão. Espero poder retornar à sociedade a dedicação que tiveram comigo.

Aos meus amigos, família que escolhi para caminhar comigo. Gabe, Joy, Murilo, Bruno, Renato, Isa e Helô, obrigada pelas noites de jogos, jantares, festas, estudos, companhia e conversas durante o período de pandemia.

À toda equipe do Lab RedOx/Inflamação pela parceria e cooperação. Em especial ao Thiago Luiz, meu companheiro de vida que dentre suas inúmeras qualidades sempre enxerga o melhor do mundo; Erika Nakandakare-Maia, por sua paciência e sábios conselhos; Taynara Vieira, por sua alegria que contagia a todos e companhia nessa jornada; Artur Ferron, pelos conselhos e ensinamentos; Hugo Kano, por ser meu “guru” biomédico; Bruno de Paula e Felipe Sarzi, por estarem presentes durante o longo período de biotério com muito bom humor; e Núbia Grandini, por sua companhia no processo de mestrado. Obrigada pela amizade, ensinamentos, docinhos no meio da tarde e companhia durante as alegrias e desafios.

À equipe da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), que viabilizou a execução desse projeto desde o biotério até o momento de defesa dessa dissertação.

Aos membros da banca examinadora de qualificação e defesa, por disporem de seu tempo e pela oportunidade de ser avaliada por vocês: Professores Fernando Moreto, Debora Cristina Damasceno Meirelles dos Santos, Guilherme Ribeiro Romualdo,

Dijon Henrique Salomé de Campos, Renata de Azevedo Melo Luvizotto Nascimento e Jéssica Leite Garcia.

À coordenadora do programa de pós-graduação em Patologia, Dra. Márcia Guimarães da Silva e secretária Vânia do Amaral Soler, pela organização, disposição e dedicação que mantém a excelência desse programa.

À FAPESP, pelo investimento no meu mestrado (processo 2021/07282-8) e por tornar possível o desenvolvimento científico brasileiro.

Resumo

Introdução: O alto consumo de alimentos industrializados ricos em carboidratos simples e gordura saturada está associado a um balanço energético positivo e acúmulo de gordura. Esse cenário contribui para o aumento dos índices de obesidade na população mundial nas últimas décadas. A disfunção do tecido adiposo tem sido relatada como um fator importante nos estágios iniciais das comorbidades associadas à obesidade a partir de vários mecanismos diretos e indiretos, como secreção desregulada de adipocinas, infiltração de macrófagos, inflamação, defesa antioxidante reduzida e estresse oxidativo que podem atuar em vários processos metabólicos, como hipertensão, dislipidemia, resistência à insulina e disfunções de tecidos e órgãos, como coração, fígado e rins, conhecidos como órgãos-alvo da obesidade. A adição de compostos bioativos, ricos em polifenóis, no hábito alimentar atua de forma benéfica pois, além de reduzir a inflamação e o estresse oxidativo gerados por dietas obesogênicas, podem ser facilmente introduzidos na rotina alimentar dos indivíduos através do consumo de frutas, legumes e vegetais. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato de folhas de bergamota (*Citrus bergamia*) sobre o tratamento de parâmetros do estado RedOx/inflamatório nos órgãos alvos da obesidade (fígado, rins, coração e tecido adiposo) em animais submetidos a dieta rica em açúcar e gordura. **Materiais e Métodos:** 48 ratos Wistar machos foram distribuídos em 2 grupos experimentais recebendo dieta controle (Controle, n=24) e dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=24) por 20 semanas. Posteriormente, os animais foram selecionados e redistribuídos para o início do tratamento de 10 semanas com extrato da folha de bergamota (Fo) por gavagem (50mg/kg animal) em 4 grupos: dieta controle (Controle, n=10), dieta controle + Fo (Controle+Fo, n=10), dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=10) e dieta rica em açúcar e gordura + Fo (HSF+Fo, n=10). Os animais foram avaliados quando ao perfil nutricional, metabólico e hormonal; função cardíaca, hepática e renal; parâmetros inflamatórios e do estresse oxidativo. **Resultados:** Foi possível observar que os animais que consumiram a dieta HSF apresentaram obesidade, dislipidemia, hiperglicemia, resistência insulínica, hipertensão, disfunção cardíaca, hepática e renal, inflamação e estresse oxidativo nos órgãos-alvo da obesidade. O tratamento com Fo mostrou proteção, demonstrando redução de triglicérides, insulina e resistência insulínica; aumento de níveis séricos de HDL colesterol; e redução da inflamação e do estresse oxidativo no tecido adiposo, coração, fígado e rins. **Conclusão:** Desta forma, o tratamento com extrato das folhas de bergamota mostrou-se capaz de atuar nos parâmetros metabólicos sistêmicos, bem como sobre a recuperação do cenário redox/inflamatório em diferentes tecidos de animais obesos.

Palavras-chave: dieta ocidental, composto bioativo, inflamação, estresse oxidativo

Abstract

Introduction: The high consumption of industrialized food rich in simple carbohydrates and saturated fat is associated to a positive energy balance and fat accumulation. This scenario contributes to increased obesity rates in the world population in recent decades. Adipose tissue dysfunction has been reported as an important factor in the early stages of obesity-associated comorbidities from several direct and indirect mechanisms such as unregulated adipokine secretion, macrophages infiltration, inflammation, reduced antioxidant defense and oxidative stress that can act in several metabolic processes, such as hypertension, dyslipidemia, insulin resistance and tissue and organ dysfunction, such as the heart, liver and kidneys, known as obesity target organs. The better understanding of the processes involved in the pathophysiology of obesity and adipose tissue dysfunction can help in preventive and treatment studies in order to curb the obesity associated consequences. The addition of bioactive compounds, rich in polyphenols, to the dietary habit acts beneficially because, in addition to reducing inflammation and oxidative stress generated by obesogenic diets, they can be easily introduced into the dietary routine of individuals through the consumption of fruits and vegetables. The aim of this work was to evaluate the effect of bergamot leaf extract (*Citrus bergamia*) on the treatment of parameters of the RedOx/inflammatory state in obesity target organs (liver, kidneys, heart and adipose tissue) in animals submitted to a high sugar-fat diet. **Materials and methods:** 48 male Wistar rats were divided into 2 experimental groups receiving a control diet (Control, n=24) and a high sugar-fat diet (HSF, n=24) for 20 weeks. Then, the animals were selected and re-divided for the beginning of the 10-week treatment with bergamot leaf extract (Fo) by gavage (50mg/kg animal) into 4 groups: control diet (Control, n=10), control diet + Fo (Control+Fo, n=10), high-sugar-fat diet (HSF, n=10) and high sugar-fat diet + Fo (HSF+Fo, n=10). The animals were evaluated regarding their nutritional, metabolic and hormonal profile; heart, liver, and kidney function; inflammatory and oxidative stress parameters. **Results:** It was possible to observe that the animals that consumed the HSF diet had obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, insulin resistance, hypertension, heart, liver and kidney dysfunction, inflammation and oxidative stress in the obesity target organs. Treatment with Fo showed protection, demonstrating a reduction in triglycerides, insulin and insulin resistance; increased serum levels of HDL cholesterol; and reduction of inflammation and oxidative stress in adipose tissue, heart, liver and kidneys. **Conclusion:** Thus, the treatment with bergamot leaf extract was able to act on systemic metabolic parameters, as well as on the recovery of the redox/inflammatory scenario in different tissues of obese animals.

Keywords: western diet, bioactive compound, inflammation, oxidative stress

Resumo Para Sociedade

Introdução: O consumo exagerado de alimentos com muita gordura e açúcares está associado ao aumento do acúmulo de gordura corporal, que contribui com altos índices de obesidade na população em todo mundo nas últimas décadas. Quando em excesso, a gordura corporal torna-se um problema, contribuindo com o aumento da inflamação e do estresse oxidativo (representado por grande concentração de moléculas instáveis que prejudicam a capacidade do nosso corpo de se defender dos prejuízos causados por esses hábitos alimentares), favorecendo, assim, estágios iniciais de diversas doenças, como pressão alta, aumento de glicose no sangue, diabetes e prejuízo em alguns órgãos, como por exemplo o coração, fígado e rins, conhecidos como órgãos-alvo da obesidade. O consumo de frutas e vegetais atua impedindo a inflamação e o estresse oxidativo e, consequentemente, impede os efeitos negativos no organismo. Dito isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato de folhas de bergamota, uma espécie de mexerica encontrada principalmente na Itália, sobre o tratamento da inflamação e do estresse oxidativo nos órgãos alvos da obesidade em ratos alimentados com dieta rica em açúcar e gordura. **Como foi feito:** Ratos foram divididos em 2 grupos recebendo dieta controle, que imita a dieta saudável, e dieta rica em açúcar e gordura por 20 semanas. Posteriormente, os animais foram selecionados e redivididos para o início do tratamento de 10 semanas com extrato da folha de bergamota em 4 grupos: dieta controle, dieta controle com Folha de bergamota, dieta rica em açúcar e gordura e dieta rica em açúcar e gordura com Folha de bergamota. Os animais foram avaliados quanto ao consumo, metabolismo, inflamação e estresse oxidativo da gordura, coração, fígado, rins e suas funções. **Resultados:** Foi possível observar que os animais que consumiram somente a dieta rica em açúcar e gordura ficaram obesos, com acúmulo de gordura, aumento de glicose, pressão alta e prejuízos na função do coração, fígado e rins, além de inflamação e estresse oxidativo nesses órgãos. Entretanto, o tratamento com folha de bergamota apresentou proteção a partir da diminuição de gordura e insulina, aumento do colesterol “bom” (HDL colesterol) e redução da inflamação e do estresse oxidativo no tecido adiposo, coração, fígado e rins. **Conclusão:** Desta forma, o extrato das folhas de bergamota mostrou-se capaz de atuar em diferentes tecidos, melhorando a saúde de animais obesos.

Esse resumo foi revisado por amigos e familiares, não por pares. Inspirado em: Jordana Oliveira, egressa da UNESP e divulgadora científica no @voandoaltociencia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1. Revisão de Literatura

Figura 1: Processos fisiopatológicos envolvidos na disfunção do tecido adiposo e suas consequências.....	21
Figura 2: <i>Citrus bergamia</i>	32
Figura 3: Representação esquemática da hipótese.....	45

Capítulo 2. Artigo Científico

Figura 1: Inflamação no Tecido Adiposo ao final de 30 semanas.....	61
Figura 2: Estresse Oxidativo no Tecido Adiposo Epididimal ao final de 30 semanas.....	62
Figura 3: Inflamação no Coração ao final de 30 semanas.	64
Figura 4: Estresse Oxidativo no Coração ao final de 30 semanas.....	65
Figura 5: Função Hepática.....	66
Figura 6: Lipidose microvesicular hepática.....	67
Figura 7: Inflamação no Fígado ao final de 30 semanas.....	68
Figura 8: Estresse Oxidativo Hepático ao final de 30 semanas.....	69
Figura 9: Função renal em 30 semanas.....	70
Figura 10: Inflamação nos rins ao final de 30 semanas.....	71
Figura 11: Estresse Oxidativo Renal ao final de 30 semanas.....	72

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Revisão de Literatura

Tabela 1. Classificação morfofuncional do tecido adiposo: Principais características dos adipócitos brancos, marrons e beges.....	20
--	----

Capítulo 2. Artigo Científico

Tabela 1: Composição das rações.....	52
Tabela 2: Perfil nutricional metabólico ao final de 30 semanas.....	60
Tabela 3: Doppler Ecocardiograma ao final de 30 semanas.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
AGEs	Produtos finais de glicação avançada (<i>Advanced glycation end-product</i>)
AG's	Ácidos Graxos
ALEs	Produtos finais de lipoxidação avançada (<i>Advanced lipoxidation end-product</i>)
ALT	Alanina aminotransferase
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica (<i>Advanced oxidation protein products</i>)
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatase
BAT	Tecido Adiposo Marrom (<i>Brown Adipose Tissue</i>)
bAT	Tecido Adiposo bege (<i>Beige Adipose Tissue</i>)
BHT	Hidróxido Tolueno Butilado (<i>Butylated Hydroxytoluene</i>)
BPF	Fração polifenólica da bergamota (<i>Bergamot Polyphenolic Fraction</i>)
C	Controle
CAT	Catalase
CBO	Carbonilação de proteínas
CER	Ceramidas
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DAG	Diacilglicerol
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina (<i>2,4-dinitrophenylhydrazine</i>)
EDPP	Espessura diastólica da parede posterior
EDSIV	Espessura diastólica do septo interventricular
ETC	Cadeia transportadora de elétrons (<i>Electron transport chain</i>)
Fo	Extrato da folha de bergamota

FRAP	Método de Redução do ferro (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)
GLUT4	Transportador de glicose-4 (<i>Glucose transporter 4</i>)
GPx	Glutathiona Peroxidase
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
H&E	Hematoxilina e eosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance</i>
HSF	Dieta rica em açúcar e gordura (High Sugar-Fat diet)
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRS-1	Substrato do receptor de insulina-1 (<i>Insulin receptor substrate 1</i>)
LPS	Lipopolissacarídeos
MAFLD	Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo (<i>Metabolic associated fatty liver disease</i>)
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito-1 (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MDA	Malondialdeído
NAFLD	Doença hepática gordurosa não alcoólica (<i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>)
NBT	Nitroblue-tetrazólico
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa-B (<i>Nuclear factor kappa-B</i>)
NO	Óxido Nítrico
NOX	NADPH oxidase
Nrf-2	Fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPS	Padrões moleculares associados à patógenos
PAS	Pressão Arterial Sistólica
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RI	Resistência à insulina
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
SOD	Superóxido Dismutase

TA	Tecido Adiposo
TBA	Ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid</i>)
TDE	Tempo de desaceleração da onda E
TFG	Taxa de filtração glomerular
TG	Triglicérides
TLR-4	Receptores do tipo Toll-4 (<i>Toll-like receptor 4</i>)
TLRs	Receptores do tipo Toll (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
UCP1	Proteína de desacoplamento-1 (<i>Uncoupling Protein-1</i>)
VE	Ventrículo Esquerdo
VEPP	Velocidade de encurtamento da parede posterior

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Revisão de literatura.....	16
1. Obesidade.....	17
1.1. Contextualização, definição e epidemiologia.....	17
1.2. Tecido Adiposo.....	19
1.3. Aspectos fisiopatológicos da obesidade.....	21
1.4. Repercussões nos órgãos-alvo.....	27
1.5. Bergamota (<i>Citrus bergamia</i>).....	31
2. Referências.....	33
3. Justificativa e Hipótese	45
4. Objetivo Geral.....	47
4.1. Objetivos específicos.....	47
Capítulo 2 - Artigo científico 1	48
Efeito do extrato de folhas de bergamota sobre o cenário redox/inflamatório em órgãos-alvo da obesidade	49
Capítulo 3 - Artigo científico 2	82
<i>Bergamot leaf extract treats cardiorenal metabolic syndrome and associated path- ophysiological factors in rats fed with a high sugar fat diet</i>	<i>83</i>

Capítulo 1 - Revisão de literatura

1. Obesidade

1.1. Contextualização, definição e epidemiologia

Evolutivamente, a pressão por sobrevivência em longos períodos de escassez elegeu um genótipo que favorecia a superalimentação com baixo gasto de energia e inatividade física^{1,2}. Atualmente, essa supernutrição é apontada como ameaça à saúde, uma vez que mais pessoas morrem em decorrência do sobrepeso em comparação às de baixo peso³.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como acúmulo excessivo de gordura corporal que pode acarretar prejuízos à saúde³. Hipócrates foi o primeiro médico a especular a associação da obesidade aos malefícios à saúde, aumentando riscos de mortalidade precoce, mencionado em seu livro de aforismos “A morte súbita é mais comum naqueles que são naturalmente gordos do que nos magros” (Aforismos II, 44, p.119)⁴⁻⁶. Corroborando a citação, a partir de dados de 2017, mais de 4 milhões de pessoas morrem a cada ano em decorrência do excesso de peso corporal⁷.

A prevalência de sobrepeso e obesidade na população infantil e adulta aumentou nas últimas décadas decorrente do estilo de vida moderno de países industrializados e em desenvolvimento, marcados pelo aumento da disponibilidade e variedade dos alimentos que, ao mesmo passo que reduziram gradualmente a desnutrição, contribuíram com o aumento de peso, fazendo com que esse excesso de gordura corporal se tornasse um problema de saúde pública⁵. Em 2030, prevê-se que 1 a cada 5 mulheres e 1 a cada 7 homens estarão obesos, o equivalente a mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo⁸. Dados da Pesquisa Nacional de Saúde de 2019 apontam que 96 milhões de brasileiros estavam acima do peso. Além disso, houve um aumento de sobrepeso e obesidade entre 2006 e 2019 de 73,91 e 30%, respectivamente^{9,10}. Estima-se que em 2030, aproximadamente 50 milhões de brasileiros serão obesos⁸.

O aumento da prevalência da obesidade é acompanhado do aumento nos gastos relacionados à saúde pública. Essa realidade somou em 2014 o custo de 2,4%

do PIB nacional, representando 110 bilhões de reais relacionados aos gastos com o sistema de saúde, queda de produtividade da população e investimentos necessários para frear os impactos da doença na sociedade¹¹. Mundialmente, o impacto econômico representava 2,8%, o equivalente a 2 trilhões de dólares¹².

Diversos fatores associam-se ao desenvolvimento da obesidade, como predisposição genética, fatores ambientais, endócrinos, padrão alimentar, dentre outros, a partir de interações que podem variar ao longo do tempo e entre os indivíduos¹³. No entanto, a literatura tem reportado que o balanço energético positivo, resultado de uma ingestão calórica acima das necessidades diárias, é o principal responsável pelo aumento da obesidade. Nesse sentido, o atual padrão alimentar da sociedade ocidental é majoritariamente constituído por dietas industrializadas ricas em gorduras saturadas e açúcares simples, e pobre em relação aos ácidos graxos (AG's) insaturados e nutrientes essenciais à saúde humana (fibras, vitaminas e aminoácidos essenciais), apresentando papel crucial no desenvolvimento do quadro^{14,15}. Adicionalmente, dados da OMS demonstram que 1 a cada 4 adultos não praticam atividade física suficiente, contribuindo com o desbalanço energético causado por dietas hipercalóricas, decorrendo em complicações à saúde, dentre elas, a obesidade^{15,16}.

Uma das grandes preocupações acerca da obesidade é sua associação com o desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas, como resistência à insulina (RI), diabetes tipo II, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica, ou seja, associando-se a estágios iniciais de diversas outras doenças, alcançando e comprometendo diversos tecidos e órgãos¹⁷⁻²¹. Nesse sentido, a literatura tem reportado que a expansão da massa adiposa corporal, principalmente a localizada na região visceral, desempenha um papel chave nos processos fisiopatológicos envolvidos na manifestação das complicações associadas à obesidade²².

1.2. Tecido Adiposo

A partir da clonagem do gene para leptina, o tecido adiposo (TA) deixou de ser reconhecido como órgão com função exclusiva de estoque de gordura para órgão endócrino e armazenador, capaz de adaptar-se à diferentes contextos metabólicos com a finalidade de assegurar as necessidades do organismo²³.

O Tecido Adiposo é um órgão que se deposita abaixo da pele (subcutâneo) e associado às vísceras (visceral), podendo ser classificado, nos mamíferos, de acordo com suas características morfológicas e funcionais em três grupos: o tecido adiposo branco (*White adipose tissue* – WAT), marrom (*Brown Adipose Tissue* – BAT) e bege (*Beige Adipose Tissue* – bAT), que se diferem em forma, tamanho e estrutura intracelular de suas organelas^{24,25} (Tabela 1).

O WAT compreende o maior volume de TA nos humanos e é responsável pelos processos de síntese, captação, esterificação, armazenamento e liberação de AG's. Esse tecido é composto majoritariamente de adipócitos (35 a 75%), geralmente esféricos, de gotícula única que ocupa grande parte do volume celular, contendo as organelas na periferia, estroma vascular, células endoteliais e sanguíneas, fibroblastos e macrófagos²⁴⁻²⁶. Os adipócitos brancos possuem grande capacidade de armazenamento, podendo expandir-se cerca de 100µm de diâmetro, a depender das exigências metabólicas²⁷. O WAT é responsável pela produção de adipocinas, como leptina, adiponectina, resistina e citocinas, como interleucina- 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*), proteína quimioatraente de monócito (MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein-1*), dentre outras que participam de diversas funções biológicas no organismo, regulando o apetite, o gasto energético, a sensibilidade periférica à insulina e a absorção de lipídeos em tecidos não adiposos, como coração, fígado e músculo esquelético^{14,28-31}.

O BAT compõe cerca de 4% da massa adiposa total e é amplamente presente em mamíferos no pós natal e durante a hibernação. Acreditava-se que o tecido estivesse presente apenas na fase infantil, porém nas regiões supra clavicular e torácica de adultos é possível encontrar regiões metabolicamente ativas do tecido^{32,33}. Além disso, a chance de detectar a atividade do BAT em adultos mostrou-

se inversamente proporcional ao índice de massa corpórea (IMC)³³. O tecido é composto por gotículas lipídicas dispersas e alta densidade de mitocôndrias contendo ferro, conferindo sua cor marrom. As mitocôndrias conferem ao tecido atividade termogênica, a partir da dissipação de energia na forma de calor, através da expressão da proteína de desacoplamento-1 (UCP1 – *Uncoupling Protein-1*), proteína da membrana interna das mitocôndrias, que, a partir do gradiente de prótons no processo de geração de adenosina trifosfato (ATP), permite a produção de calor ao passo que fluem de volta para a matriz mitocondrial³⁴. Em adultos saudáveis, a atividade do BAT contribui para a oxidação de gordura corporal e termogênese induzida por dieta, demonstrando um papel fisiológico fundamental^{35,36}.

Além dos dois tecidos, o tecido adiposo bege foi recentemente descrito. Este representa 3,1% da gordura corporal total em homens e 7,5% em mulheres e possui características intermediárias comuns com o WAT e BAT, conferindo ao tecido duas funções: em condições de balanço energético positivo, seu comportamento é similar ao tecido adiposo branco, armazenando o excesso de energia; porém em baixas temperaturas/estímulo simpático, o tecido ativa a termogênese, elevando a expressão de UCP-1, induzindo a produção de calor, assim como o tecido adiposo marrom, aumentando a taxa metabólica^{25,37–39}.

Tabela 1. Classificação morfofuncional do tecido adiposo: Principais características dos adipócitos brancos, marrons e beges.

	White 	Brown 	Beige 
Morfologia	Gotícula lipídica única; organelas na periferia	Gotículas lipídicas e organelas dispersas	Gotículas lipídicas e organelas dispersas
Expressão de UCP-1	Negativa	Positiva	Positiva
Densidade Mitocondrial	Baixa	Alta	Intermediária
Função primária	Estoque de energia; Endócrina	Termogênese	Termogênese; Endócrina

UCP-1 – Proteína de desacoplamento-1

1.3. Aspectos fisiopatológicos da obesidade

Diversos fatores têm sido apontados como importantes na manifestação das comorbidades associadas à obesidade. O desequilíbrio de adipocinas, a inflamação e o estresse oxidativo contribuem com a disfunção do tecido adiposo, fator chave envolvido em comorbidades associadas ao consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura (Figura 1), como descrito a seguir:

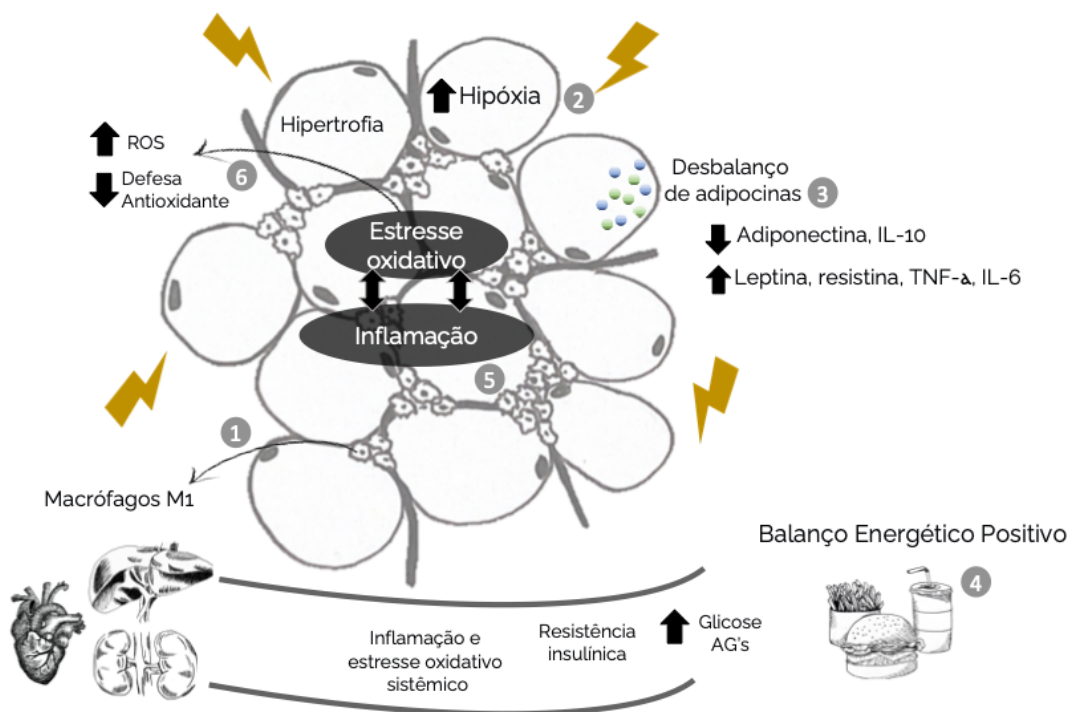


Figura 1. Processos fisiopatológicos envolvidos na disfunção do tecido adiposo e suas consequências. Em um cenário obesogênico, a expansão do tecido adiposo atinge um limite contribuindo para a disfunção tecidual proporcionando uma variedade de estímulos diretos e indiretos: (1) Infiltração de macrófagos com perfil pró-inflamatório (2) Micro hipóxia gerada pela hipoperfusão do tecido adiposo (3) Desequilíbrio de adipocinas (4) Balanço energético positivo (5) Inflamação (6) Estresse Oxidativo. Uma vez sistêmicas, essas condições são capazes de atuar negativamente sobre precursores iniciais de disfunções em outros tecidos e órgãos, como coração, fígado e rins, atuando como um importante componente aterogênico, induzindo aumento de AG's livres e colesterol através da resistência à insulina. ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species*). AG's – Ácidos Graxos. IL-6 – Interleucina-6. IL-10 – Interleucina-10. TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*).

Adipocinas/Citocinas

Dentre as atribuições do TA, destaca-se a função endócrina, capaz de influenciar a homeostase energética, hemodinâmica e a resposta inflamatória a partir da síntese e secreção de adipocinas, peptídeos bioativos, por esse tecido⁴⁰. O desequilíbrio exacerbado no estímulo ou bloqueio da produção de adipocinas associa-se à doenças relacionadas ao estilo de vida, como hiperlipidemia, diabetes e hipertensão⁴¹. Dentre as adipocinas, destacam-se a leptina, adiponectina, resistina, TNF- α , IL-6 e interleucina-10 (IL-10).

A leptina associa-se ao sinal de saciedade, a partir da regulação do apetite e da homeostase energética⁴². Sua produção é induzida pela insulina e outros peptídeos gástricos pós refeições e sua concentração é proporcional ao volume de células adiposas, tendo seus níveis circulantes do sangue positivamente relacionados ao IMC^{40,43}. No entanto, em um ambiente obesogênico, há a caracterização de um quadro de resistência à leptina e, embora os mecanismos que decorrem na resistência não estejam totalmente elucidados, sabe-se que níveis elevados de leptina em pacientes obesos contribuem com o estado de inflamação crônica de baixo grau, associando-se à maior susceptibilidade no desenvolvimento de resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia e distúrbios endócrinos⁴⁴.

Outra citocina produzida pelo TA é a adiponectina, presente 20 vezes mais no plasma que a leptina. Dentre suas principais funções, destacam-se o aumento da biossíntese de AG's e a inibição da gliconeogênese no fígado. Além disso, possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios a partir da regulação na secreção de outras citocinas⁴⁵. De forma oposta à maioria das adipocinas, a adiponectina é encontrada em níveis diminuídos na obesidade, uma vez que existe uma correlação negativa entre seus níveis e o desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade⁴⁰.

A resistina é encontrada em níveis elevados em indivíduos obesos, atribuindo características pró-inflamatórias através da regulação positiva na produção de IL-6 e TNF- α . Além disso, associa-se à proliferação de adipócitos e angiogênese, desempenhando papel importante no início e progressão da obesidade

e resistência à insulina através da indução da inflamação⁴⁶.

O TNF- α e a IL-6 são citocinas produzidas por diversos tipos celulares que participam da resposta imune inata e de processos metabólicos distintos no organismo. Enquanto adipocinas, tem produção estimulada a partir da expansão do TA, contribuindo com a geração do quadro de resistência insulínica e outras disfunções metabólicas decorrentes da inflamação crônica em obesos^{47,48}.

Ao contrário das citocinas citadas anteriormente, a IL-10 possui ação anti-inflamatória, inibindo a ação de outras citocinas como TNF- α e IL-6, reduzindo, então, o recrutamento de macrófagos no TA. A IL-10 e a adiponectina atuam neutralizando os efeitos pró-inflamatórios, sendo encontrada em maior quantidade em indivíduos obesos⁴⁰.

Inflamação

A obesidade é um fator de risco para a resistência à insulina, diabetes tipo 2 e outras doenças associadas à obesidade. As evidências iniciais acerca dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória da obesidade vêm de estudos em humanos e animais realizados no início da década de 1990. Nesses estudos, observou-se que o TA de roedores e humanos obesos mostram modificações inflamatórias e secreção aumentada de TNF- α , capaz de induzir RI pela inativação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1 – *Insulin receptor substrate 1*)^{49,50}.

Dessa forma, a obesidade é caracterizada como uma condição de inflamação crônica de baixo grau, também conhecida como metainflamação, fortemente associada ao excesso de gordura corporal, caracterizada pela infiltração e ativação de macrófagos pró-inflamatórios e outras células imunes no TA, que produzem e secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, pilar importante na manifestação da RI e doenças metabólicas associadas à obesidade^{17,51}.

O gatilho inicial para a inflamação na obesidade ainda permanece incerto. No entanto, a expansão e disfunção do TA fornecem uma variedade de estímulos diretos capazes de iniciar a resposta inflamatória, como hipóxia e alteração no perfil de macrófagos⁵¹. Além disso, a literatura ainda reporta que

fatores indiretos, como componentes dietéticos e disbiose intestinal, podem incitar a resposta inflamatória na obesidade^{52,53}.

Em situação de balanço energético positivo, o excesso calórico é estocado no tecido adiposo na forma de triglicérides (TG) por meio de processos de hipertrofia e hiperplasia, que permitem a expansão do órgão⁴⁸. Embora esses processos sejam fisiologicamente necessários, existe um limite de expansão celular que, uma vez atingido, não permite mais o armazenamento do excesso de energia nos adipócitos, tornando o TA severamente disfuncionante⁵⁴. Essa condição contribui com prejuízos ao organismo a partir da deposição de gordura em outros órgãos e da alteração e desbalanço na secreção de adipocinas do TA, principalmente no aumento significativo das de ação pró-inflamatória, como TNF- α e IL-6^{14,55}.

A literatura relata ainda que esse processo de expansão do TA, especialmente a hipertrofia, altera significativamente o número e a composição de células do sistema imunológico, agravando ainda mais o estado inflamatório da obesidade. Em situações de TA normal e funcionante, o padrão de macrófagos predominante é denominado M2, uma linhagem que secreta substâncias anti-inflamatórias como IL-10 e tem papel fundamental na manutenção da homeostase do TA. Em contrapartida, em condição de obesidade, o padrão de macrófagos predominantes são os denominados M1, os quais produzem substâncias pró-inflamatórias como TNF- α , contribuindo para o processo de inflamação⁵⁶. Em estágios avançados, macrófagos são induzidos para produção de mais citocinas, auxiliando no agravamento da inflamação^{14,55}.

Outra condição associada à inflamação na obesidade e consequente à disfunção no TA é a micro hipóxia, gerada pela hipoperfusão do TA nos primeiros estágios da expansão, corroborando a ativação das vias do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-kB – *Nuclear factor kappa-B*), resultando em maior liberação de citocinas pró-inflamatórias e macrófagos no tecido^{31,57}.

A inflamação no TA pode ser desencadeada, ainda, por componentes dietéticos. Os carboidratos simples ingeridos da dieta, por serem de alto índice glicêmico e absorvidos rapidamente, promovem picos insulinêmicos que, cronicamente, provocam alterações metabólicas que resultam em aumento da

infiltração de macrófagos nos adipócitos, deliberando citocinas pró-inflamatórias^{49,58-60}. A gordura dietética, caracterizada pelo alto consumo de AG's saturados, é capaz de desencadear a disfunção do TA e ativar diretamente o processo inflamatório. Os AG's livres circulantes, assim como lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, ativam proteínas transmembrana conhecidas como toll-like receptor 4 (TLR-4 – *Toll-like receptor 4*), presentes em diferentes tecidos e células, incluindo tecido adiposo e macrófagos envolvidos na resposta imune inata^{31,61}. Assim, a ativação de TLR-4 resulta em estímulo às vias inflamatórias^{62,63}.

Além da dieta, a microbiota intestinal é fundamental pra manutenção da saúde humana, desempenhando papel imunomodulador de bactérias do trato gastrointestinal no contexto da metainflamação em quadros obesogênicos⁶⁴. Os toll-like receptors (TLRs – *Toll-like receptors*) detectam padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS), como LPS ou flagelina, que induzem uma resposta inflamatória a fim de eliminar um possível agente agressor e evitar danos ao tecido saudável. Dessa forma, os LPSs foram propostos como fonte de inflamação metabólica por permearem na circulação via quilomícrons ou via aumento da permeabilidade intestinal, induzindo resposta inflamatória sistêmica^{65,66}. LPS e ácidos graxos saturados de cadeia longa atuam sinergicamente na ativação da sinalização inflamatória de macrófagos, caracterizando uma relação entre dietas ocidentais e inflamação pós-prandial⁵³.

A ativação de TLR-4 desencadeia vias inflamatórias, reduzindo a captação de glicose pela sinalização de insulina^{62,63}. Como resultado do processo inflamatório, o aumento de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α , pode inibir a expressão e translocação do transportador de glicose-4 (GLUT4 – *Glucose transporter 4*), principal responsável pela captação da glicose circulante, através da atuação sobre a fosforilação de resíduos de serina, no substrato do receptor de insulina IRS-1, podendo desenvolver um quadro de resistência à insulina e consequente disfunção do tecido adiposo^{31,57}.

Desequilíbrio do estado RedOx

O desequilíbrio bioquímico entre fatores oxidantes e antioxidantes é

denominado desequilíbrio do estado RedOx ou estresse oxidativo, pilar fisiopatológico importante no desenvolvimento das comorbidades associadas à obesidade. Os fatores oxidantes são representados majoritariamente pelos radicais livres que incluem as espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive oxygen species*). Em um cenário obesogênico, as ROS tem sua produção aumentada decorrente do aumento do metabolismo do adipócito e consequente disfunção, hiperleptinemia, inflamação crônica e reduzida defesa antioxidante^{67,68}.

Os adipócitos podem desencadear o estresse oxidativo diretamente em indivíduos obesos, uma vez que a irrigação do tecido adiposo se torna insuficiente decorrente do grande aumento do número de células, podendo suceder em morte celular por necrose. Com a finalidade de retirar as células necrosadas, ocorre a fagocitose, que resulta em resposta tissular de aumento na infiltração inflamatória e estresse oxidativo com liberação de radicais livres como óxido nítrico (NO) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)^{68,69}. Além disso, a sobrecarga de AG's livres aumenta a β -oxidação e a atividade da cadeia transportadora de elétrons (ETC – *Electron transport chain*), na membrana interna das mitocôndrias, que pode gerar uma hipóxia relativa, resultando no aumento de ROS como subproduto do metabolismo⁷⁰.

Como citado anteriormente, os níveis plasmáticos de leptina são elevados em um cenário obesogênico⁴⁰. A leptina é capaz de promover a ativação de NADPH oxidase (NOX), resultando no acúmulo de ROS intracelulares, H₂O₂ e radical hidroxila, desempenhando papel importante no estresse oxidativo induzido pela obesidade⁷¹.

As ROS são capazes, ainda, de estimular a via do NF κ -B a produzir citocinas pró-inflamatórias, formando um ciclo vicioso de retroalimentação entre estresse oxidativo e inflamação, desencadeando em inflamação crônica de baixo grau e a oxidação de biomoléculas, como lipídios (lipoxidação) e glicose (glicação)^{72,73}. Dentre os produtos de lipoxidação estão incluídos o malondialdeído (MDA), glioxal, acroleína e 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), enquanto os produtos gerados a partir da glicação incluem glioxal e metilglioxal. A ligação desses compostos com o grupo amino resulta em produtos finais de glicação avançada

(AGEs - *Advanced glycation end-product*) e produtos finais de lipoxidação avançada (ALEs - *Advanced lipoxidation end-product*), que são altamente reativos e, ao reagirem com proteínas por carbonilação, fazem com que estas sofram perda de função, resultando em disfunção de órgãos e surgimento de doenças. As ROS podem oxidar as proteínas diretamente, incluindo as moléculas de DNA, acarretando em perda de função biológica, disfunção celular e falência de sistemas e órgãos⁷⁴.

Em contrapartida, a fim de amenizar o estresse oxidativo, ocorre a ativação de diferentes mecanismos, como o fator nuclear 2 relacionado ao eritróide -2 (Nrf-2), que regula o estresse oxidativo, aumentando a produção de antioxidantes endógenos, composto principalmente por enzimas antioxidantes, destacando-se a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), que atuam impedindo e controlando a formação de radicais livres e consequentemente os danos causados por eles^{75,76}. Observou-se que a obesidade em animais restringiu a expressão de mRNA e atividades de enzimas antioxidantes no TA⁷⁷. Além disso, o consumo excessivo de dietas ricas em açúcares e gorduras associa-se a uma defesa antioxidante inadequada, uma vez que essas dietas são deficientes em vitaminas e minerais^{14,15}. Níveis séricos de antioxidantes dietéticos e níveis de oligoelementos, como zinco e selênio, que são cofatores para enzimas antioxidantes, foram encontrados em quantidades reduzidas em indivíduos obesos. Ainda, há uma associação entre níveis deficientes plasmáticos de carotenoides, vitamina C e vitamina E e o IMC^{78,79}.

1.4. Repercussões nos órgãos-alvo

Apesar da lista de desfechos clínicos associados à obesidade ser bastante extensa, a gravidade dessas complicações parece depender da presença adicional do excesso de gordura ao redor de tecidos normalmente magros, como o coração, o fígado e o rins - um fenômeno conhecido como deposição de gordura ectópica⁸⁰. Essa condição acontece quando a capacidade dos depósitos de gordura é sobrecarregada, o que retarda a conversão de VLDL, originando a

hipertrigliceridemia, acumulando lipídeos em outros tecidos e gerando um processo inflamatório no ambiente celular, com comprometimento funcional do órgão afetado^{14,80-82}. Adicionalmente, a elevação crônica sistêmica e sustentada das citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo TA também é capaz de atingir e comprometer esses mesmos órgãos alvos da obesidade, com repercussões funcionais negativas^{18-21,83}. A ação de adipocinas, bem como dos componentes da síndrome metabólica, também desempenha papel relevante no comprometimento funcional dos órgãos-alvo da obesidade⁸⁴.

Coração

Em condição de obesidade, o excesso de TA exige maiores demandas metabólicas, levando a uma circulação hiperdinâmica, caracterizada principalmente por aumento do volume sanguíneo proporcionalmente ao excesso de peso corporal e ao débito cardíaco, decorrendo em sobrecarga hemodinâmica no coração⁸⁵.

Além disso, o excesso lipídico circulante decorre em lipotoxicidade que prejudica a integridade dos tecidos vasculares, podendo causar disfunção endotelial em indivíduos obesos e consequente inflamação no local da lesão, importante componente aterogênico, criando um estado pró-trombótico e pró-inflamatório⁸⁶. Os AG's livres ativam resposta inflamatória nos macrófagos localizados no TA epicárdico, depósito de gordura visceral localizada ao redor do miocárdio, contribuindo com a resistência insulínica^{49,87}. Como consequência da menor utilização de glicose, ocorre um aumento da oxidação de AG's e do consumo de oxigênio do miocárdio decorrente de desacoplamento da fosforilação oxidativa, inibição da adenosinatri-fosfatase (ATPase), produção de ceramida e geração de ROS^{88,89}. O estresse oxidativo contribui com o remodelamento cardíaco a partir de modificações em proteínas responsáveis pelo acoplamento de contração, além de outros mecanismos que contribuem com falhas do miocárdio por falta de adaptação⁹⁰. Além disso, a geração de AGEs contribui com o remodelamento e disfunção cardíaca sistólica e diastólica através da alteração na função dos canais de cálcio⁸⁸.

A inflamação crônica de baixo grau associa-se à insuficiência cardíaca e disfunção do ventrículo esquerdo, responsável pelo bombeamento do sangue ao

organismo por meio da ativação direta por citocinas de mecanismos envolvidos na ativação de fibroblastos, e consequente formação de fibrose, resultando em remodelamento cardíaco^{91,92}. As citocinas podem, ainda, estimular o sistema β - adrenérgico, mecanismo envolvido na contratilidade cardíaca. Assim, há um aumento na contratilidade do coração, o que pode levar ao remodelamento cardíaco e alteração da função cardíaca⁹³.

Uma vez que adiponectina e leptina possuem secreção inversamente e diretamente proporcionais, respectivamente, à adiposidade, presume-se que a relação entre as duas adipocinas possa desempenhar um papel no remodelamento e disfunção cardíaca, visto que a atividade anti-inflamatória da adiponectina está reduzida em um cenário obesogênico enquanto o efeito de hipertrofia cardíaca direto, através de sinalização celular, e indireto, por meio da hipertensão, da leptina está exacerbado⁹⁴.

Rins

Dentre os fatores contribuintes para o desenvolvimento da doença renal, encontram-se a obesidade e complicações associadas a ela, como Diabetes *mellitus*, hipertensão e mudanças no perfil de adipocinas. A adiposidade aumentada pode impactar diretamente os rins, a partir da associação positiva entre IMC, proteinúria e reduzida taxa de filtração glomerular (TFG)^{95,96}.

A literatura sugere que a Doença Renal Crônica é um processo inflamatório de baixo grau, uma vez que existe uma associação entre a insuficiência dos rins com mediadores da inflamação⁹⁷. O desbalanço na secreção de adipocinas, como leptina, resistina e adiponectina, na obesidade, participam no prejuízo na função renal, contribuindo com a presença de resistência à insulina, remodelamento vascular e lesão nos podócitos⁹⁸.

A presença de resistência insulínica e hiperinsulinemia, característica da obesidade, podem induzir, também, uma inflamação local nos rins, importante na fisiopatologia da doença renal. O aumento de insulina pode induzir uma hiperfiltração glomerular, disfunção endotelial e aumento da permeabilidade vascular,

contribuindo com albuminúria. A resistência insulínica contribui, também, com hipertensão e hiperuricemia, a partir da indução de reabsorção de sódio e ácido úrico⁹⁹.

Além disso, níveis aumentados de glicose e AG's promovem aumentos das ROS mitocondriais nas células endoteliais renais. O aumento de marcadores de estresse oxidativo, como MDA e proteína carbonilada, se relacionam com a redução da função renal, levando à hiperfiltração dos néfrons através de mecanismos compensatórios que podem levar à hipertensão glomerular, proteinúria ou até mesmo perda de função^{97,100,101}. Ainda, o receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE), quando ativado, leva à sinalização e consequente ativação do NFκB, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias^{100,102}.

Fígado

O acúmulo de gordura no fígado, comumente conhecido como doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD - *Non-alcoholic fatty liver disease*), é associado à obesidade e componentes da síndrome metabólica, como resistência insulínica, diabetes tipo 2 e dislipidemia¹⁰³.

Dentre os principais processos envolvidos na patogênese da esteatose hepática, destacam-se o aumento dos níveis séricos de AG's livres e de colesterol, expansão do tecido adiposo e resistência à insulina, fortemente associados ao estilo de vida ocidental¹⁰⁴. A condição de resistência insulínica induz a lipogênese hepática *de novo*¹⁰⁵, além de contribuir com a inflamação, resultando em aumento do fluxo de AG's livres hepáticos e acúmulo de TG¹⁰⁶.

Ainda, uma ativação direta das vias inflamatórias nos hepatócitos pode ocorrer a partir da oxidação ineficiente causada pelo acúmulo de AG's saturados, produzindo intermediários lipotóxicos como diacilglicerol (DAG) e ceramidas (CER), podendo ocasionar um estresse do retículo endoplasmático que impulsiona a ocorrência de esteatose no fígado^{20,107,108}. Níveis plasmáticos elevados de CER são associados à obesidade e podem contribuir, por exemplo, com a resistência insulínica e inflamação¹⁰⁹. Ainda, a adiponectina atua na redução de CER hepáticas,

auxiliando na homeostase da glicose sanguínea¹¹⁰.

Além do estresse oxidativo decorrente de inflamação, o excesso de macronutrientes oferecidos por uma dieta obesogênica induz um aumento na oxidação de triglicerídeos, favorecendo a produção de ROS por mitocôndrias disfuncionais, contribuindo ainda mais com danos teciduais, atuando, por exemplo na progressão da NAFLD e MAFLD (Doença hepática gordurosa associada ao metabolismo – *Metabolic associated fatty liver disease*)^{20,111–115}.

1.5. Bergamota (*Citrus bergamia*)

A adição de compostos bioativos, presentes em frutas, legumes e vegetais, ricos em polifenóis, no hábito alimentar atuam de forma benéfica reduzindo a inflamação e o estresse oxidativo gerados por dietas ricas em açúcares e gorduras^{116–118}. Com isso, investigar diferentes intervenções dietéticas, explorando diversos tipos de alimentos para servir como estratégias terapêuticas no combate à inflamação e ao estresse oxidativo, podem auxiliar na prevenção ou tratamento de suas consequências¹¹⁹.

A Bergamota (*Citrus bergamia*), encontrada no Sul da Itália, na região da Calábria (Figura 2), é um fruto que demonstra potencial antioxidante e anti-inflamatório¹²⁰. Sua ação hipolipêmica, hipoglicêmica, anti-inflamatória e seus efeitos sobre tratamento de doenças associadas à síndrome metabólica vem sendo destacados nos últimos anos a partir do suco do fruto, evidenciando a fração polifenólica da bergamota (BPF – *Bergamot Polyphenolic Fraction*), constituída predominantemente de flavonóides (naringina, neo-peridina, neoeriocitrina, brutieridina e melitidina), um alto teor de ácidos graxos (ácido oleico, ácido linoléico e ácido palmítico) e açúcar^{121–124}.

Outros trabalhos experimentais também observaram efeitos benéficos do suco do fruto de bergamota sobre parâmetros metabólicos em animais submetidos a dietas obesogênicas dentre os quais, prevenção da hiperlipidemia, níveis elevados de colesterol, dos triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sugerindo que esse consumo promove a redução do risco de doenças

cardiovasculares¹²⁵. Ao mesmo passo, Musolino et al. (2020) demonstraram uma melhora da resistência periférica à insulina, juntamente com uma melhora da função hepática em camundongos submetidos à dieta ocidental¹²⁶.

No entanto, estudos analíticos mostram que para algumas plantas, como aquelas que produzem bagas, a composição fenólica da folha é semelhante à do fruto ou até mesmo mais rica ou superior, indicando que podem ser utilizadas como fonte alternativa o desenvolvimento de suplementos alimentares, nutracêuticos ou alimentos funcionais^{127,128}. Baseado nisso, Baron et al. (2021) conduziram um estudo caracterizando e comparando compostos bioativos presentes no extrato de folhas e frutos de bergamota, e demonstraram que as folhas apresentam uma quantidade maior de polifenóis, além de apresentar uma maior capacidade antioxidante e anti-inflamatória *in vitro*¹²⁹. Sendo assim, uma vez que não existem trabalhos envolvendo a ação do extrato das folhas da bergamota no tratamento da inflamação e do estresse oxidativo em obesidade e comorbidades consequentes ao consumo de dieta rica em açúcar e gordura, essa investigação torna-se de extrema relevância.

Além disso, como o fruto da bergamota é uma matéria-prima valiosa e cultivada em uma região limitada do sul da Itália, a oportunidade de identificar as folhas como fonte de polifenóis bioativos com propriedades químicas bioativas superiores aos polifenóis da fruta, permite a disponibilização de uma nova aplicação renovável e de baixo custo.



Figura 2. *Citrus bergamia*. Fonte: Acervo galeria Herbal & Antioxidant Derivatives, 2022

2. Referências

1. Blüher, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 288–298 (2019).
2. Yanovski, J. A. Trends in underweight and obesity — scale of the problem. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 5–6 (2018).
3. Obesity and Overweight. (2021). Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
4. Hippocrates. *Hippocrates Volume IV: Nature of Man. Regimen in Health. Humours. Aphorisms. Regimen 1-3. Dreams. Heracleitus: On the Universe.* (Harvard University Press London, 1931).
5. Sumińska, M. *et al.* Historical and cultural aspects of obesity: From a symbol of wealth and prosperity to the epidemic of the 21st century. *Obes. Rev.* (2022). doi:10.1111/obr.13440
6. Christopoulou-Aletra, H. & Papavramidou, N. Methods Used by the Hippocratic Physicians for Weight Reduction. *World J. Surg.* **28**, 513–517 (2004).
7. Abarca-Gómez, L. *et al.* Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* **390**, 2627–2642 (2017).
8. Lobstein, T. *et al.* *World Obesity Atlas 2022.* World Obesity Federation 2022 (World Obesity Federation 2022, 2022).
9. IBGE, I. B. de G. e E.-. Pesquisa Nacional de Saúde 2019: Atenção primária à saúde e informações antropométricas. (2020).
10. Brazil - Obesity Data Trends. Available at: https://data.worldobesity.org/country/brazil-27/#data_trends. (Accessed: 3rd October 2022)
11. *Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 : análise do consumo alimentar pessoal no Brasil / IBGE, Coordenação de trabalho e*

- Rendimento*. (2011).
12. Dobbs, R. *et al.* Overcoming obesity: an initial economic analysis. *McKinsey Global Inst.* (2014).
 13. Sharma, A. M. & Padwal, R. Obesity is a sign - over-eating is a symptom: an aetiological framework for the assessment and management of obesity. *Obes. Rev.* **11**, 362–370 (2010).
 14. Monteiro, R. & Azevedo, I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators Inflamm.* **2010**, 1–10 (2010).
 15. Popkin, B. M., Adair, Li. S. & Ng, S. W. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. *Nutr. Rev.* **70**, 3–21 (2012).
 16. Organization, W. H. *GLOBAL ACTION PLAN ON PHYSICAL ACTIVITY 2018-2030: MORE ACTIVE PEOPLE FOR A HEALTHIER WORLD.* (2018).
 17. Jung, U. & Choi, M.-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 6184–6223 (2014).
 18. Francisqueti, F. *et al.* Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals Submitted to High Sugar-Fat Diet. *Nutrients* **9**, 1299 (2017).
 19. Ferron, A. J. T. *et al.* Protective effect of tomato-oleoresin supplementation on oxidative injury recovers cardiac function by improving β -adrenergic response in a diet-obesity induced model. *Antioxidants* **8**, (2019).
 20. Costa, M. R. *et al.* Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Antioxidants* **8**, 1–17 (2019).
 21. Lo, A. T. C. *et al.* Brazilian *Curcuma longa* L. attenuates comorbidities by modulating adipose tissue dysfunction in obese rats. *Nutrire* **43**, 1–8 (2018).
 22. Reyes-Farias, M., Fos-Domenech, J., Serra, D., Herrero, L. & Sánchez-Infantes, D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem. Pharmacol.* **192**, 114723 (2021).

23. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
24. Cinti, S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am. J. Physiol. Metab.* **297**, E977–E986 (2009).
25. Fonseca Raposo, H. Tecido adiposo: suas cores e versatilidade. *HU Rev.* **46**, 1–12 (2020).
26. Henry, S. L. *et al.* White adipocytes: More than just fat depots. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 435–440 (2012).
27. Cinti, S. The adipose organ at a glance. *Dis. Model. Mech.* **5**, 588–594 (2012).
28. Coelho, M., Oliveira, T. & Fernandes, R. State of the art paper Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch. Med. Sci.* **2**, 191–200 (2013).
29. Lohmeier, T. E. & Iliescu, R. The Sympathetic Nervous System in Obesity Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **15**, 409–416 (2013).
30. Pessin, J. E. & Saltiel, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 165–169 (2000).
31. Francisqueti, F. V., Nascimento, A. F. do & Correa, C. R. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. *Nutrire* **40**, 81–89 (2015).
32. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Metab.* **293**, E444–E452 (2007).
33. Cypess, A. M. *et al.* Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509–1517 (2009).
34. de Sá, P. M., Richard, A. J., Hang, H. & Stephens, J. M. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. in *Comprehensive Physiology* 635–674 (Wiley, 2017). doi:10.1002/cphy.c160022
35. Hibi, M. *et al.* Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int. J. Obes.* **40**, 1655–1661 (2016).
36. Richard, A. J., White, U., Elks, C. M. & Stephens, J. M. *Adipose Tissue:*

Physiology to Metabolic Dysfunction. Endotext (2000).

37. Halpern, B., Mancini, M. C. & Halpern, A. Brown adipose tissue: what have we learned since its recent identification in human adults. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **58**, 889–899 (2014).
38. Barbatelli, G. *et al.* The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Metab.* **298**, E1244–E1253 (2010).
39. Wu, J., Cohen, P. & Spiegelman, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes Dev.* **27**, 234–250 (2013).
40. Da Silva, N. I., Sobrinho, H. M. da R., Blanch, G. T., Cruvinel, W. M. & Gomes, C. M. Adipocinas e sua relação com a obesidade. *Rev. EVS - Rev. Ciências Ambient. e Saúde* **46**, (2019).
41. Francisco, V. *et al.* Adipokines: Linking metabolic syndrome, the immune system, and arthritic diseases. *Biochem. Pharmacol.* **165**, 196–206 (2019).
42. Trinh, T. & Broxmeyer, H. E. Role for Leptin and Leptin Receptors in Stem Cells During Health and Diseases. *Stem Cell Rev. Reports* **17**, 511–522 (2021).
43. Cui, H., López, M. & Rahmouni, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 338–351 (2017).
44. La Cava, A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine* **98**, 51–58 (2017).
45. Choi, H. M., Doss, H. M. & Kim, K. S. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1219 (2020).
46. Taouis, M. & Benomar, Y. Is resistin the master link between inflammation and inflammation-related chronic diseases? *Mol. Cell. Endocrinol.* **533**, 111341 (2021).
47. Sethi, J. K. & Hotamisligil, G. S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat. Metab.* **3**, 1302–1312 (2021).

48. Queiroz, J. C. F., Alonso-Vale, M. I. C., Curi, R. & Lima, F. B. Control of adipogenesis by fatty acids. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **53**, 582–594 (2009).
49. Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M. Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- α : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science (80-.).* **259**, 87–91 (1993).
50. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M. & Hotamisligil, G. S. Functional Analysis of Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors in TNF- α -Mediated Insulin Resistance in Genetic Obesity**This work is supported in part by a grant from the NIH (DK-52539). *Endocrinology* **139**, 4832–4838 (1998).
51. Zatterale, F. *et al.* Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front. Physiol.* **10**, (2020).
52. Lee, H., Lee, I. S. & Choue, R. Obesity, Inflammation and Diet. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* **16**, 143 (2013).
53. Scheithauer, T. P. M. *et al.* Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
54. Longo, M. *et al.* Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2358 (2019).
55. Suganami, T. & Ogawa, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 33–39 (2010).
56. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808 (2003).
57. Schenk, S., Saberi, M. & Olefsky, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* **118**, 2992–3002 (2008).
58. Glushakova, O. *et al.* Fructose Induces the Inflammatory Molecule ICAM-1 in Endothelial Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 1712–1720 (2008).
59. DiNicolantonio, J. J., Mehta, V., Onkaramurthy, N. & O’Keefe, J. H. Fructose-induced inflammation and increased cortisol: A new mechanism for how sugar induces visceral adiposity. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **61**, 3–9 (2018).
60. Asghar, A. & Sheikh, N. Role of immune cells in obesity induced low

- grade inflammation and insulin resistance. *Cell. Immunol.* **315**, 18–26 (2017).
61. Myles, I. A. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. *Nutr. J.* **13**, 61 (2014).
 62. Song, M. J., Kim, K. H., Yoon, J. M. & Kim, J. B. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 739–745 (2006).
 63. Ferrari, F., Bock, P. M., Motta, M. T. & Helal, L. Biochemical and Molecular Mechanisms of Glucose Uptake Stimulated by Physical Exercise in Insulin Resistance State: Role of Inflammation. *Arq. Bras. Cardiol.* (2019). doi:10.5935/abc.20190224
 64. Thaïss, C. A., Zmora, N., Levy, M. & Elinav, E. The microbiome and innate immunity. *Nature* **535**, 65–74 (2016).
 65. Gomes, J. M. G., Costa, J. de A. & Alfenas, R. de C. G. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism* **68**, 133–144 (2017).
 66. Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W. & Eckhardt, E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.* **50**, 90–97 (2009).
 67. SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. in *Oxidative Stress* 1–8 (Elsevier, 1985). doi:10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3
 68. Francisqueti, F. V. *et al.* The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **63**, 85–91 (2017).
 69. Bhattacharya, I. *et al.* Hypoxia potentiates tumor necrosis factor- α induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in white and brown adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **461**, 287–292 (2015).
 70. Schofield, J. H. & Schafer, Z. T. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitophagy: A Complex and Nuanced Relationship. *Antioxid. Redox Signal.* **34**, 517–530 (2021).
 71. Hsu, P.-S. *et al.* Participation of NADPH Oxidase-Related Reactive

- Oxygen Species in Leptin-Promoted Pulmonary Inflammation: Regulation of cPLA2 α and COX-2 Expression. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1078 (2019).
72. Hurrell, S. & Hsu, W. H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. *Biomed. J.* **40**, 257–262 (2017).
 73. Aldini, G., Dalle-Donne, I., Facino, R. M., Milzani, A. & Carini, M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med. Res. Rev.* **27**, 817–868 (2007).
 74. Vistoli, G. *et al.* Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. *Free Radic. Res.* **47**, 3–27 (2013).
 75. Francisqueti-Ferron, F. V. *et al.* Basic concepts on the role of nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2) in age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–14 (2019).
 76. Ishii, T., Itoh, K. & Yamamoto, M. Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements. *Methods Enzymol.* **348**, 182–190 (2002).
 77. Furukawa, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–1761 (2004).
 78. Wallström, P. *et al.* Serum concentrations of β -carotene and α -tocopherol are associated with diet, smoking, and general and central adiposity. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 777–785 (2001).
 79. Kaidar-Person, O., Person, B., Szomstein, S. & Rosenthal, R. J. Nutritional Deficiencies in Morbidly Obese Patients: A New Form of Malnutrition? *Obes. Surg.* **18**, 870–876 (2008).
 80. González-Muniesa, P. *et al.* Obesity. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17034 (2017).
 81. Ordovas, J. M. & Corella, D. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Kidney Int.* **74**, S10–S14 (2008).
 82. Sethi, J. K. & Vidal-Puig, A. J. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J. Lipid Res.* **48**, 1253–1262 (2007).
 83. Panelli, M. F. *et al.* Preventive effect of the bark of *Passiflora edulis* on

- obesity-related disorders and oxidative stress in db/db mice. *Nutrire* **44**, (2019).
84. Ebong, I. A., Goff, D. C., Rodriguez, C. J., Chen, H. & Bertoni, A. G. Mechanisms of heart failure in obesity. *Obes. Res. Clin. Pract.* **8**, e540–e548 (2014).
 85. Vasan, R. S. Cardiac function and obesity. *Heart* **89**, 1127–9 (2003).
 86. Symons, J. D. & Abel, E. D. Lipotoxicity contributes to endothelial dysfunction: a focus on the contribution from ceramide. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**, 59–68 (2013).
 87. Sacks, H. S. & Fain, J. N. Human epicardial fat: what is new and what is missing? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **38**, 879–887 (2011).
 88. Turer, A. T., Hill, J. A., Elmquist, J. K. & Scherer, P. E. Adipose tissue biology and cardiomyopathy: translational implications. *Circ. Res.* **111**, 1565–77 (2012).
 89. Drosatos, K. & Schulze, P. C. Cardiac Lipotoxicity: Molecular Pathways and Therapeutic Implications. *Curr. Heart Fail. Rep.* **10**, 109–121 (2013).
 90. Tsutsui, H., Kinugawa, S. & Matsushima, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **301**, 2181–2190 (2011).
 91. Bahrami, H. *et al.* Novel metabolic risk factors for incident heart failure and their relationship with obesity: the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1775–83 (2008).
 92. Dutka, M. *et al.* Various aspects of inflammation in heart failure. *Heart Fail. Rev.* **25**, 537–548 (2020).
 93. Murphy, S. P., Kakkar, R., McCarthy, C. P. & Januzzi, J. L. Inflammation in Heart Failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **75**, 1324–1340 (2020).
 94. Karmazyn, M., Purdham, D. M., Rajapurohitam, V. & Zeidan, A. Signalling mechanisms underlying the metabolic and other effects of adipokines on the heart. *Cardiovasc. Res.* **79**, 279–86 (2008).
 95. Foster, M. C. *et al.* Overweight, Obesity, and the Development of Stage 3 CKD: The Framingham Heart Study. *Am. J. Kidney Dis.* **52**, 39–48 (2008).
 96. Kramer, H. *et al.* Obesity and Prevalent and Incident CKD: The

- Hypertension Detection and Follow-Up Program. *Am. J. Kidney Dis.* **46**, 587–594 (2005).
97. Cachofeiro, V. *et al.* Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int.* **74**, S4–S9 (2008).
 98. Raimundo, M. & Lopes, J. A. Metabolic Syndrome, Chronic Kidney Disease, and Cardiovascular Disease: A Dynamic and Life-Threatening Triad. *Cardiol. Res. Pract.* **2011**, 1–16 (2011).
 99. Zhang, X. & Lerman, L. O. The metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Transl. Res.* **183**, 14–25 (2017).
 100. Siqueira, J. S. *et al.* Rice bran modulates renal disease risk factors in animals submitted to high sugar-fat diet. *Brazilian J. Nephrol.* **43**, 156–164 (2021).
 101. Gajjala, P. R., Sanati, M. & Jankowski, J. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Kidney Disease with Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases as Its Comorbidities. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
 102. D’Agati, V. & Schmidt, A. M. RAGE and the pathogenesis of chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 352–360 (2010).
 103. Dietrich, P. & Hellerbrand, C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **28**, 637–653 (2014).
 104. Divella, R., Mazzocca, A., Daniele, A., Sabbà, C. & Paradiso, A. Obesity, Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Adipocytokines Network in Promotion of Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **15**, 610–616 (2019).
 105. Silva Rosa, S. C., Nayak, N., Caymo, A. M. & Gordon, J. W. Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue. *Physiol. Rep.* **8**, (2020).
 106. Lambertucci, F. *et al.* Disruption of tumor necrosis factor alpha receptor 1 signaling accelerates NAFLD progression in mice upon a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* **58**, 17–27 (2018).
 107. Petersen, M. C. & Shulman, G. I. Roles of Diacylglycerols and Ceramides

- in Hepatic Insulin Resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 649–665 (2017).
108. Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R. J. & Blumberg, R. S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 469–484 (2016).
 109. Apostolopoulou, M. *et al.* Specific Hepatic Sphingolipids Relate to Insulin Resistance, Oxidative Stress, and Inflammation in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Diabetes Care* **41**, 1235–1243 (2018).
 110. Watt, M. J. *et al.* Regulation of plasma ceramide levels with fatty acid oversupply: evidence that the liver detects and secretes de novo synthesised ceramide. *Diabetologia* **55**, 2741–2746 (2012).
 111. Kim, C. W. *et al.* Acetyl CoA Carboxylase Inhibition Reduces Hepatic Steatosis but Elevates Plasma Triglycerides in Mice and Humans: A Bedside to Bench Investigation. *Cell Metab.* **26**, 394-406.e6 (2017).
 112. Nita, M. & Grzybowski, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
 113. Sanyal, A. J. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**, 1183–1192 (2001).
 114. Koliaki, C. *et al.* Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metab.* **21**, 739–746 (2015).
 115. De, A., Ahmad, N., Mehta, M., Singh, P. & Duseja, A. NAFLD vs. MAFLD – It is not the name but the disease that decides the outcome in fatty liver. *J. Hepatol.* **76**, 475–477 (2022).
 116. Gugliandolo, A., Bramanti, P. & Mazzon, E. Activation of Nrf2 by Natural Bioactive Compounds: A Promising Approach for Stroke? *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4875 (2020).
 117. Teodoro, A. J. Bioactive Compounds of Food: Their Role in the Prevention and Treatment of Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 1–4 (2019).

118. Hu, G. *et al.* High-throughput phenotypic screen and transcriptional analysis identify new compounds and targets for macrophage reprogramming. *Nat. Commun.* **12**, 773 (2021).
119. Jayarathne, S. *et al.* Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Properties of Food Bioactive Components: Effects on Adipose Tissue. *Prev. Nutr. Food Sci.* **22**, 251–262 (2017).
120. 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).
121. Mollace, V. *et al.* Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: From animal models to human studies. *Fitoterapia* **82**, 309–316 (2011).
122. Risitano, R. *et al.* Flavonoid fraction of bergamot juice reduces LPS-induced inflammatory response through SIRT1-mediated NF- κ B inhibition in THP-1 monocytes. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
123. Di Donna, L. *et al.* Statin-like principles of bergamot fruit (*Citrus bergamia*): Isolation of 3-hydroxymethylglutaryl flavonoid glycosides. *J. Nat. Prod.* **72**, 1352–1354 (2009).
124. Moufida, S. & Marzouk, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry* **62**, 1283–1289 (2003).
125. Miceli, N. *et al.* Hypolipidemic effects of *Citrus bergamia* Risso et Poiteau juice in rats fed a hypercholesterolemia diet. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10671–10677 (2007).
126. 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).
127. Ferlemi, A. V. & Lamari, F. N. Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* **5**, (2016).
128. Carolo dos Santos, K. *et al.* Recovery of Cardiac Remodeling and

- Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1–9 (2018).
129. 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**, 141 (2021).

3. Justificativa e hipótese

A prevalência de indivíduos obesos aumentou nas últimas décadas, sobretudo resultante do consumo de dietas ricas em açúcar e gordura. O consumo excessivo dessas dietas estimula mecanismos que levam a um quadro inflamatório e pró-oxidante, contribuindo com o desenvolvimento de complicações metabólicas como resistência insulínica, dislipidemia, hiperglicemia, hipertensão, distúrbios endócrinos, dentre outros. A condição do estado redox/inflamatório atua de maneira sistêmica, gerando complicações capazes de atingir e comprometer o organismo como um todo, associando-se à distúrbios no TA, coração, fígado e rins, órgãos-alvo da obesidade. A adição de compostos bioativos, ricos em polifenóis, no hábito alimentar atua de forma benéfica pois, além de reduzir a inflamação e o estresse oxidativo gerados por dietas obesogênicas, podem ser facilmente introduzidos na rotina alimentar dos indivíduos através do consumo de frutas, legumes e vegetais. Baseado nisso, visto que não existem trabalhos envolvendo a ação do extrato das folhas da bergamota no tratamento da inflamação e do estresse oxidativo em obesidade e comorbidades consequentes ao consumo de dieta rica em açúcar e gordura, a hipótese desse trabalho é que o extrato de folhas de bergamota, rico em compostos bioativos, será capaz de atenuar a inflamação e o estresse oxidativo dos órgãos alvo da obesidade (figura 3).

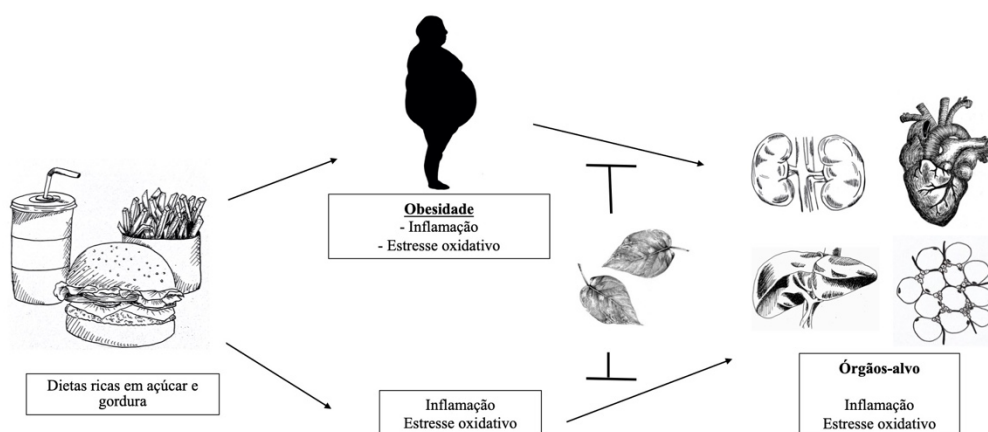


Figura 3. Representação esquemática da hipótese. O consumo de dietas ricas em açúcares e gorduras, essencialmente hipercalóricas, desencadeia um processo de inflamação e estresse oxidativo associado à obesidade. O processo inflamatório e o estresse oxidativo levam ao desenvolvimento de desordens metabólicas que podem atingir diversos órgãos, podendo desenvolver diversas doenças. A bergamota (*Citrus bergamia*), rica em compostos bioativos, será capaz de atenuar o estado redox/inflamatório no tecido adiposo, coração, fígado e rins de animais submetidos à dieta rica em açúcar e gordura.

4. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do extrato de folhas de bergamota (*Citrus bergamia*) sobre o tratamento de parâmetros do estado RedOx/inflamatório nos órgãos alvos da obesidade (fígado, rins, coração e tecido adiposo) em animais submetidos a dieta rica em açúcar e gordura.

4.1. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil nutricional;
- Avaliar as comorbidades;
- Avaliar citocinas inflamatórias no tecido adiposo, coração, fígado e rins;
- Avaliar parâmetros do sistema redox no tecido adiposo, coração, fígado e rins

Capítulo 2 – Artigo Científico 1

Efeito do extrato de folhas de bergamota sobre o cenário redox/inflamatório em órgãos-alvo da obesidade

Juliana Silva Siqueira¹, Erika Tiemi Nakandakare-Maia¹, Taynara Aparecida Vieira¹, Thiago Luiz Novaga Palacio¹, Giovanna Baron³, Artur Junio Togneri Ferron^{1,2}, Giancarlo Aldini³, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron^{1,2}, Camila Renata Correa¹

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu, 18618687, Brasil.

² Faculdades Integradas de Bauru (FIB), Bauru, 17056-100, Brasil.

³ Universidade de Milão, Departamento de ciências farmacêuticas, 20133, Milão, Itália

Resumo

Introdução: O alto consumo de dietas ricas em açúcares e gorduras associa-se ao desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas e aumento de inflamação e estresse oxidativo, comprometendo tecidos e órgãos. A bergamota (*Citrus bergamia*) é um fruto com propriedade anti-inflamatória e antioxidante que possui composição bioativa semelhante à sua folha. Dito isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato de folhas de bergamota sobre o cenário redox/inflamatório em diferentes órgãos-alvo da obesidade em animais submetidos à dieta rica em açúcar e gordura.

Metodologia: Ratos Wistar machos foram distribuídos em 2 grupos experimentais recebendo dieta controle (C, n=24) e dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=24) por 20 semanas. Posteriormente, os animais foram redistribuídos a partir do critério de inclusão para o tratamento com extrato da folha de bergamota (Fo) por gavage (50mg/kg animal) em 4 grupos: C (C=10), C+Fo (n=10), HSF (n=10) e HSF+Fo (n=10) por 10 semanas. Os animais foram avaliados quando ao perfil nutricional, metabólico e hormonal; função cardíaca, hepática e renal; parâmetros inflamatórios e do estresse oxidativo. **Resultados:** O grupo HSF apresentou obesidade, dislipidemia, hiperglicemia, resistência insulínica, hipertensão, disfunção cardíaca, hepática e renal, inflamação e estresse oxidativo nos órgãos-alvo da obesidade. O tratamento com Fo mostrou proteção, demonstrando redução de triglicérides, insulina e resistência insulínica; aumento de níveis séricos de HDL colesterol; e redução da inflamação e do estresse oxidativo no tecido adiposo, coração, fígado e rins. **Conclusão:** O extrato da folha de bergamota atuou em diferentes tecidos, melhorando o cenário redox/inflamatório de animais obesos.

Palavras-Chave: dieta ocidental, composto bioativo, inflamação, estresse oxidativo

1. Introdução

O consumo excessivo de dietas hipercalóricas, ricas em açúcares simples e gorduras saturadas, promove expansão do tecido adiposo, condição conhecida como obesidade, pilar patogênico para o desenvolvimento de síndrome metabólica e também doenças cardiovasculares, renais e hepáticas^{1,2}.

O tecido adiposo (TA) é um órgão de ação autócrina, parácrina e endócrina, atuante no controle da homeostase energética³. Em condições de balanço energético positivo, o TA pode se tornar disfuncional, apresentando capacidade de estoque excedida a partir de prejuízos nos mecanismos de adaptações celulares, contribuindo com o aumento da resposta inflamatória e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive oxygen species*), gerando estresse oxidativo⁴. Uma vez que esse processo se torna crônico, essa condição atinge níveis sistêmicos, alcançando e comprometendo diversos tecidos e órgãos⁵⁻⁹.

Em contrapartida, a adição de compostos bioativos na dieta, com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, tem estado cada vez mais em evidência, podendo atuar como estratégia terapêutica não medicamentosa frente a doenças metabólicas¹⁰. A Bergamota (*Citrus bergamia*) vem sendo destacada nos últimos anos a partir do suco do fruto, evidenciando sua fração polifenólica (BPF – *Bergamot Polyphenolic Fraction*) com ação hipolipêmica, hipoglicêmica, anti-inflamatória, antioxidante e seus efeitos sobre tratamento de doenças associadas à síndrome metabólica¹¹⁻¹⁵. No entanto, Baron et al (2021) conduziram um estudo caracterizando e comparando compostos bioativos presentes no extrato de folhas e frutos de bergamota, e demonstraram que as folhas apresentam uma quantidade maior de polifenóis, evidenciando o potencial do extrato como terapêutica metabólica alternativa que, durante o processo de produção do extrato a partir do fruto, seria desperdiçado¹⁶. Dito isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato de folhas de bergamota sobre o cenário redox/inflamatório em diferentes órgãos-alvo da obesidade em animais submetidos à dieta rica em açúcar e gordura (HSF – *High Sugar-Fat diet*). Uma vez que apenas nosso grupo publicou um trabalho *in vivo* utilizando extrato das folhas desse *Citrus*¹⁷, a presente investigação, envolvendo diversos

órgãos, será um passo inicial para que futuros trabalhos possam avaliar os mecanismos envolvidos na terapêutica de doenças associadas ao estresse oxidativo e inflamação.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais e modelo experimental

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos (n=48), 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 casualmente distribuídos em 2 grupos para receberem dieta controle (C, n=24 animais) e dieta rica em açúcar e gordura (HSF, n=24 animais) por um período de 20 semanas. Os grupos que receberam HSF também receberam sacarose na água de beber na concentração de 25%.

2.1.1. Critério de inclusão

Após esse período, uma vez que animais submetidos a diferentes modelos de dieta nem sempre apresentam a resposta esperada, podendo gerar equívoco na classificação dos animais, foi adotado, como critério de inclusão, um ponto de separação a partir do peso corporal, triglicérides plasmáticos, ecocardiograma e função renal dos animais em 20 semanas entre os grupos através do ponto médio entre o limite superior do grupo controle e o limite inferior do grupo HSF. Animais do grupo HSF abaixo do ponto de separação que não apresentaram aumento de peso, níveis elevados de triglicérides plasmáticos e disfunção cardíaca e renal foram excluídos do estudo, ao mesmo passo que animais do grupo Controle abaixo do ponto de separação para as variáveis selecionadas também foram excluídos.

Em seguida, os animais foram realocados aleatoriamente para receberem dieta controle com tratamento placebo (C, n= 10 animais), dieta controle com extrato da folha de bergamota (C+ Fo, n= 10 animais), dieta HSF com tratamento placebo (HSF, n=10 animais) e dieta HSF com extrato da folha de bergamota (HSF + Fo, n=10 animais) por 10 semanas, totalizando 30 semanas de experimento. As

ofertas de ração e água foram *ad libitum*. O consumo das dietas e da ingestão calórica foram controlados semanalmente; a ingestão calórica foi determinada pelo produto do consumo e teor energético das dietas. Para acompanhar o desenvolvimento do animal, o peso corporal foi aferido semanalmente, sendo os ratos mantidos em gaiolas individuais, em meios enriquecidos com toalhas de papel amassadas em formato de bolas com a finalidade de diminuir o estresse. A temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade foram controladas ($55\pm 5\%$) e mantiveram o ciclo claro-escuro (12-12hs). O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, São Paulo, Brasil (CEUA: 1393/2021), e seguiu recomendações do *Guide for the Care and Use of Experimental Animals*. Ao fim de do período experimental, os animais foram expostos ao jejum de 8 horas e em seguida anestesiados com Tiopental (120mg/kg/IP). Após verificação dos reflexos palpebral, podal, interdigital e caudal, os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta de tecidos e sangue para avaliações.

O modelo dietético segue o modelo já estabelecido e publicado por nosso grupo de pesquisa⁶. A composição das rações se encontra na tabela 1.

Tabela 1. Composição das rações.

Ingredientes	Dieta	
	Controle	HSF
Farelo de soja (g/kg)	335	340
Sorgo (g/kg)	278	80
Casca de soja (g/kg)	188.5	116.7
Dextrina (g/kg)	146.5	20
Sacarose (g/kg)	-	80
Frutose (g/kg)	-	180
Óleo de soja (g/kg)	23	-
Banha (g/kg)	-	154.3
Minerais (g/kg)	25	25

Sal (g/kg) 4 8

Componentes		
Proteína (%)	20	16
Carboidrato (%)	60	70
Gordura (%)	4	14.6
% Energia de proteínas	22.85	13.45
% Energia de carboidratos	66.78	58.69
% Energia de gordura	10.37	27.8
Energia (kcal/g)	3,59	4,35

HSF: adição também de 25% de sacarose na água

2.2.Extrato das folhas da bergamota e administração

As folhas de bergamota foram colhidas em uma fazenda localizada na região de Reggio Calabria, Itália, e o extrato seco foi obtido pela H&AD (Herbal & Antioxidant Derivatives S.r.l.) localizada em Località Chiusi, 89032 Bianco (RC), Itália (www.head-sa.com). Os processos envolvidos na extração foram descritos e publicados por nosso grupo de pesquisa¹⁷.

A administração desse extrato para os animais foi por gavagem realizada diariamente, na dose de 50mg/Kg de peso do animal diluído em água potável; os animais dos grupos placebo, receberam somente água potável também por gavagem diariamente da mesma forma que o grupo tratado. A dose foi estabelecida de acordo com dados da literatura que utilizam essa concentração para estudos com o suco da fruta¹⁸.

2.3.Perfil Nutricional

O perfil nutricional foi avaliado de acordo com os seguintes parâmetros: ingestão calórica, peso corporal e índice de adiposidade. A ingestão calórica foi

determinada pela multiplicação do valor energético de cada dieta ($\text{g} \times \text{Kcal}$) pelo consumo alimentar diário. Para o grupo HSF, a ingestão calórica também incluiu calorias da água ($0,25 \times 4 \times \text{mL}$ consumido).

O índice de adiposidade foi utilizado como indicador de obesidade, uma vez que permite 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 $[(\text{epididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{visceral}) / \text{peso corporal} \times 100]$ foi considerada o índice de adiposidade¹⁹.

2.4. Comorbidades

Em razão da obesidade ser associada a alterações da função hepática, renal e nos perfis cardiovascular, glicídico, lipídico e hormonal, as seguintes variáveis foram analisadas:

2.4.1 Pressão arterial sistólica

A análise da pressão arterial sistólica foi realizada por meio da técnica de plestimografia segundo Pfeffer et al., (1971, utilizando-se eletroesfigmomanômetro *Narco Bio-System*® PE 300, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, Houston, TX, USA)²⁰. Este método não permite avaliar a pressão arterial diastólica. Os animais serão aquecidos (40°C) durante 5 minutos, em uma caixa de madeira ($50 \times 40 \text{ cm}$) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada, com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal. Em seguida, manguito conectado a transdutor de pulso é acoplado à cauda do animal, sendo posteriormente insuflado (200 mmHg) e desinsuflado, respectivamente, para registro das pulsações arteriais. Os registros foram coletados no polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA).

2.4.2 Estrutura e função cardíaca

A avaliação ecocardiográfica Doppler foi realizada por um examinador treinado. Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (1 mg/kg). Após tricotomia da região anterior do peito, os animais foram colocados delicadamente em decúbito lateral esquerdo para a análise. O equipamento usado foi o model Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Israel) com transdutor ultrassônico multifrequencial de 5.0 a 11.5 MHz. Para as medidas estruturais do coração, as imagens foram obtidas em mode unidimensional (M-mode) guiadas por imagens bidimensionais com transdutor em posição paraesternal eixo curto. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada pelo posicionamento do cursor M-mode logo abaixo do plano da válvula mitral no nível dos músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas pelo posicionamento do cursor M-mode ao nível da valva aórtica.

As seguintes estruturas serão utilizadas para analisar a morfologia cardíaca: diâmetro diastólico ventricular esquerdo (DDVE); espessura diastólica da parede posterior (EDPP), espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV), índice de massa, espessura relativa do VE e fração de encurtamento endocárdico. A função sistólica do ventrículo esquerdo será feita pelos parâmetros: fração de encurtamento endocárdico; velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) e fração de ejeção. A função diastólica do ventrículo esquerdo será avaliada pelo tempo de desaceleração da onda E (TDE) e razão da onda E/E'²¹.

2.4.3 Análise Hepática

Função hepática

Para avaliar a função hepática os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram aferidos por método enzimático-colorimétrico através do aparelho automatizado (Technicon, RA-XTTM System, Global Medical Instrumentation, Minessota, USA), utilizando kits CELM®, Barueri, São Paulo, Brasil. A razão entre AST e ALT marca a progressão do comprometimento hepático²².

Lipidose hepática

Foi avaliada a presença de lipidose microvesicular por meio de análise de lâminas histológicas do tecido hepático. O tecido hepático foi armazenado após a coleta, em paraformaldeído 4% com 0,1M de tampão de fosfato (pH=7,4) durante as primeiras 24 horas. O tecido foi transferido para o álcool etílico até fixação em parafina. A partir do bloco parafinizado, foram obtidos cortes histológicos que foram fixados em lâmina e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Posteriormente, as lâminas foram analisadas por um patologista treinado quanto à presença de esteatose microvesicular a partir da porcentagem de hepatócitos afetados por campo observado (10 campos). Os campos foram pontuados como 0 (nenhum a 5% afetado), 1 (6-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75% afetado), 4 (75-100%), adaptado de Moreto et al (2021)²³.

2.4.4. Análise da função renal

Urina de 12 horas

A urina foi coletada durante 12 horas (animais em gaiolas metabólicas individuais) em tubos cônicos contendo 1mL do antioxidante hidróxido tolueno butilado (BHT 360mM – *Butylated Hydroxytoluene*) e aproximadamente 5mL destas alíquotas foram estocadas a - 80°C até a análise. Posteriormente, foram aferidas as concentrações de creatinina e proteínas totais por meio de kits comerciais

colorimétricos (kits CELM®, Barueri, São Paulo, Brasil). Para avaliar a função renal foi considerada a proteinúria e a função renal pela taxa de filtração glomerular²⁴.

2.4.5. Parâmetros Plasmáticos

Foram aferidos no plasma dos animais os níveis de glicose, triacilglicerol e Lipoproteína de alta densidade (HDL – *High Density Lipoprotein*), por método enzimático-colorimétrico através do aparelho automatizado (Technicon, RA-XTTM System, Global Medical Instrumentation, Minnessota, USA), utilizando kits CELM®, Barueri, São Paulo, Brasil.

A quantificação de insulina foi obtida no plasma por meio da técnica de ELISA, utilizando kit comercial (Linco Research Inc., R&D Systems, Millipore e B-Brigde International Inc.). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). O Homeostatic Model Assessment -Insulin Resistance (HOMA- IR) foi considerado marcador de resistência à insulina e calculado de acordo com a fórmula $HOMA-IR = (glicemia\ de\ jejum\ (mmol/L) \times insulina\ de\ jejum\ (\mu U/mL))/22.5$ ²⁵.

2.4.6. Análise nos órgãos alvos

A inflamação e o estresse oxidativo decorrentes do consumo de dietas ricas em açúcar e gordura e da obesidade têm efeitos em diversos órgãos-alvo²⁶. Assim, o efeito do extrato da folha de bergamota sobre os parâmetros inflamatórios e do sistema RedOx descritos abaixo foram analisados no fígado, rins, coração e tecido adiposo dos animais.

Parâmetros inflamatórios

Os tecidos foram homogeneizados com solução gelada de PBS (1mL, pH 7.4) usando o ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA ® Werke Staufen/Germany, e centrifugadas a 3500rpm, a 4°C por 10 min. O efeito do extrato das folhas de bergamota sobre os parâmetros inflamatórios foi avaliado pela quantificação dos

níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha*), interleucina- 6 (IL-6), Proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein-1*) e interleucina-10 (IL-10) nos órgãos-alvo. As análises foram feitas por meio da técnica de ELISA, utilizando kit comercial (Linco Research Inc., R&D Systems, Millipore e B-Brigde International Inc.). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA).

Parâmetros do sistema RedOx

O efeito da bergamota sobre os parâmetros do sistema RedOx foi avaliado pelos níveis de malondialdeído (MDA), 4-Hidroxinonenal (4-HNE), proteínas carboniladas, capacidade antioxidante hidrofílica e atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase e catalase como segue:

Os tecidos foram homogeneizados com solução gelada de PBS (1mL, pH 7.4) usando o ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA ® Werke Staufen/Germany, e centrifugadas a 3500rpm, a 4°C por 10 min.

Ácido tiobarbitúrico (TBA – *Thiobarbituric acid*) 0,67% na proporção (1: 1) foi adicionado ao sobrenadante e a posteriormente as amostras foram aquecidas por 45 min em banho-maria a 100 °C. O MDA reagiu com o TBA na proporção 1: 2 MDA-TBA e após o resfriamento, a leitura foi realizada a 532 e 600nm em um leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração de MDA foi obtida através do coeficiente de extinção molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e as absorbâncias das amostras e o resultado final expresso em nmol / g de proteína ²⁷.

O 4-hidroxinonenal foi mensurado pela da técnica de ELISA, utilizando kit comercial (Elabscience Biotechnology Co., Ltd, USA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA).

A carbonilação de proteínas foi realizada por um método inespecífico que usa 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH – 2,4-dinitrophenylhydrazine) e detecção

fotométrica de qualquer proteína modificada por carbonilação²⁸. Os níveis de proteína carbonilada estão expressos em nmol de DNPH / mg de proteína.

Os valores plasmáticos de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP – *Advanced oxidation protein products*) serão determinados por espectrofotometria, de acordo com KALOUSOVÁ et al.²⁹, e as concentrações expressas em µmoles/L de equivalentes de cloramina T.

O ensaio FRAP (Método de Redução do ferro - Ferric Reducing Antioxidant Power) foi adaptado de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain, eficiente na determinação da atividade antioxidante pela redução do ferro, apresentado em µM FeSO₄.H₂O/µg proteína em cada tecido³⁰.

Atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase:

Os tecidos foram homogeneizados com solução gelada de Cloreto de Potássio (KCl 1,15%) usando o ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA ® Werke Staufen/Germany, e centrifugadas a 3500rpm, a 4°C por 10 min. A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de CROUCH et al.³¹, tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O₂ - do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Com a adição da amostra, a velocidade de redução do NBT é inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteínas totais (Pt). A atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras foram realizadas à 240nm³².

2.5. Análise Estatística

Os dados estão apresentados em média ± desvio padrão ou mediana (semi-amplitude interquartilica). Diferenças entre os grupos foram determinadas por ANOVA de duas vias ou Kruskal-Wallis com post-hoc de Tukey; significância de 5%. As análises foram feitas através do software SigmaStat 3.5

3. Resultados

3.1. Perfil nutricional-metabólico ao final de 30 semanas.

A tabela 2 apresenta o perfil nutricional-metabólico dos animais ao final do protocolo experimental. O grupo controle + Fo apresentou níveis aumentados de insulina e HOMA-IR em relação ao grupo controle. Os grupos que receberam dieta HSF (HSF e HSF+Fo) apresentaram menor consumo de ração e maior consumo hídrico e calórico, ganho de peso, peso final, presença de obesidade, hipertrigliceridemia, insulina, e hipertensão em relação aos grupos controle (Controle e Controle + Fo). Além disso, os animais do grupo HSF apresentaram maiores níveis de glicose em jejum e resistência insulínica em relação ao grupo controle enquanto o grupo HSF+Fo apresentou níveis aumentados de HDL em relação ao grupo Controle + Fo. Em contrapartida, o tratamento com extrato da folha de bergamota promoveu níveis reduzidos de triglicérides, insulina e resistência insulínica e aumentados de HDL no grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF.

Tabela 2. Perfil nutricional metabólico ao final de 30 semanas.

	Grupos				Efeitos		
	Controle	Controle + Fo	HSF	HSF + Fo	Dieta	Tratamento	Interação
Consumo de Ração (g)	5205.84 ±297.41	4962.92 ±565.79	2618.73 ±381.96*	2668.00 ±382.73 [▲]	<0.001	0.469	0.277
Consumo Hídrico (mL)	7836.50 ±626.99	7757.00 ±1048.69	10123.20 ±995.37*	10399.50 ±920.63 [▲]	<0.001	0.735	0.541
Consumo Calórico (Kcal)	18949.26 ±1082.58	18065.03 ±2059.48	21462.30 ±1757.36*	22003.40 ±2416.32 [▲]	<0.001	0.776	0.242
Ganho de Peso (g)	315.13 ±53.92	281.36 ±67.30	381.31 ±66.37*	382.57 ±83.35 [▲]	<0.001	0.458	0.424
Peso Final (g)	482.37 ±58.86	460.61 ±74.50	578.05 ±69.37*	575.68 ±94.89 [▲]	<0.001	0,617	0.687
Índice de Adiposidade (%)	4.64 ±1.17	4.27 ±0.64	8.58 ±1.69*	7.95 ±2.49 [▲]	<0.001	0,344	0.802
Triglicérides (mg/dL)	31.10 ±7.62	32.00 ±8.16	100.14 ±14.07*	65.43 ±17.76 ^{▲,◇}	<0.001	<0.001	<0.001
HDL (mg/dL)	21.40 ±2.01	20.20 ±2.74	20.50 ±3.31*	23.30 ±3.23 ^{▲,◇}	0.026	0.717	0.205
Glicose em Jejum (mg/dL)	87.10 ±8.45	86.60 ±5.34	96.40 ±9.58*	91.10 ±9.71	0.014	0.285	0.375
Insulina (μU/ml)	6.53 ±2.33	15.59 ±5.41*	26.52 ±4.43*	20.64 ±5.27 ^{▲,◇}	<0.001	0.275	<0.001
HOMA-IR	1.49 ±0.38	3.63 ±0,97*	6.69 ±1.20*	4.39 ±1.02 [◇]	<0.001	0.787	<0.001

PAS (mmHg)	115.03 ±7.03	121.45 ±9.21	142.92 ±8.37*	144.37 ±13.28 ^Δ	<0.001	0.210	0.426
------------	-----------------	-----------------	------------------	-------------------------------	--------	-------	-------

HDL – lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*); HOMA-IR – Avaliação de Modelo Homeostático (*Homeostatic model assessment – Insulin Resistance*); PAS – Pressão Arterial Sistólica; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (*High Sugar-Fat Diet*). Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey; significância de 5% * $p<0.05$ vs. C; ^Δ $p<0.05$ vs. HSF; ^Δ $p<0.05$ vs. Controle+Fo.

3.2.Tecido Adiposo

Inflamação

Os dados referentes à inflamação do tecido adiposo epididimal (TAE) ao final de 30 semanas estão contidos na figura 1. Os animais do grupo HSF apresentaram valores aumentados de TNF- α , IL-6 e reduzidos de IL-10 em relação ao grupo controle. Em contrapartida, o tratamento com extrato da folha de bergamota reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias no TAE no grupo HSF+Fo.

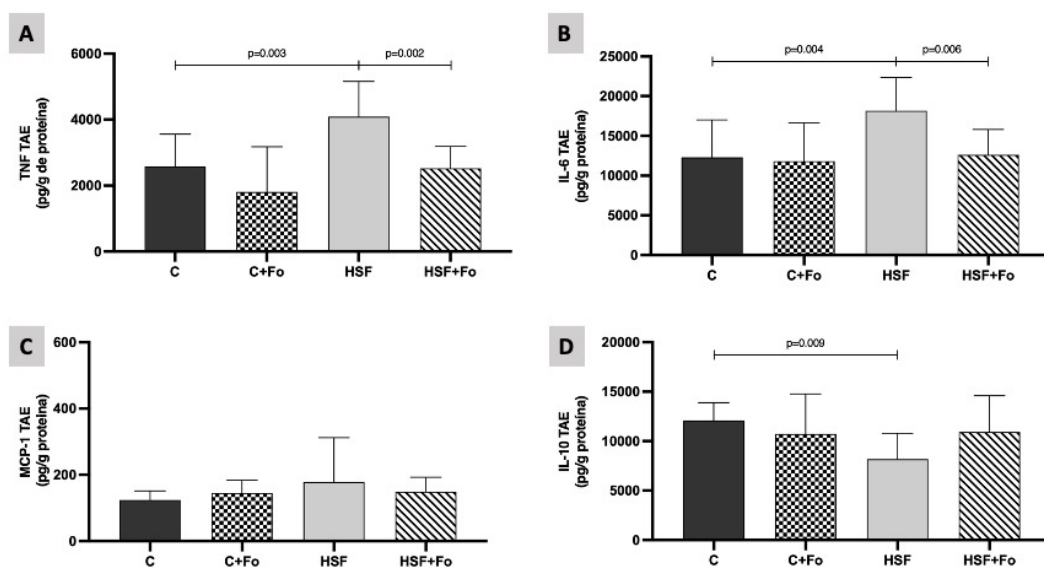


Figura 1. Inflamação no Tecido Adiposo ao final de 30 semanas. (A) TNF- α (pg/g proteína); (B) IL-6 (pg/g proteína); (C) MCP-1 (pg/g proteína); (D) IL-10 (pg/g proteína). Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey; significância de 5%. C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (High Sugar-Fat Diet); TAE – Tecido Adiposo Epididimal; TNF- α – Fator de Necrose tumoral α ; IL-6 – Interleucina 6; MCP-1 – proteína quimioatraente de monócito 1; IL-10 – Interleucina 10.

Estresse oxidativo

A figura 2 apresenta o perfil pró e antioxidante do TAE ao final do protocolo experimental. Os animais do grupo HSF apresentaram níveis elevados de MDA, 4-HNE e CBO e aumento de FRAP em relação ao grupo Controle. Além disso, os animais do grupo HSF+Fo apresentaram valores superiores de 4-HNE, CBO, AOPP, SOD e catalase em relação ao grupo C+Fo, que demonstrou valores reduzidos de CAT em relação ao grupo Controle. Entretanto, o tratamento com extrato da folha de bergamota reduziu os níveis de MDA, 4-HNE, CBO, AOPP e aumentou os níveis da atividade de catalase e potencial antioxidante no grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF.

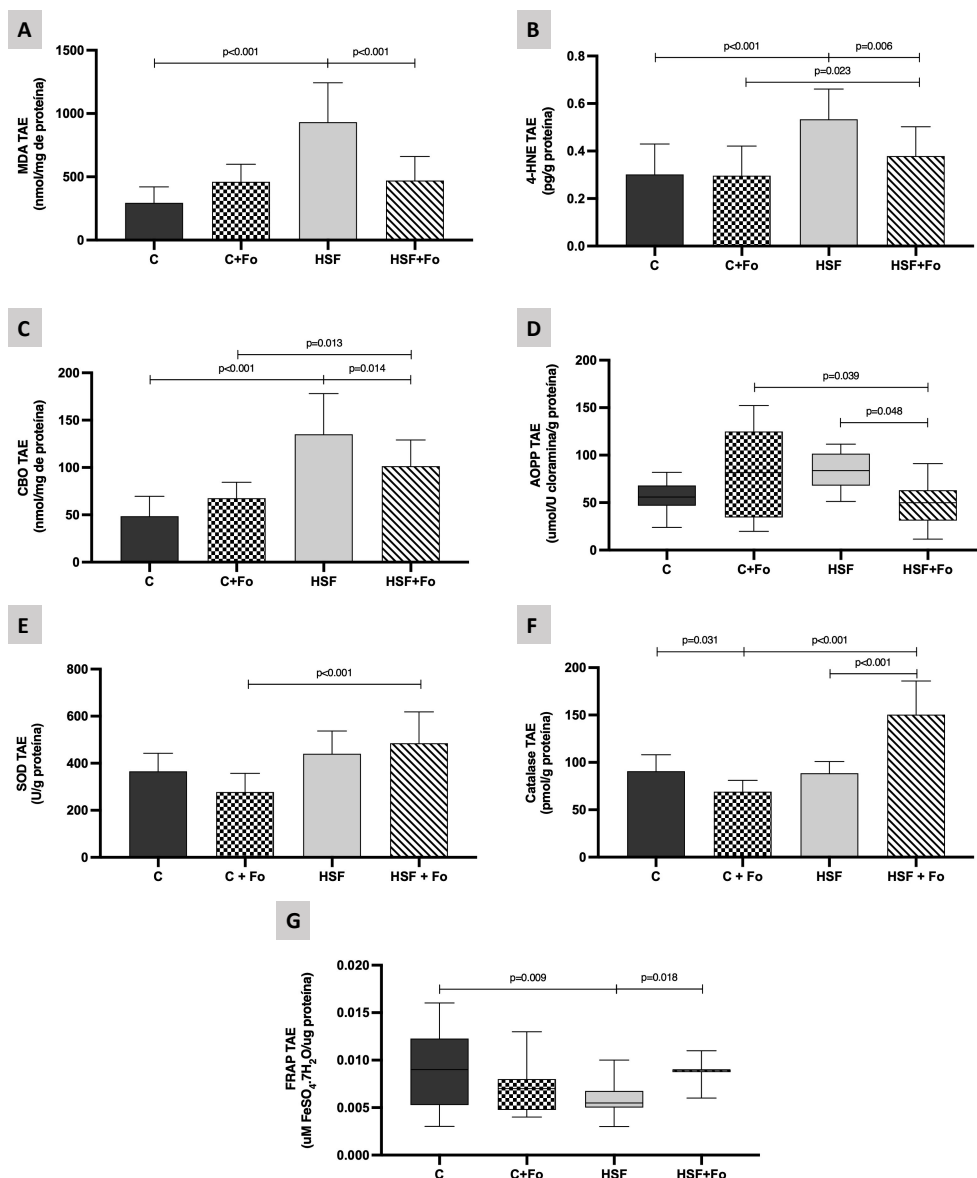


Figura 2. Estresse Oxidativo no Tecido Adiposo Epididimal ao final de 30 semanas. (A) MDA (nmol/mg proteína); (B) 4-HNE (pg/g proteína); (C) CBO (nmol/mg proteína); (D) AOPP (umol/U cloramina/g proteína); (E) SOD (U/g proteína); (F) Catalase (pmol/g proteína); (G) FRAP (uM FeSO₄.H₂O/ug proteína). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão ou mediana (min-max). Comparação por ANOVA de duas vias ou Kruskal-Wallis com post-hoc de Tukey; significância de 5%. MDA – Malondialdeído; 4-HNE – 4-hidroxinonenal; CBO – Carbonilação de proteínas; AOPP – Produtos avançados de oxidação proteica (*Advanced Oxidation Protein Products*); SOD – Superóxido Dismutase; FRAP – Método de Redução do Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*); C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (*High Sugar-Fat Diet*). TAE – Tecido Adiposo Epididimal.

3.3. Coração

Estrutura e função cardíaca

Os parâmetros ecocardiográficos estão presentes na tabela 3. O grupo HSF apresentou remodelamento cardíaco, caracterizado por alterações em variáveis morfológicas (aumento de EDPP, EDSIV, índice de massa e espessura relativa do VE e redução do encurtamento endocárdico), deterioração diastólica (maior TDE e menor E/E') e disfunção sistólica (redução da VEPP e fração de ejeção) em comparação ao grupo controle. O grupo HSF+Fo apresentou valores reduzidos de VEPP e aumentados de E/E' em relação ao grupo Controle + Fo, que demonstrou encurtamento do endocárdio e fração de ejeção reduzidos em relação ao grupo controle. A adição do extrato da folha de bergamota tratou o remodelamento cardíaco e disfunção cardíaca no grupo HSF+Fo quando comparados ao grupo HSF.

Tabela 3. Doppler Ecocardiograma ao final de 30 semanas.

	Grupos				Efeitos		
	Controle	Controle + Fo	HSF	HSF + Fo	Dieta	Tratamento	Interação
EDPP (mm)	1,50 $\pm 0,06$	1,48 $\pm 0,04$	1,89 $\pm 0,20^*$	1,56 $\pm 0,25^\diamond$	<0.001	<0.001	<0.001
EDSIV (mm) ¹	1,52 (1,53-1,50)	1,53 (1,53-1,50)	1,94 (2,14-1,79) [*]	1,56 (1,63-1,23) [◇]	<0.001	<0.001	<0.001
Encurtamento endocárdio (%)	65,37 $\pm 2,60$	60,53 $\pm 4,42^*$	55,34 $\pm 3,69^*$	58,27 $\pm 2,68^\diamond$	<0.001	0,540	<0.001
Índice de Massa VE	1,27 $\pm 0,10$	1,33 $\pm 0,19$	1,81 $\pm 0,17^*$	1,39 $\pm 0,29^\diamond$	<0.001	<0.001	<0.001
Espessura Relativa VE	0,44 $\pm 0,02$	0,45 $\pm 0,04$	0,56 $\pm 0,03^*$	0,45 $\pm 0,06^\diamond$	<0.001	<0.001	<0.001
VEPP (mm/s)	85,30 $\pm 3,80$	81,00 $\pm 6,53$	64,90 $\pm 9,64^*$	72,82 $\pm 5,28^{\diamond, \Delta}$	<0.001	0,200	0.001

TDE (ms) ¹	44,00 (46,00-44,00)	46,00 (46,00-45,00)	57,00 (58,00-51,00)*	47,00 (49,00-44,00) [◇]	<0.001	0,011	<0.001
Fração de Ejeção	0,96 ±0,01	0,94 ±0,02*	0,91 ±0,02*	0,93 ±0,01 [◇]	<0.001	0,969	<0.001
E/E'1	13,36 (13,77-13,19)	12,49 (11,55-13,83)	22,11 (26,93-19,84)*	16,23 (17,00-15,02) ^{◇,▲}	<0.001	<0.001	0.001

EDPP – Espessura diastólica da parede posterior (mm); EDSIV – Espessura diastólica do septo interventricular; VE – Ventrículo esquerdo; VEPP – Velocidade de encurtamento da parede posterior; TDE – Taxa de desaceleração da onda E; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (*High Sugar-Fat Diet*). Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (semi amplitude interquartilica). Comparação por ANOVA de duas vias ou Kruskal-Wallis com post-hoc de Tukey.; significância de 5%. * $p<0.05$ vs. C; [◇] $p<0.05$ vs. HSF; [▲] $p<0.05$ vs. Controle+Fo.

Inflamação

Os parâmetros inflamatórios no coração ao final de 30 semanas estão contidos na figura 3. Os animais do grupo HSF apresentaram valores aumentados de TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-10 em relação ao grupo controle. Além disso, o tratamento com extrato da folha de bergamota reduziu os níveis das citocinas no coração do grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF.

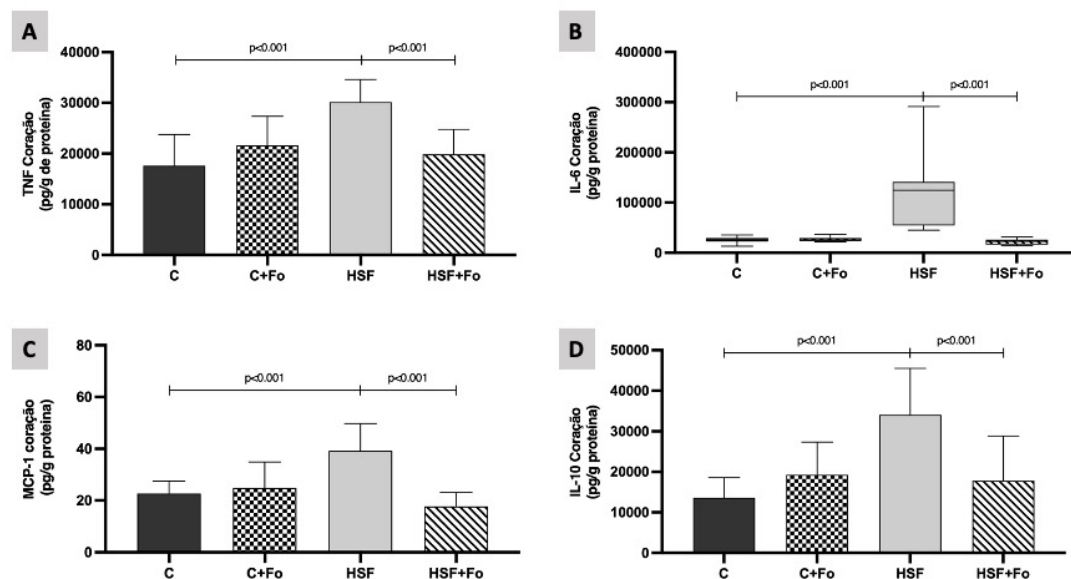


Figura 3. Inflamação no Coração ao final de 30 semanas. (A) TNF- α (pg/g proteína); (B) IL-6 (pg/g proteína); (C) MCP-1 (pg/g proteína); (D) IL-10 (pg/g proteína). Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (min-max). Comparação por ANOVA de duas vias ou Kruskal-Wallis com post-hoc de Tukey; significância de 5%. C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (*High Sugar-Fat Diet*); TNF- α – Fator de Necrose tumoral α ; IL-6 – Interleucina 6; MCP-1 – proteína quimioatraente de monócito 1; IL-10 – Interleucina 10.

Estresse oxidativo

A figura 4 apresenta o perfil pró e antioxidante do coração ao final do protocolo experimental. Os animais do grupo HSF apresentaram níveis elevados de MDA, 4-HNE, CBO e AOPP e redução de SOD, Catalase e FRAP em relação ao grupo Controle. Além disso, os animais do grupo HSF+Fo apresentaram valores reduzidos de catalase e aumentados de FRAP em relação ao grupo C+Fo, que demonstrou valores aumentados de MDA, CBO e reduzidos de SOD e FRAP em relação ao grupo Controle. Entretanto, o tratamento com extrato da folha de bergamota reduziu os níveis de 4-HNE, CBO e AOPP e aumentou o potencial antioxidante no grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF.

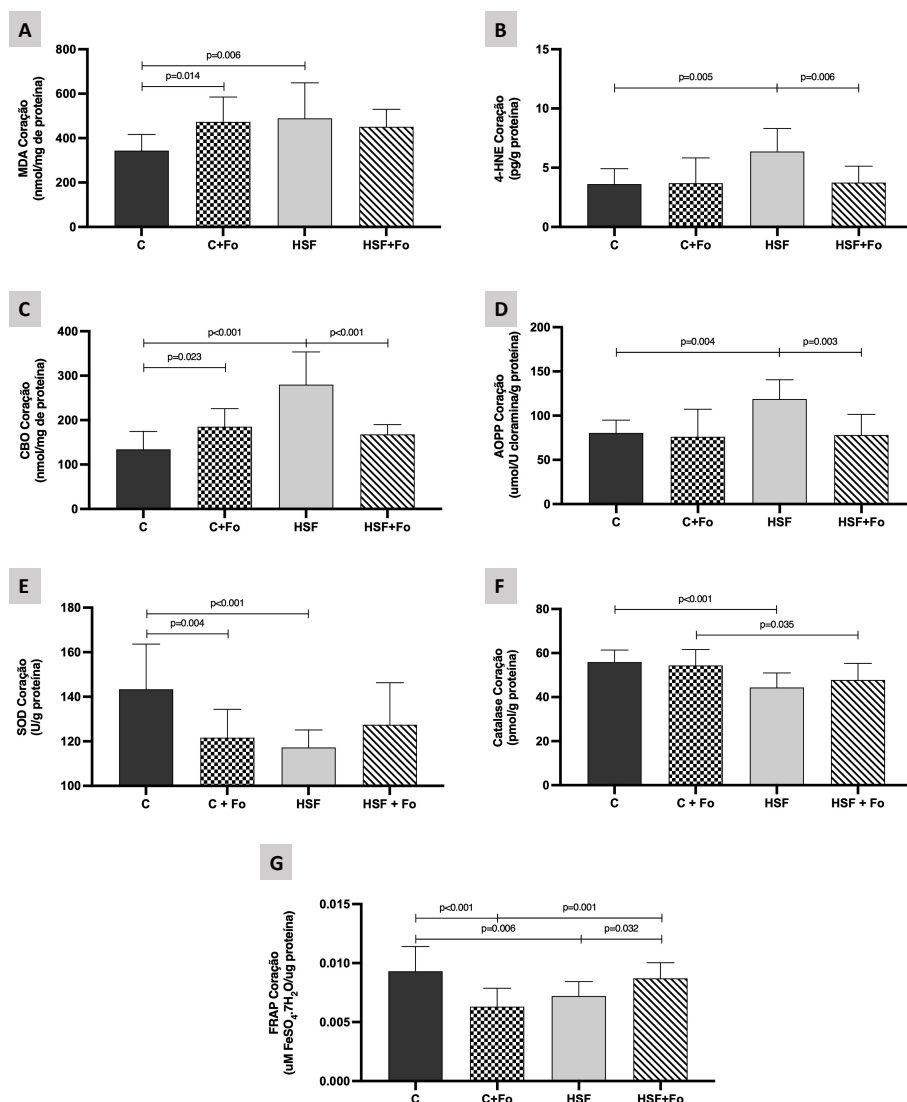


Figura 4. Estresse Oxidativo no Coração ao final de 30 semanas. (A) MDA (nmol/mg proteína); (B) 4-HNE (pg/g proteína); (C) CBO (nmol/mg proteína); (D) AOPP (umol/U cloramina/g proteína); (E) SOD (U/g proteína); (F) Catalase (pmol/g proteína); (G) FRAP (uM FeSO₄.H₂O/ug proteína). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey; significância de 5%. MDA – Malondialdeído; 4-HNE – 4-hidroxinonenal; CBO – Carbonilação de proteínas; AOPP – Produtos avançados de oxidação proteica (*Advanced Oxidation Protein Products*); SOD – Superóxido Dismutase; FRAP – Método de Redução do Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*); C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (*High Sugar-Fat Diet*).

3.4. Fígado

Função hepática

Para avaliar a função hepática, a figura 5 apresenta os valores de AST, ALT e a razão AST/ALT ao final de 30 semanas. Foi observada diferença significativa entre os grupos que consumiram dieta controle a partir da redução de AST no grupo C+Fo em relação ao grupo Controle e aumento da relação AST/ALT dos grupos que consumiram dieta HSF (HSF e HSF+Fo) em relação aos controles (C e C+Fo).

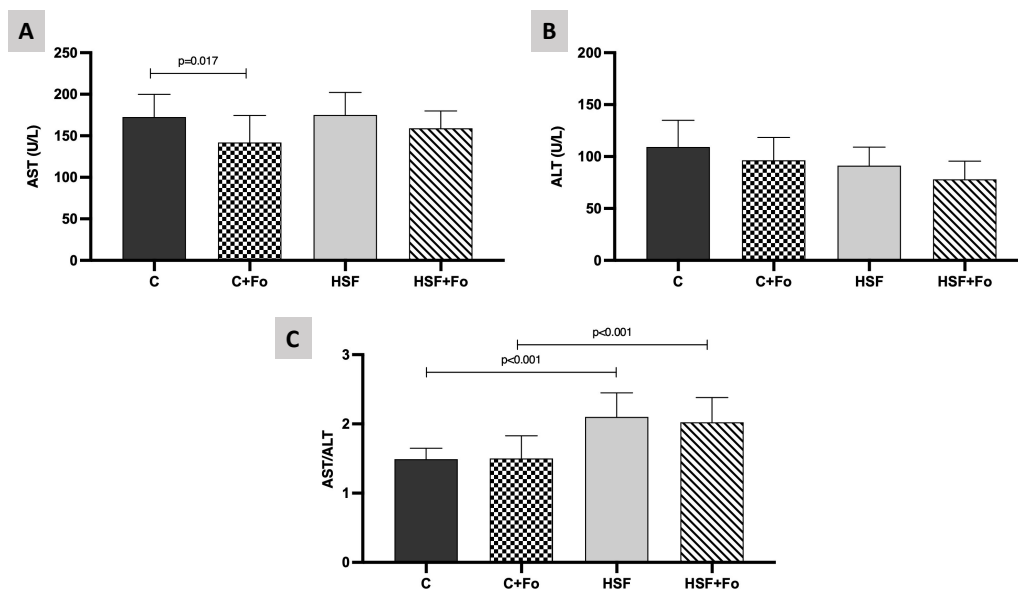
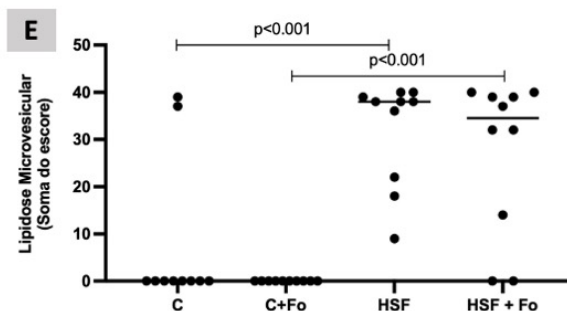


Figura 5. Função Hepática. (A) AST (U/L); (B) ALT (U/L); (C) AST/ALT. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias; significância de 5%. C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (*High Sugar-Fat Diet*); AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase.

Análise Histológica



67

Inflamação

Os parâmetros inflamatórios no fígado ao final de 30 semanas estão contidos na figura 7. Os animais do grupo HSF apresentaram valores aumentados de TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-10 em relação ao grupo controle. O grupo HSF+Fo apresentou maiores níveis de MCP-1 e IL-10 quando comparado ao grupo Controle+Fo. Entretanto, o tratamento com extrato da folha de bergamota reduziu os níveis de TNF- α e MCP-1 no grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF.

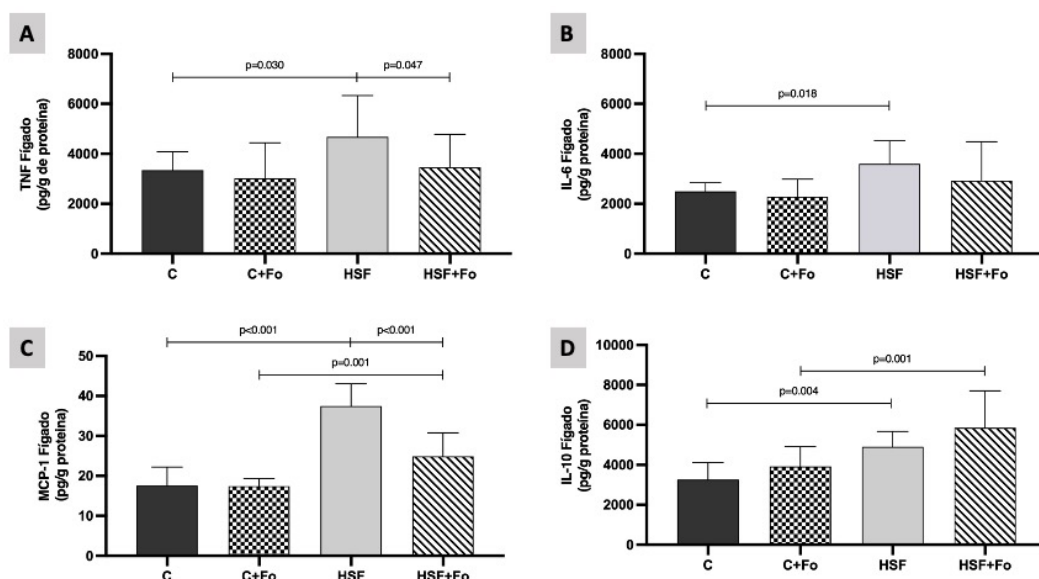


Figura 7. Inflamação no Fígado ao final de 30 semanas. (A) TNF- α (pg/g proteína); (B) IL-6 (pg/g proteína); (C) MCP-1 (pg/g proteína); (D) IL-10 (pg/g proteína). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias; significância de 5%. C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (High Sugar-Fat Diet); TNF- α – Fator de Necrose tumoral α ; IL-6 – Interleucina 6; MCP-1 – proteína quimioatratante de monócito 1; IL-10 – Interleucina 10.

Estresse oxidativo

A figura 8 apresenta o perfil pró e antioxidante no fígado ao final do protocolo experimental. Os animais do grupo HSF apresentaram níveis elevados de MDA, CBO e redução de SOD, Catalase e FRAP em relação ao grupo Controle. Além disso, os animais do grupo HSF+Fo apresentaram valores reduzidos de 4-HNE, AOPP, SOD e catalase em relação ao grupo C+Fo, que apresentou redução de FRAP em relação ao grupo controle. Ainda, o tratamento com extrato da folha

de bergamota reduziu os níveis de MDA e CBO e apresentou aumento da atividade antioxidante das enzimas SOD e catalase, além de aumento do potencial antioxidante no grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF.

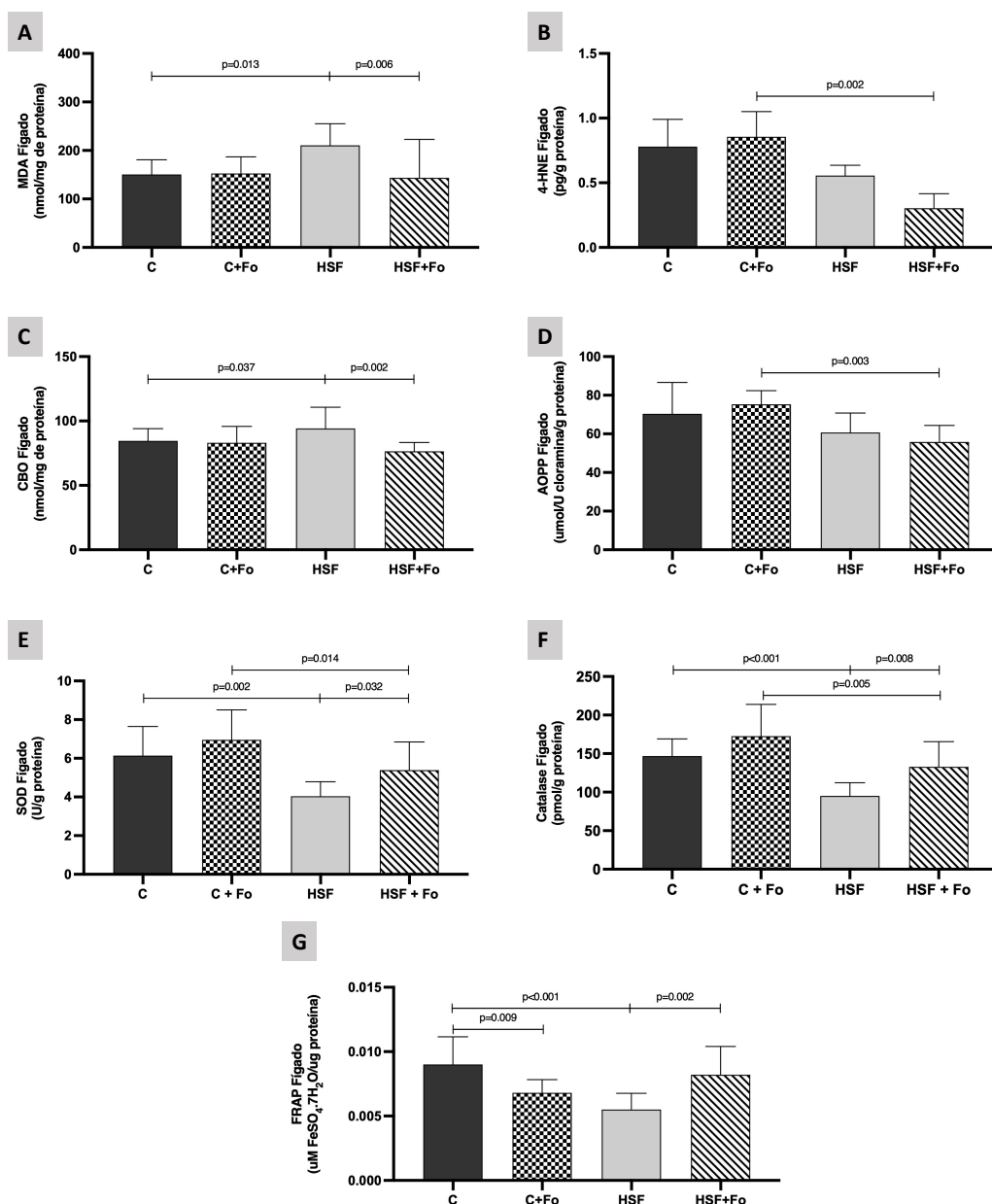


Figura 8. Estresse Oxidativo Hepático ao final de 30 semanas. (A) MDA (nmol/mg proteína); (B) 4-HNE (pg/g proteína); (C) CBO (nmol/mg proteína); (D) AOPP (umol/U cloramina/g proteína); (E) SOD (U/g proteína); (F) Catalase (pmol/g proteína); (G) FRAP (uM FeSO₄·7H₂O/g proteína). Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey; significância de 5%. MDA – Malondialdeído; 4-HNE – 4-hidroxinonanal; CBO – Carbonilação de proteínas; AOPP – Produtos avançados de oxidação proteica (Advanced Oxidation Protein Products); SOD – Superóxido Dismutase; FRAP – Método de Redução do Ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*); C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica

em açúcar e gordura (High Sugar-Fat Diet).

3.5. Rins

Função Renal

O grupo HSF desenvolveu doença renal quando comparado ao grupo controle, caracterizado por aumento da relação proteína/creatinina e redução da taxa de filtração glomerular. O grupo C+Fo apresentou redução da relação proteína/creatinina quando comparado ao grupo controle. Além disso, o tratamento com o extrato proporcionou reduziu a proteinúria e melhorou a função renal, evidenciada pelo aumento da taxa de filtração glomerular do grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF (Figura 9).

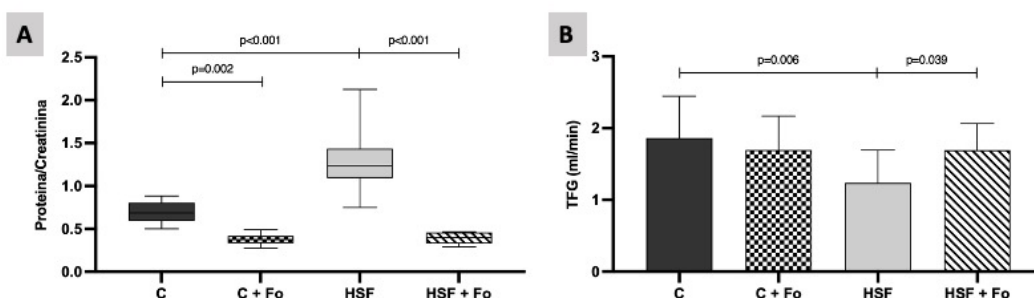


Figura 9. Função renal em 30 semanas. (A) razão proteína/creatinina; (B) Taxa de filtração glomerular – TFG (mL/min). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão ou mediana (min-max). Comparação por ANOVA de duas vias ou Kruskal-Wallis com post-hoc de Tukey; significância de 5%. C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (High Sugar-Fat Diet).

Inflamação

A figura 10 apresenta o perfil inflamatório renal ao final de 30 semanas. Os animais do grupo HSF apresentaram valores aumentados de TNF- α , IL-6 e reduzidos de MCP-1 em relação ao grupo controle. Entretanto, o extrato foi capaz de tratar a inflamação, reduzindo os níveis de TNF- α e IL-6 em relação ao grupo HSF.

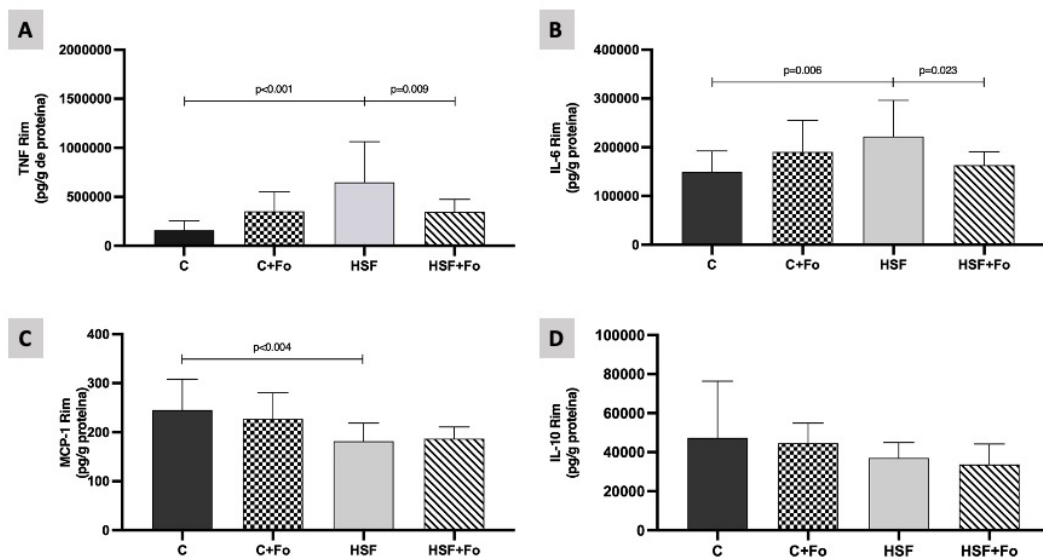


Figura 10. Inflamação nos rins ao final de 30 semanas. (A) TNF- α (pg/g proteína); (B) IL-6 (pg/g proteína); (C) MCP-1 (pg/g proteína); (D) IL-10 (pg/g proteína). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação por ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey; significância de 5%. C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (High Sugar-Fat Diet). TNF- α – Fator de Necrose tumoral α ; IL-6 – Interleucina 6; MCP-1 – proteína quimioatratante de monócito 1; IL-10 – Interleucina 10.

Estresse oxidativo

A figura 11 apresenta o perfil pró e antioxidante renal ao final do protocolo experimental. Os animais do grupo HSF apresentaram níveis elevados de 4-HNE, CBO e redução dos níveis de MDA, SOD e Catalase em relação ao grupo Controle. Além disso, os animais do grupo HSF+Fo apresentaram valores reduzidos de MDA e AOPP e aumentados de SOD, catalase e FRAP em relação ao grupo Controle+Fo, que demonstrou redução nos níveis de SOD quando comparado ao grupo Controle. Entretanto, o tratamento com extrato da folha de bergamota reduziu os níveis de 4-HNE, CBO, AOPP e promoveu aumento da atividade antioxidante enzimática da catalase e potencial antioxidante pelo FRAP no grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF.

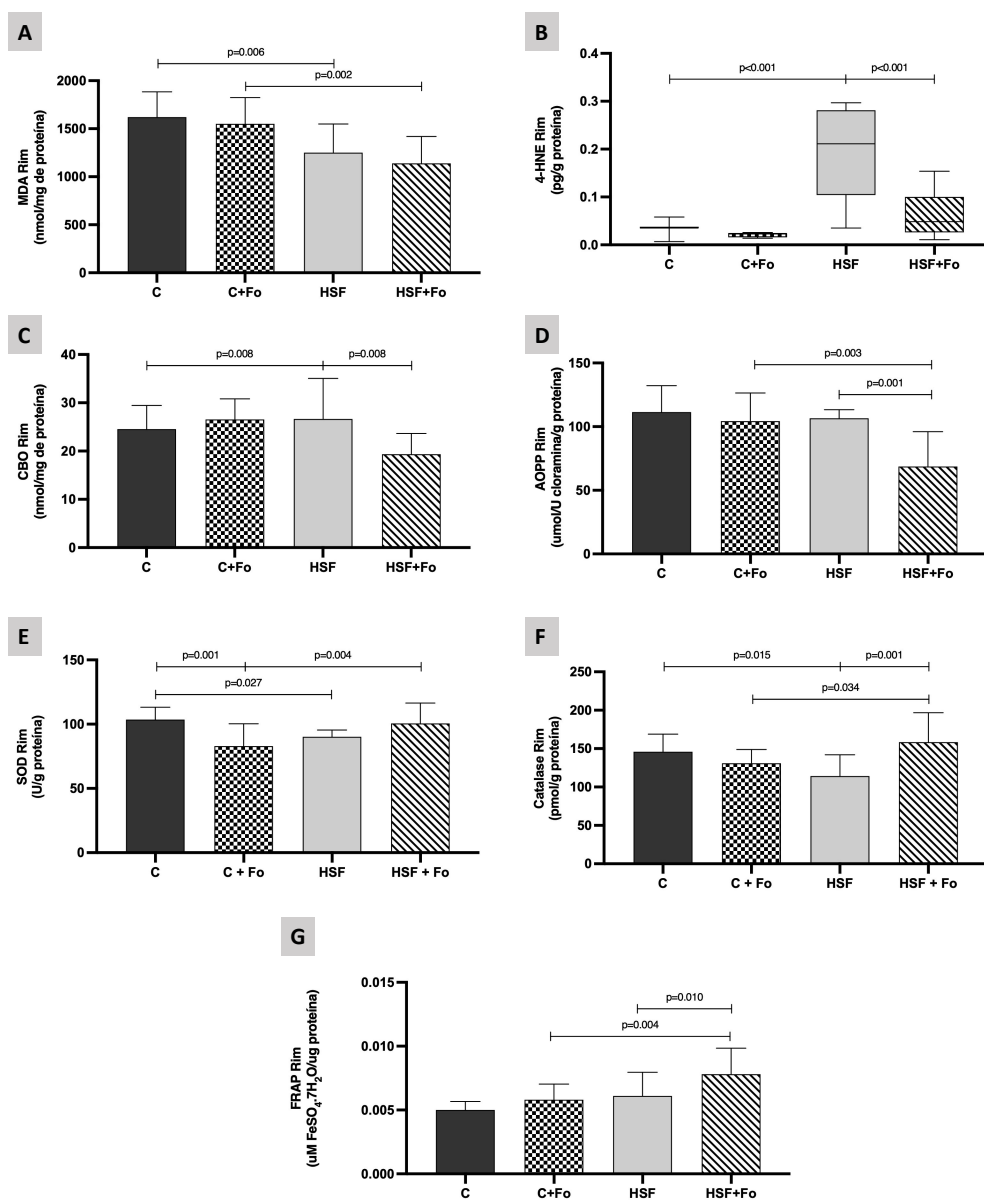


Figura 11. Estresse Oxidativo Renal ao final de 30 semanas. (A) MDA (nmol/mg proteína); (B) 4-HNE (pg/g proteína); (C) CBO (nmol/mg proteína); (D) AOPP (umol/U cloramina/g proteína); (E) SOD (U/g proteína); (F) Catalase (pmol/g proteína). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão ou mediana (min-max). Comparação por ANOVA de duas vias ou Kruskal-Wallis com post-hoc de Tukey; significância de 5%. MDA – Malondialdeído; 4-HNE – 4-hidroxinonal; CBO – Carbonilação de proteínas; AOPP – Produtos avançados de oxidação proteica (Advanced Oxidation Protein Products); SOD – Superóxido Dismutase; C – Controle; Fo – Extrato da folha de bergamota; HSF – Dieta rica em açúcar e gordura (High Sugar-Fat Diet).

4. Discussão

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do extrato de folhas de bergamota sobre o cenário redox/inflamatório em órgãos-alvo da obesidade. A dieta fornecida aos grupos HSF tem como objetivo mimetizar a dieta ocidental que, quando consumida em excesso, decorre em obesidade e suas consequências. Por apresentarem baixo peso molecular, os carboidratos simples contidos nessa dieta são absorvidos rapidamente, resultando em depósito de gordura, que desempenha papel chave nos processos fisiopatológicos envolvidos na manifestação das complicações associadas à obesidade^{33,34}. Dito isso, os animais que consumiram a dieta HSF apresentaram dislipidemia, hiperinsulinemia e resistência insulínica em relação ao grupo controle.

A literatura tem reportado que a expansão não adequada do tecido adiposo, especialmente pela hipertrofia dos adipócitos, é a principal consequência do balanço energético positivo e resulta em diversos efeitos deletérios como inflamação, alteração na secreção de adipocinas, hipóxia, fibrose e disfunção mitocondrial com consequente aumento da produção ROS^{4,35-38}. Como resultado da disfunção do tecido adiposo, prejuízos na sinalização metabólica são comuns, culminando em resistência à insulina e síndrome metabólica. Além disso, a disfunção do tecido adiposo colabora para a deposição ectópica de gordura em outros órgãos, prejudicando sua função⁴. Corroborando a afirmação, os animais do grupo HSF apresentaram obesidade, inflamação e estresse oxidativo no tecido adiposo, além de síndrome metabólica e prejuízos funcionais cardíacos, hepáticos e renais.

A inflamação crônica de baixo grau é uma das características da obesidade, associada a diversos desfechos negativos, desde o favorecimento de desordens metabólicas até a manifestação de doenças, como insuficiências cardíaca e renal, e doença hepática gordurosa não alcoólica³⁹. No coração, a literatura tem reportado que a inflamação é associada à hipertrofia, fibrose, remodelamento cardíaco e, finalmente, disfunção cardíaca^{40,41}. No fígado, o processo inflamatório decorrente da obesidade desempenha papel crucial no desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica e sua progressão para cirrose ou câncer hepático^{42,43}. Nos rins,

a inflamação decorrente da obesidade tem sido associada à fibrose renal e deposição irreversível de matriz extracelular no tecido renal, que levam à perda progressiva da função renal⁴⁴. Dito isso, nota-se que os animais do grupo HSF apresentaram inflamação no coração, fígado e rins, com consequentes disfunções dos órgãos, como demonstrado pela literatura.

O estresse oxidativo é outra consequência da obesidade, resultado de diversos mecanismos, como hiperleptinemia, disfunção do tecido adiposo, prejuízo na defesa antioxidante, inflamação crônica e produção excessiva de ROS pelo alto consumo calórico. Assim como a inflamação, tem sido associado a diversas desordens, como diabetes e disfunções hepáticas, cardíacas e renais⁴⁵. No coração, o estresse oxidativo pode danificar diretamente o tecido cardíaco, alterando sua geometria e funcionalidade, ou indiretamente pela carbonilação de proteínas envolvidas na resposta regulatória da contratilidade miocárdica⁷, além de outros mecanismos que contribuem com falhas do miocárdio por falta de adaptação^{46,47}. No fígado, o estresse oxidativo desempenha papel fundamental na ativação de mecanismos envolvidos no início e agravamento de doenças hepáticas, além de modificar DNA, proteínas e lipídios que vão prejudicar o controle das suas funções biológicas⁴⁸. Nos rins, o estresse oxidativo tem sido associado à apoptose de podócitos, levando à proteinúria, além de fibrose e expansão mesangial, comprometendo progressivamente sua função⁴⁹. Nota-se, nesse estudo, que os animais do grupo HSF apresentaram estresse oxidativo e comprometimento funcional dos órgãos afetados.

Em contrapartida, os animais que consumiram a dieta HSF e foram tratados com o extrato da folha de bergamota demonstraram melhora em parâmetros metabólicos, inflamação e estresse oxidativo em diferentes tecidos. A busca por novas estratégias terapêuticas tem se tornado alvo de pesquisas, uma vez que demonstram resultados promissores frente a doenças metabólicas⁵⁰. Além disso, estudos analíticos mostram que, para algumas plantas, a composição fenólica da folha é semelhante à do fruto ou até mesmo mais rica ou superior, indicando que podem ser utilizadas como fonte alternativa no desenvolvimento de suplementos alimentares, nutracêuticos ou alimentos funcionais^{51,52}. Adicionalmente, Baron et al. (2016) quantificaram e compararam *in vitro* a presença de compostos polifenólicos entre o

fruto e folha de bergamota e demonstraram que a folha compartilha algumas classes de polifenóis e, em alguns deles, possuem maiores concentrações, como neoeriodictina, naringina, neohesperidina, melitidina e buteridina em relação ao extrato do fruto, demonstrando-se promissor frente às comorbidades associadas ao consumo de dietas ricas em açúcares e gorduras¹⁶.

Nossos animais obesos tratados com o extrato da folha de bergamota demonstraram menores níveis de triglicerídeos, insulina e resistência à insulina e aumento de HDL colesterol em relação ao grupo que consumiu apenas a dieta HSF. Mollace et al. (2011) e Miceli et al. (2007) demonstraram redução de triglicerídeos, elevação de HDL colesterol e efeito protetor no parênquima hepático após tratamento com a fração polifenólica a partir do suco de bergamota em ratos hipercolesterolêmicos^{12,53}. Tal resultado foi atribuído em parte à maior excreção fecal de esteróis em ratos recebendo o extrato de bergamota e à composição de flavonóides presentes no extrato, em particular naringina e neohesperidina, que atuam reduzindo a atividade de enzimas envolvidas na formação de diacilglicerol em um contexto hiperglicêmico, como fosfatidato fosfohidrolase, e também na atuação sobre a disponibilidade lipídica para montagem de lipoproteínas através da associação com Apolipoproteína B, parte integrante no transporte de lipídeos aos tecidos^{12,54,55}. Ainda, buteridina, naringina e melitidina são estruturalmente semelhantes ao substrato HMG-CoA redutase, inibindo a atividade da enzima^{14,56}. Além disso, o extrato da folha de bergamota demonstrou ação anti-inflamatória a partir da inibição da ativação de fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-kB – *Nuclear factor kappa-B*) e antioxidante a partir da ativação de fator nuclear 2 relacionado ao eritróide-2 (Nrf2 – *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) quando estimulado *in vitro*, corroborando nossos resultados^{16,17}. A inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias atua sobre a captação de glicose, melhorando a sensibilidade à insulina encontrada nos animais tratados com o extrato do grupo HSF+Fo em relação ao grupo HSF⁵⁷.

A literatura aponta melhora na função cardíaca após administração de extrato do fruto de bergamota, enfatizando a presença de flavonoides na prevenção do estresse oxidativo como principal mecanismo protetor^{58,59}. Ainda, o efeito

hipoglicêmico e hipolipêmico do extrato do suco foi associado a uma melhora significativa na reatividade vascular em pacientes com hiperlipidemia e hiperglicemia, sugerindo um potencial papel protetor para o uso da fração polifenólica no fruto^{12,60}. Esses resultados podem ser extrapolados à ação do extrato da folha, uma vez que o estudo comparativo entre os extratos do fruto e folha demonstraram maiores níveis da fração polifenólica no extrato da folha de bergamota¹⁶.

De Leo et al. (2019) observaram melhora na esteatose microvesicular em apenas um animal alimentado com dieta hiperlipídica com suplementação de suco de bergamota, inferindo um possível papel protetor desempenhado pelo extrato⁶¹. Os autores assumiram que os efeitos protetores do suco na esteatose hepática podem ser alcançados através da redução do estresse oxidativo e da inflamação, uma vez que estudos epidemiológicos e em animais demonstraram que o aumento da produção de ROS, níveis mais baixos de antioxidantes endógenos, concentrações mais altas de citocinas pró-inflamatórias e metabolismo lipídico disfuncional estão presentes na degeneração esteatose hepática^{61,62}. Além disso, após incubação com a fração polifenólica do fruto, Mirachi et al. (2022) observaram redução no conteúdo lipídico intracelular em hepatócitos humanos, sugerindo o aumento na beta-oxidação como mecanismo⁶³. Corroborando, dois dos animais HSF tratados com Fo apresentaram ausência de lipidose microvesicular, redução em parâmetros inflamatórios, estresse oxidativo e aumento da atividade antioxidante endógena hepática quando comparados ao grupo HSF.

Nos rins, o extrato de folha de bergamota foi capaz de melhorar a função renal, além de reduzir os níveis de citocinas inflamatórias e marcadores do estresse oxidativo, além de aumentar a atividade de catalase, enzima antioxidante. Corroborando ao achado, La Russa et al. (2019) observaram atenuação do desequilíbrio redox a partir da suplementação com a fração polifenólica do fruto de bergamota, associando a obesidade com o dano renal⁶⁴. Além disso, o tratamento com polifenóis e flavonóides atuam reduzindo a inflamação e o estresse oxidativo, fatores associados ao metabolismo energético renal disfuncional induzido por dieta rica em açúcar e gordura⁶⁵.

Embora não existam ensaios clínicos avaliando o efeito do extrato das folhas de bergamota em humanos, o composto mostra-se promissor frente a fatores associados ao desenvolvimento e progressão de doenças metabólicas. Esse estudo mostra-se precursor na aplicação do extrato das folhas de bergamota como potencial antioxidante e anti-inflamatório, abrindo espaço para futuros estudos envolvendo buscas de vias de atuação no tratamento de comorbidades metabólicas nos órgãos alvo da obesidade.

5. Conclusão

O extrato da folha de bergamota foi capaz de atuar em diferentes tecidos, melhorando o cenário redox/inflamatório de animais obesos.

6. Agradecimentos e Suporte Financeiro

Agradecemos o apoio do fundo Open APC European Project da Università degli Studi di Milano e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp 2021/07282-8).

7. Referências

1. Popkin, B. M., Adair, Li. S. & Ng, S. W. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. *Nutr. Rev.* **70**, 3–21 (2012).
2. de Heredia, F. P., Gómez-Martínez, S. & Marcos, A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* **71**, 332–338 (2012).
3. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I. & Kim, J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, (2016).
4. Longo, M. *et al.* Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2358 (2019).
5. Jung, U. & Choi, M.-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 6184–6223 (2014).
6. Francisqueti, F. *et al.* Effect of Gamma-Oryzanol as Therapeutic Agent to Prevent Cardiorenal Metabolic Syndrome in Animals Submitted to High Sugar-Fat Diet. *Nutrients* **9**, 1299 (2017).
7. Ferron, A. J. T. *et al.* Protective effect of tomato-oleoresin supplementation

- on oxidative injury recovers cardiac function by improving β -adrenergic response in a diet-obesity induced model. *Antioxidants* **8**, (2019).
8. Costa, M. R. *et al.* Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *Antioxidants* **8**, 1–17 (2019).
 9. Lo, A. T. C. *et al.* Brazilian *Curcuma longa* L. attenuates comorbidities by modulating adipose tissue dysfunction in obese rats. *Nutrire* **43**, 1–8 (2018).
 10. Jayarathne, S. *et al.* Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Properties of Food Bioactive Components: Effects on Adipose Tissue. *Prev. Nutr. Food Sci.* **22**, 251–262 (2017).
 11. 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).
 12. Mollace, V. *et al.* Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: From animal models to human studies. *Fitoterapia* **82**, 309–316 (2011).
 13. Risitano, R. *et al.* Flavonoid fraction of bergamot juice reduces LPS-induced inflammatory response through SIRT1-mediated NF- κ B inhibition in THP-1 monocytes. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
 14. Di Donna, L. *et al.* Statin-like principles of bergamot fruit (*Citrus bergamia*): Isolation of 3-hydroxymethylglutaryl flavonoid glycosides. *J. Nat. Prod.* **72**, 1352–1354 (2009).
 15. Moufida, S. & Marzouk, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry* **62**, 1283–1289 (2003).
 16. 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**, 141 (2021).
 17. 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**, 111721 (2022).
 18. 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).
 19. 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**, 1803–9 (2013).
 20. Gonc, D. F. *et al.* Vitamin D Induces Increased Systolic Arterial Pressure via Vascular Reactivity and Mechanical Properties. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
 21. 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).
 22. Giannini, E. G. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Can. Med. Assoc. J.* **172**, 367–379 (2005).
 23. Moreto, F. *et al.* Differentially expressed proteins obtained by label-free quantitative proteomic analysis reveal affected biological processes and

- functions in Western diet-induced steatohepatitis. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **35**, 1–11 (2021).
24. Anna, V. O., Mátyus, J., Sárkány, E., Horváth, A. & Fodor, B. New trends in the laboratory diagnostics of proteinuria and albuminuria. *Orv. Hetil.* **151**, 864–869 (2010).
 25. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, T. R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419 (1985).
 26. Martı, L., Felix-soriano, E. & Escote, X. Inflammation and Oxidative Stress in Adipose Tissue : Nutritional Regulation. in *Obesity* 64–92 (2018). doi:10.1016/B978-0-12-812504-5.00004-0
 27. Uchiyama, M. & Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**, 271–278 (1978).
 28. Mesquita, C. S. *et al.* Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal. Biochem.* **458**, 69–71 (2014).
 29. Kalousová, M., Skrha, J. & Zima, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol. Res.* **51**, 597–604 (2002).
 30. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
 31. Marklund, S. L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett.* **184**, 237–239 (1985).
 32. Aebi, H. [13] Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126 (1984).
 33. Reyes-Farias, M., Fos-Domenech, J., Serra, D., Herrero, L. & Sánchez-Infantes, D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem. Pharmacol.* **192**, 114723 (2021).
 34. Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y. & Carvajal, K. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr. Diabetes* **10**, (2020).
 35. Da Silva, N. I., Sobrinho, H. M. da R., Blanch, G. T., Cruvinel, W. M. & Gomes, C. M. Adipocinas e sua relação com a obesidade. *Rev. EVS - Rev. Ciências Ambient. e Saúde* **46**, (2019).
 36. Bischoff, S. C. *et al.* Towards a multidisciplinary approach to understand and manage obesity and related diseases. *Clin. Nutr.* **36**, 917–938 (2017).
 37. SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. in *Oxidative Stress* 1–8 (Elsevier, 1985). doi:10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3
 38. Francisqueti, F. V. *et al.* The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **63**, 85–91 (2017).
 39. Artemniak-Wojtowicz, D., Kucharska, A. & Pyrzak, B. Obesity and chronic inflammation crosslinking. *Cent. Eur. J. Immunol.* **45**, 461–468 (2020).
 40. Wensley, I., Salaveria, K., Bulmer, A. C., Donner, D. G. & du Toit, E. F. Myocardial structure, function and ischaemic tolerance in a rodent model of

- obesity with insulin resistance. *Exp. Physiol.* **98**, 1552–1564 (2013).
41. Gutiérrez-Cuevas, J. *et al.* Molecular Mechanisms of Obesity-Linked Cardiac Dysfunction: An Up-Date on Current Knowledge. *Cells* **10**, (2021).
42. Pilling, D., Karhadkar, T. R. & Gomer, R. H. High-Fat Diet-Induced Adipose Tissue and Liver Inflammation and Steatosis in Mice Are Reduced by Inhibiting Sialidases. *Am. J. Pathol.* **191**, 131–143 (2021).
43. Zhao, Q. *et al.* Kukoamine B Ameliorate Insulin Resistance, Oxidative Stress, Inflammation and Other Metabolic Abnormalities in High-Fat/High-Fructose-Fed Rats. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **Volume 13**, 1843–1853 (2020).
44. Silva Junior, G. B. da, Bentes, A. C. S. N., Daher, E. D. F. & Matos, S. M. A. de. Obesity and kidney disease. *J. Bras. Nefrol.* **39**, (2017).
45. Manna, P. & Jain, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **13**, 423–444 (2015).
46. Tsutsui, H., Kinugawa, S. & Matsushima, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **301**, 2181–2190 (2011).
47. Dhalla, N. S., Elimban, V., Bartekova, M. & Adameova, A. Involvement of Oxidative Stress in the Development of Subcellular Defects and Heart Disease. *Biomedicines* **10**, 393 (2022).
48. Li, S. *et al.* The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 26087–26124 (2015).
49. Tang, C., Cai, J. & Dong, Z. Mitochondrial dysfunction in obesity-related kidney disease: a novel therapeutic target. *Kidney Int.* **90**, 930–933 (2016).
50. Noce, A. *et al.* Natural Bioactive Compounds Useful in Clinical Management of Metabolic Syndrome. *Nutrients* **13**, 630 (2021).
51. Ferlemi, A. V. & Lamari, F. N. Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* **5**, (2016).
52. Carolo dos Santos, K. *et al.* Recovery of Cardiac Remodeling and Dysmetabolism by Pancreatic Islet Injury Improvement in Diabetic Rats after Yacon Leaf Extract Treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1–9 (2018).
53. Miceli, N. *et al.* Hypolipidemic effects of Citrus bergamia Risso et Poiteau juice in rats fed a hypercholesterolemia diet. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10671–10677 (2007).
54. Ighodaro, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed. Pharmacother.* **108**, 656–662 (2018).
55. Cha, J. Y. *et al.* Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* **56**, 349–58 (2001).
56. Kim, H.-J. *et al.* Naringin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. *Life Sci.* **74**, 1621–1634 (2004).
57. Ferrari, F., Bock, P. M., Motta, M. T. & Helal, L. Biochemical and Molecular Mechanisms of Glucose Uptake Stimulated by Physical Exercise

- in Insulin Resistance State: Role of Inflammation. *Arq. Bras. Cardiol.* (2019). doi:10.5935/abc.20190224
58. Carresi, C. *et al.* Anti-oxidant effect of bergamot polyphenolic fraction counteracts doxorubicin-induced cardiomyopathy: Role of autophagy and c-kitposCD45negCD31neg cardiac stem cell activation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **119**, 10–18 (2018).
 59. Trombetta, D. *et al.* In Vitro Protective Effects of Two Extracts from Bergamot Peels on Human Endothelial Cells Exposed to Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8430–8436 (2010).
 60. Cappello, A. R. *et al.* Bergamot (Citrus bergamia Risso) Flavonoids and Their Potential Benefits in Human Hyperlipidemia and Atherosclerosis: an Overview. *Mini-Reviews Med. Chem.* **16**, 619–629 (2016).
 61. De Leo, M. *et al.* Protective Effects of Bergamot (Citrus bergamia Risso & Poiteau) Juice in Rats Fed with High-Fat Diet. *Planta Med.* **86**, 180–189 (2020).
 62. Cheng, K. *et al.* The therapeutic effects of resveratrol on hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese mice by improving oxidative stress, inflammation and lipid-related gene transcriptional expression. *Med. Mol. Morphol.* **52**, 187–197 (2019).
 63. Mirarchi, A. *et al.* Bergamot Polyphenol Extract Reduces Hepatocyte Neutral Fat by Increasing Beta-Oxidation. *Nutrients* **14**, 3434 (2022).
 64. La Russa, D. *et al.* Oxidative Imbalance and Kidney Damage in Cafeteria Diet-Induced Rat Model of Metabolic Syndrome: Effect of Bergamot Polyphenolic Fraction. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **8**, (2019).
 65. Vargas, F. *et al.* Flavonoids in Kidney Health and Disease. *Front. Physiol.* **9**, (2018).

Capítulo 3 – Artigo Científico 2



Bergamot leaf extract treats cardiorenal metabolic syndrome and associated pathophysiological factors in rats fed with a high sugar fat diet

Juliana Silva Siqueira^{a,*}, Taynara Aparecida Vieira^a, Erika Tiemi Nakandakare-Maia^a, Thiago Luiz Novaga Palacio^a, Felipe Sarzi^a, Jessica Leite Garcia^a, Bruno Henrique de Paula^a, Silmeia Garcia Zanati Bazan^a, Giovanna Baron^b, Luigi Tucci^c, Elzbieta Janda^d, Alessandra Altomare^b, Francesca Gado^b, Artur Junio Togneri Ferron^{a,e}, Giancarlo Aldini^b, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron^{a,e}, Camila Renata Correa^a

^a Sao Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu, 18618687, Brazil

^b Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, 20133, Milan, Italy

^c H&AD Srl, 89032, Bianco, Italy

^d Department of Health Sciences, University "Magna Graecia" of Catanzaro, 88100, Catanzaro, Italy

^e Integrated Colleges of Bauru (FIB), 17056-100, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bergamot
CRMS
Western diet
Metabolic syndrome

ABSTRACT

Bergamot citrus (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau), have been used as a strategy to prevent or treat comorbidities associated with metabolic syndrome parameters, such as cardiorenal metabolic syndrome (CRMS). The aim was to test the effect of bergamot leaf extract on CRMS and associated pathophysiological factors in rats fed with a high sugar-fat diet. Animals were divided into two experimental groups with control diet (Control, $n = 30$) and high sugar-fat diet (HSF, $n = 30$) for 20 weeks. Once CRMS was detected, animals were redivided to begin the treatment with Bergamot Leaf Extract (BLE) by gavage (50 mg/kg) for 10 weeks: control diet + placebo (Control, $n = 09$), control diet + BLE (Control + BLE, $n = 09$), HSF diet + placebo (HSF, $n = 09$), HSF + BLE ($n = 09$). Evaluation included nutritional, metabolic and hormonal analysis; and renal and cardiac parameters. HSF groups presented obesity, dyslipidemia, hypertension, hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance. BLE showed protection against effects on hypertriglyceridemia, insulin resistance, renal damage, and structural and functional alterations of the heart. Conclusion: Bergamot leaf extract shows potential as a therapeutic to treat CRMS in animals fed with a high sugar-fat diet.

1. Introduction

In recent decades, the Western lifestyle demands more practical and quick meals, usually composed by industrialized products with high energy density and rich in sugars and fats, which associated to physical inactivity, resulting in positive energy balance resulting in adipose tissue expansion and, consequently, obesity (Popkin et al., 2012). The adipose tissue expansion due to adipocyte hypertrophy causes an imbalance in the secretion of adipokines which are associated with several complications and diseases, such as insulin resistance, hypertension, dyslipidemia and chronic inflammation, all risk factors for cardiorenal metabolic syndrome (CRMS) (Rangaswami et al., 2019) (Whaley-Connell and Sowers, 2014).

In addition to hypertrophy, consumption of high sugar-fat diets can cause mitochondrial stress leading to an increase in reactive oxygen species (ROS) and a decrease in antioxidant capacity, by inhibiting the nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2), a transcription factor that plays a crucial role in the maintenance of redox and metabolic homeostasis in response to reactive species and inflammation by regulating genes involved in the response against oxidative stress, promoting redox homeostasis (Cuadrado et al., 2018; Echeverría et al., 2018; Wu et al., 2021). Thus, the redox imbalance scenario favors CRMS and contributes to the development of complications that trigger this syndrome.

The CRMS, defined as combined disorders of heart and kidney, is characterized by impaired coronary blood flow, impaired diastolic

* Corresponding author. Botucatu Medical School, São Paulo State University (Unesp), Professor Montenegro Avenue, Botucatu, 18618687, Brazil.

E-mail address: juliana.siqueira@unesp.br (J.S. Siqueira).

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111721>

Received 31 May 2022; Received in revised form 2 July 2022; Accepted 7 July 2022

Available online 30 July 2022

0303-7207/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

relaxation, impaired ischemic reconditioning, renal hyper-filtration, proteinuria, glomerular sclerosis, tubule-interstitial fibrosis, and decreased GFR (glomerular filtration rate), with significant impact on life expectancy and mortality (Francisqueti et al., 2017; Rangaswami et al., 2019; Silva Junior et al., 2017; van der Velde et al., 2011; Whaley-Connell and Sowers, 2014). In order to prevent or treat cardiorenal metabolic syndrome, it is important to consider treatment strategies for modulating the pathophysiological processes involved in this disease. Within this context, researches about the effect of bioactive compounds present in natural products, as fruits, have been emerged mainly because these compounds have anti-inflammatory capacity, modulating the macrophage profile, and antioxidants acting as scavengers or stimulators of Nrf2 (Gugliandolo et al., 2020).

Bergamot citrus (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) has shown antioxidant and anti-inflammatory potential (Formisano et al., 2019). In addition, studies also report to be effective in treating metabolic syndrome parameters, especially due the hypolipemic and hypoglycemic effect (Mollace et al., 2011; Risitano et al., 2014). These benefits are attributed to the polyphenolic fraction of bergamot fruit that consists predominantly of flavonoids (naringin, neo-peridin, neoeriodictine, brutieridin and melitidine) (Di Donna et al., 2009). However, investigations show that for some plants, the phenolic composition of the leaf can be similar or even higher than the fruit, indicating that they may be used as an alternative source for the development of food supplements, nutraceuticals or functional foods (Baron et al., 2021; Ferlemi and Lamari, 2016).

Based on this, Baron et al. (2021), conducted a study characterizing the bioactive compounds present in the leaf and fruit extract of bergamot. The results showed that the leaves have a higher amount of polyphenols and a greater antioxidant and anti-inflammatory capacity *in vitro* (Baron et al., 2021). Thus, since there are no studies that evaluated the effect of bergamot leaf extract on metabolic parameters neither in cardiorenal metabolic syndrome *in vivo* model, this investigation becomes original and extremely relevant. In addition, because the bergamot fruit is a valuable raw material that is in high demand, has many applications, and is cultivated in a limited region of Southern Italy, the opportunity to identify the leaves as a source of bioactive polyphenols with a chemical and bioactive profile overlapping that of fruit polyphenols, allows for the availability of a renewable and low cost source for this important raw material. These results may lead to a sustainable product with pharmacological action to attenuate Cardiorenal Metabolic Syndrome. Therefore, the aim of this study was to test the effect of bergamot leaf extract on Cardiorenal Metabolic Syndrome and associated pathophysiological factors in rats fed with a high sugar-fat diet.

2. Materials and methods

2.1. Experimental protocol and groups characterization

The experiments and procedures were approved by the Animal Ethics Committee (271/2021) and were performed in accordance with the National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Male Wistar rats (± 187 g) were kept in an environmental controlled room ($22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$; 12 h light-dark cycle and relative humidity of $60 \pm 5\%$) and randomly distributed into 2 experimental groups by 20 weeks. During this period, the animals received, *ad libitum*, a control diet + water (Control, $n = 30$) and high sugar-fat diet + water containing 25% sucrose (HSF, $n = 30$). The diets were designed in our laboratory and previously published (Francisqueti et al., 2017). After this period, when CRMS was detected-determined by cardiac dysfunction and stage 0 of renal disease (Romão Junior, 2004) the presence of renal disease risks detected, a 95% confidence interval (CI) was built for the cardiac dysfunction and risk factors for renal diseases from the HSF and control groups. Was adopted as the separation point (SP) between the groups, the midpoint between the upper limit of the control group

and the lower limit of the HSF group. From the data, the CRMS was characterized (Rangaswami et al., 2019; Whaley-Connell and Sowers, 2014). This criterion was adopted because animals submitted to different diet models do not always present the expected response. This fact can lead to erroneous animal classification and, consequently, false conclusions. Accomplished, these animals were randomly redistributed into 4 experimental groups: control diet + placebo (Control, $n = 09$), control diet + bergamot leaf extract (Control + BLE, $n = 09$), high sugar-fat diet + placebo (HSF, $n = 09$), high sugar-fat diet + bergamot leaf extract (HSF + BLE, $n = 09$). This procedure was performed over a period of 10 weeks to verify the effect of the treatment of bergamot leaf extract on cardiorenal metabolic syndrome. The animals that didn't developed CRMS were excluded from the experiment.

2.2. Bergamot leaf extract (BLE)

The bergamot leaves were harvested in a farm located in the Reggio Calabria region, Italy, and the dry extract was obtained at H&AD (Herbal & Antioxidant Derivatives S.r.l.) plant located in Località Chiusi, 89032 Bianco (RC), Italy (www.head-sa.com). The leaves were immediately chopped and added to a solution of water/ethanol (30/70% v/v) to extract the polyphenols. The extraction procedure was repeated twice for 1 h and the resulting solution was distilled to recover the ethanol. The clarified water solution was passed through a layer of absorbent polystyrene resins with pores with a diameter between 100 and 150 Ångstrom to retain polyphenols, which were subsequently eluted from the resin bed flowing pure ethanol. Then, the obtained ethanol solution was distilled in vacuum at temperatures of up to 40°C , obtaining a concentrate containing residual water and polyphenols, which were dried in a spray drying system, obtaining a powder with moisture content less than 4.0%.

The administration was carried out daily by gavage, at a concentration of 50 mg/kg of weight and the extract was diluted in filtered water. The dose was established according to literature data that use this concentration from fruit juice, as there are no studies using leaf extract (Musolino et al., 2020).

2.3. Nutritional, metabolic and hormonal analysis

The nutritional profile was evaluated according to caloric intake, body weight and adiposity index. Calorie intake was determined by multiplying the energy value of each diet ($\text{g} \times \text{Kcal}$) by the daily food intake. For the HSF group, it also included calories from water ($0.25 \times 4 \times \text{mL consumed}$). The animals' body weight was evaluated weekly. The adiposity index was used as an indicator of obesity at 30th week, since it accurately assesses the amount of body fat in the animals. After euthanasia, the epididymal, visceral and retroperitoneal fat deposits were dissected from the animals. The sum of deposits normalized by body weight [(epididymal + retroperitoneal + visceral)/body weight $\times 100$] is considered the adiposity index (Luvizotto et al., 2013).

After 8-h fasting, blood was collected and the plasma was used to measure insulin and biochemical parameters. Glucose concentration was determined by using a glucometer (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA); triglycerides levels were measured with an automatic enzymatic analyzer system (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). The insulin level was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method using commercial kits (Linco Research Inc., R&D Systems, Millipore e B-Brigde International Inc.) and the reading was performed in a Spectramax 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). The homeostatic model of insulin resistance (HOMA-IR) was used as an insulin resistance index, calculated according to the formula: $\text{HOMA-IR} = (\text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin (}\mu\text{U/mL)}) / 22.5$ (Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF et al., 1985).

2.4. Systolic blood pressure

Systolic blood pressure (SBP) evaluation was assessed in conscious rats by the non-invasive tail-cuff method with a NarcoBioSystems® Electro-Sphygmomanometer (International Biomedical, Austin, TX, USA). The animals were kept in a wooden box (50 × 40 cm) between 38 and 40 °C for 4–5 min to stimulate arterial vasodilation (Gonc et al., 2014). After this procedure, a cuff with a pneumatic pulse sensor was attached to the tail of each animal. The cuff was inflated to 200 mmHg pressure and subsequently deflated. The blood pressure values were recorded on a Gould RS 3200 polygraph (Gould Instrumental, Valley View, OH, USA). The average of three pressure readings was recorded for each animal.

2.5. Renal function

Plasma and urine were used to evaluate the renal function. During 12 h, urine was collected through metabolic cages for further analysis of total protein and creatinine using commercial colorimetric kits (CELM® kits, Barueri, São Paulo, Brazil). To assess kidney damage, proteinuria through protein/creatinine ratio was determined; glomerular filtration rate (GFR) = ((urine creatinine × flux)/plasma creatinine) was calculated as marker of kidney function (Anna et al., 2010).

2.6. Structural and functional cardiac function

Doppler echocardiographic evaluation was performed by a single examiner at the 20th and 30th weeks. Animals were anesthetized with ketamine (50 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (1 mg/kg, i.p.). After trichotomy of the anterior chest region, the animals were placed in slight left lateral decubitus for the exam. The equipment used was model Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel) with a multifrequency ultrasonic transducer 5.0–11.5 MHz. To implement structural measurements of the heart, the images were obtained in one-dimensional mode (M-mode) guided by the images in two-dimensional mode with the transducer in the parasternal position, minor axis.

Left ventricular (LV) evaluation was performed by positioning the cursor M-mode just below the mitral valve plane at the level of the papillary muscles. The images of the aorta and left atrium were obtained by positioning the M-mode course to plan the level of the aortic valve. The following cardiac structures were used to analyze cardiac morphology: left ventricular diastolic diameter (LVDD); left ventricular systolic diameter (LVSD); left atrium (LA); LA/AO; relative wall thickness (RWT). The LV systolic function was assessed by the following parameters; endocardial fractional shortening (FS%) ((LVDD – LVSD)/LVDD) × 100; posterior wall shortening velocity (PWSV). The LV diastolic function was evaluated using the following indices: peak velocity of early diastolic filling (E wave). The study was supplemented by evaluation by tissue Doppler systolic displacement (S'), early diastolic (E') and late (A') of the mitral annulus (arithmetic average travel speeds of lateral and septal walls), and E/A and E/E' wave ratios.

The LV systolic function was assessed by the following parameters: Left ventricle posterior wall shortening velocity (LVPWSV) and endocardial fractional shortening (EFS%) ((LVDD–LVSD)/LVDD) × 100. The LV diastolic function was evaluated using the following indices: E/E' ratio and E wave deceleration time (EWDt). The study was supplemented by evaluation by tissue Doppler systolic displacement (S'), early diastolic (E') and late (A') of the mitral annulus (arithmetic average travel speeds of lateral and septal walls), and E/E' wave ratios (Sahn et al., 1978).

2.7. Nrf2 activation

The bergamot leaf ability to modulate the antioxidant response pathway induced by Nrf2 activation was tested using NRF2/ARE Responsive Luciferase Reporter HEK293 stable cell line (Signosis, Santa

Clara, CA, USA). Cells were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM; Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 1% Penicillin/Streptomycin (Lonza) and 50 µg/mL of G418 sulfate solution (Promega Corporation, Madison, WI, USA). HEK293 cells were treated with different concentrations (100, 150, 200 and 250 µg/ml) of BLE for 18 h after seeding in white 96-well plate (BRANDplates®, cell grade) at 10000 cells/well. Subsequently, to avoid any interference on the reading of luciferase activity, media was removed and 100 µL/well of PBS was added. ONE-Glo™ Luciferase Assay Substrate (purchased from Promega Corporation, Madison, WI, USA) (100 µL/well) was directly added to the wells, followed by a luciferase measurement performed using a luminometer (Wallac Victor2 1420, Perkin-Elmer™ Life Science, Monza, Italy). Experiments were performed with biological and technical replicates; values are shown as mean ± SD compared to untreated control cells. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test ($p < 0.05$ was considered significant).

The cell viability was assessed with MTT assay on HEK293 cells treated with all the concentrations of the BLE as reported previously (Baron et al., 2021).

2.8. Statistical analysis

Data are presented as means ± standard deviation (SD) or medians (interquartile range). Differences among the groups were determined by two-way analysis of variance. Statistically significant variables were subjected to the two-way ANOVA test with Tukey post-hoc. Statistical analyses were performed using Sigma Stat for Windows Version 3.5. (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). A p value of 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Nutritional and metabolic parameters: triglycerides, insulin and insulin resistance were attenuated with 10 weeks of treatment with BLE

The HSF diet promoted increased caloric intake, adiposity index, final body weight, systolic blood pressure and blood glucose, characterizing an experimental model of obesity accompanied by comorbidities that are risk factors for cardiorenal metabolic syndrome. These parameters were not attenuated with the treatment of bergamot leaf extract (Fig. 1 A, B, C, D and F). On the other hand, triglycerides, insulin and insulin resistance were also found to be elevated in the HSF group, but were attenuated by the extract treatment (Fig. 1 E, G and H).

3.2. Renal function parameters: treatment with BLE attenuated proteinuria and improved renal function

It is possible to note that the HSF group developed renal impairment when compared to the control group, characterizing by increased protein/creatinine ratio and reduced glomerular filtration rate. The treatment with the extract provided full recovery of proteinuria and improved renal function, shown by increased glomerular filtration rate (Fig. 2 A and B).

3.3. Cardiac function: BLE attenuated cardiac remodeling

The echocardiographic parameters are presented in Table 1. The HSF group presented cardiac remodeling characterized by changes in morphological variables (PWT, IST, LA, LVM and LVRT), diastolic deterioration (lower EWDt and E/E') and systolic dysfunction (higher LVPWSV) in comparison to the control group. Bergamot leaf extract treated the cardiac remodeling and the deterioration of diastolic and systolic functions compared to the HSF group.

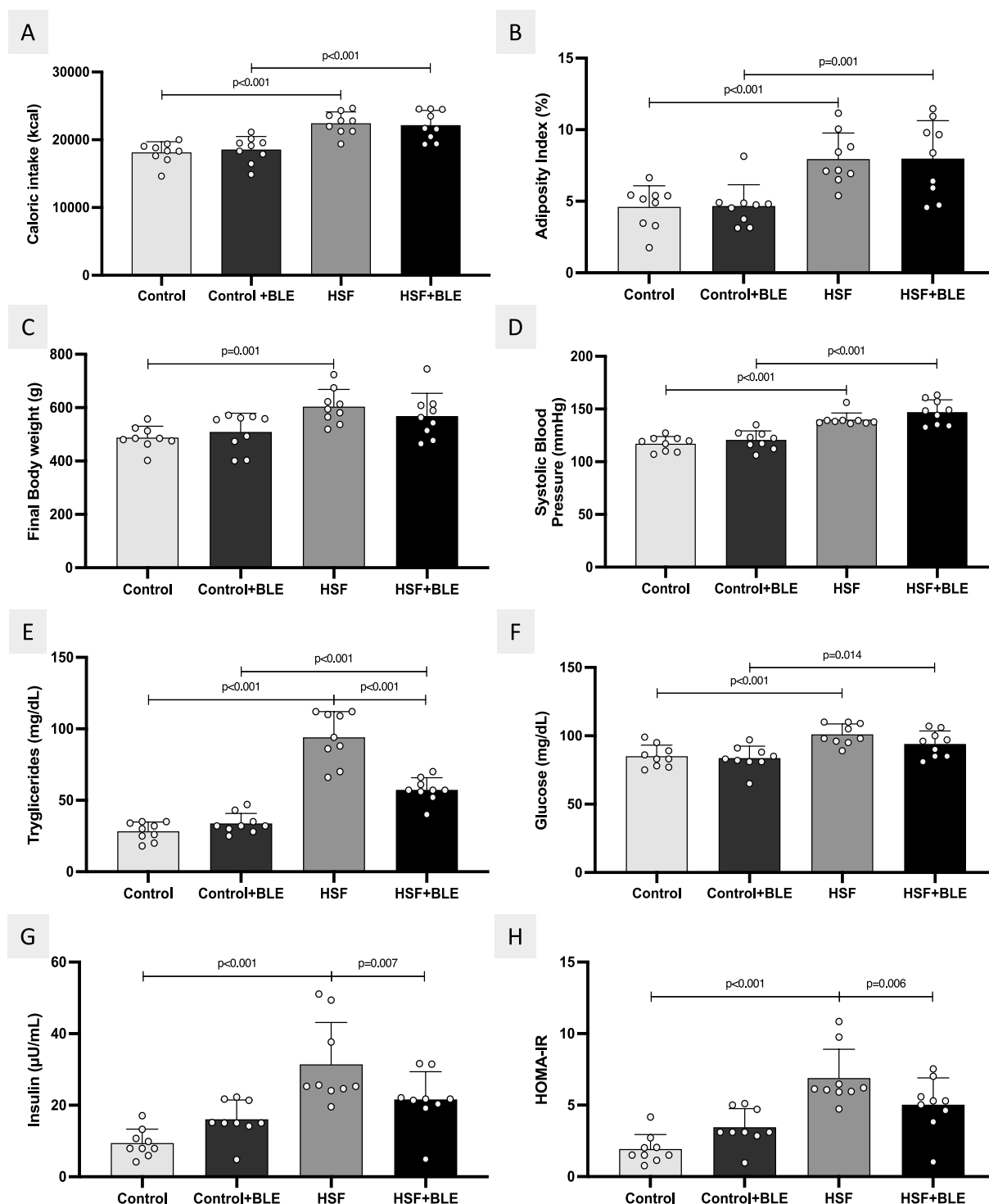


Fig. 1. Nutritional, metabolic and hormonal analysis in the 30th week. (A) Caloric intake (kcal); (B) Adiposity index (%); (C) Final body weight (g); (D) Systolic blood pressure (mmHg); (E) Triglycerides (mg/dL); (F) Glucose (mg/dL); (G) Insulin (μU/mL); and (H) HOMA-IR. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Tukey post-hoc. BLE– Bergamot Leaf Extract. HSF–high sugar fat diet.

3.4. Correlation between nutritional, metabolic, renal and cardiac parameters

Fig. 3 presents Pearson correlation among the variables. Regarding metabolic parameters, triglycerides, glucose, insulin and HOMA-IR were correlated with proteinuria, while only triglycerides were correlated with glomerular filtration rate. About the cardiac parameters, systolic blood pressure, triglycerides, glucose, insulin and HOMA-IR showed

correlation.

Since triglycerides were the only metabolic parameter associated with both renal and cardiac variables, Fig. 4 highlights Pearson Correlation among these variables.

3.5. Nrf2 activation

The dose-dependent effect of BLF to activate the Nrf2 pathway was

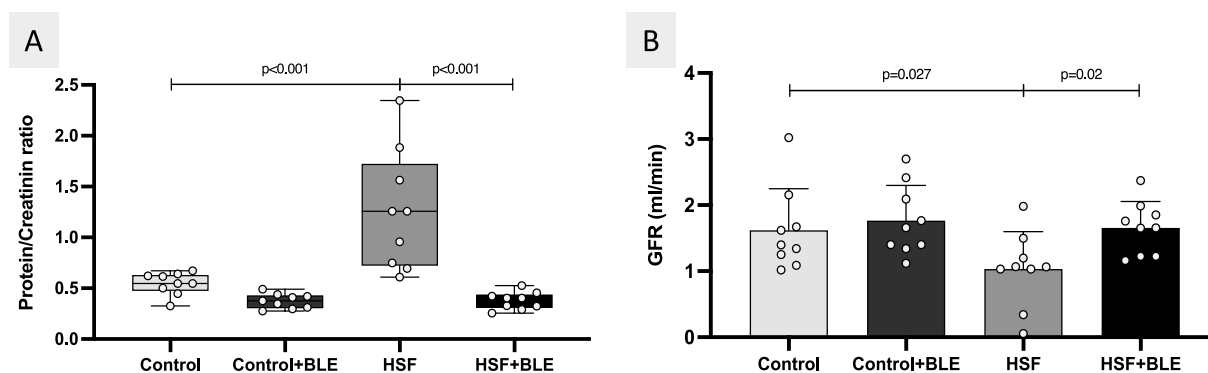


Fig. 2. Renal function in 30 weeks. (A) Protein/creatinine ratio; (B) Glomerular filtration rate– GFR (mL/min). Data are expressed as median (min-max) and mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Tukey post-hoc. BLE– Bergamot Leaf Extract. HSF–high sugar fat diet.

Table 1

Cardiac function in 30 weeks.

Groups					Effects		
	Control	Control + BLE	HSF	HSF + BLE	Diet	BLE	Interaction
PWT (mm) ¹	1.53(1.53–1.44)	1.50(1.51–1.45)	1.79(2.04–1.58)*	1.53(1.61–1.52)▲	0.016	0.096	0.055
IST (mm) ¹	1.53(1.53–1.50)	1.53(1.56–1.50)	1.79(2.14–1.53)*	1.60(1.62–1.55)▲	0.036	0.220	0.128
LA(mm)	4.71 $\pm$ 0.29	4.69 $\pm$ 0.25	5.51 $\pm$ 0.65*	5.05 $\pm$ 0.57▲	<0.001	0.143	0.174
LVM (g)	0.69 $\pm$ 0.09	0.73 $\pm$ 0.17	1.03 $\pm$ 0.20*	0.77 $\pm$ 0.10▲	<0.001	0.036	0.004
LVRT	0.43 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.04	0.55 $\pm$ 0.07*	0.42 $\pm$ 0.02▲	0.002	<0.001	<0.001
LVPWSV (mm/s)	82.44 $\pm$ 6.77	80.56 $\pm$ 6.33	61.24 $\pm$ 10.54*	74.25 $\pm$ 2.80▲	<0.001	0.026	0.004
EWDt (ms) ¹	44.00(46.00–43.00)	46.00(46.75–44.50)	58.50(62.00–51.00)*	48.00 (51.50–44.00)▲	<0.001	0.024	0.004
E/E'	13.92 $\pm$ 1.42	12.85 $\pm$ 1.56	22.94 $\pm$ 3.71*	15.75 $\pm$ 1.69▲	<0.001	<0.001	<0.001
EFS (%)	63.81 $\pm$ 3.87	59.99 $\pm$ 6.04	54.17 $\pm$ 4.61*	57.01 $\pm$ 2.91	<0.001	0.747	0.034

PWT– Diastolic thickness of the left ventricle posterior wall; IST– diastolic thickness of the interventricular septum; LA–left atrium; LVM– Left ventricle mass; LVRT– Left ventricle Relative Thickness; LVPWSV– Left ventricle posterior wall shortening velocity; EWDt– E wave deceleration time; EFS– Endocardial fractional shortening. Data expressed in mean $\pm$ standard deviation. ¹median (interquartile range). Comparison by Comparison by two-way ANOVA with Tukey post-hoc. $p < 0.001$. HSF–high sugar fat diet. BLE–Bergamot Leaf Extract. * $p < 0.001$ vs. C; ▲ $p < 0.001$ vs. HSF.

tested using HEK293 stable cell line with a luciferase gene reporter. The results are reported in the graph bar of Fig. 5 and show the fold increase of the luciferase expression and hence of Nrf2 nuclear translocation in respect to control cells. BLE was effective in a dose-dependent manner, from 100 μ g/ml and 250 μ g/ml being the highest concentration tested.

4. Discussion

The aim of this study was to test the potential of BLE on CRMS in animals fed with a high sugar-fat diet. At the end of the experimental protocol, both groups that consumed the HSF diet presented obesity, systolic arterial hypertension, dyslipidemia, higher glucose and insulin levels and insulin resistance. These results demonstrate that the diet promoted the risk factors for CRMS in the HSF groups (Francisqueti et al., 2017). Corroborating these findings, the literature shows that a diet rich in simple carbohydrates, such as those administered to the HSF animals, due to their lower molecular weight, are absorbed more quickly, resulting in higher fat deposition. Also, this energy imbalance caused by a hypercaloric diet can impair some molecular alterations, such as insulin signaling, resulting in impaired glucose transport, dysregulated lipolysis and dyslipidemia (Rodríguez-Correa et al., 2020).

The confirmation of CRMS in the HSF group was through the increase in protein/creatinine ratio, decrease in the GFR and cardiac remodeling characterized by changes in morphological variables, diastolic deterioration and systolic dysfunction in relation to the control group. These results can be explained by the presence of obesity-related disorders in the HSF group triggered by the chronic inflammation state common in obesity, consequence of adipocyte hypertrophy and altered adipokine and adipocytokines pro-inflammatory secretion, among them, insulin resistance (Bischoff et al., 2017).

The presence of insulin resistance appears to play an important role

in both obesity-related heart and kidney failures, since impaired insulin metabolic signaling reduces bioavailable nitric oxide (NO), increases oxidant stress and inflammation, and activates renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), resulting in maladaptive myocardial tissue remodeling and interstitial fibrosis that contribute to impairments in diastolic function in heart and induces glomerular dysfunction and tubulointerstitial fibrosis in kidneys (Whaley-Connell and Sowers, 2012). Moreover, insulin resistance is also associated with increased lipolysis in adipose tissue that releases a large amount of free fatty acids (FFAs) into the bloodstream. The imbalance between the excessive influx of FFAs and the saturation of oxidative capacity (mitochondrial β -oxidation) results in bioenergetic incompatibility with accumulation of TG in the hepatocyte and greater mobilization to the circulation of very low-density lipoproteins (VLDLs) rich in TG, leading to hypertriglyceridemia (Mashek, 2021). This condition of hypertriglyceridemia also promotes ectopic accumulation of fat in non-fat-storing organs such as kidneys and heart, which induces oxidative stress and promotes a mitochondrial dysfunction, intensifying the reduction-oxidation imbalance contributing to the activation of pro-inflammatory, pro-fibrogenic, and pro-apoptotic pathways, causing cellular injury. Therefore long-term HSF diet feeding results in obesity, metabolic syndrome, which are risk factors for CRMS (Sun et al., 2020; Wali et al., 2020).

Furthermore, the FFAs overload also results in an increase ROS generation as a metabolism product through nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activation locally in adipose cells or in other organs cells, aggravating the oxidative stress (Matsuda and Shimomura, 2013). The accumulation of ROS contributes to vasoconstriction, inflammation and impaired vascular which contributes to the pathogenesis of CRMS (Ammar et al., 2021; Rubattu et al., 2013). The increase of oxidative stress markers can lead to structural changes in the myocardium, which can result in cardiac remodeling, decrease in

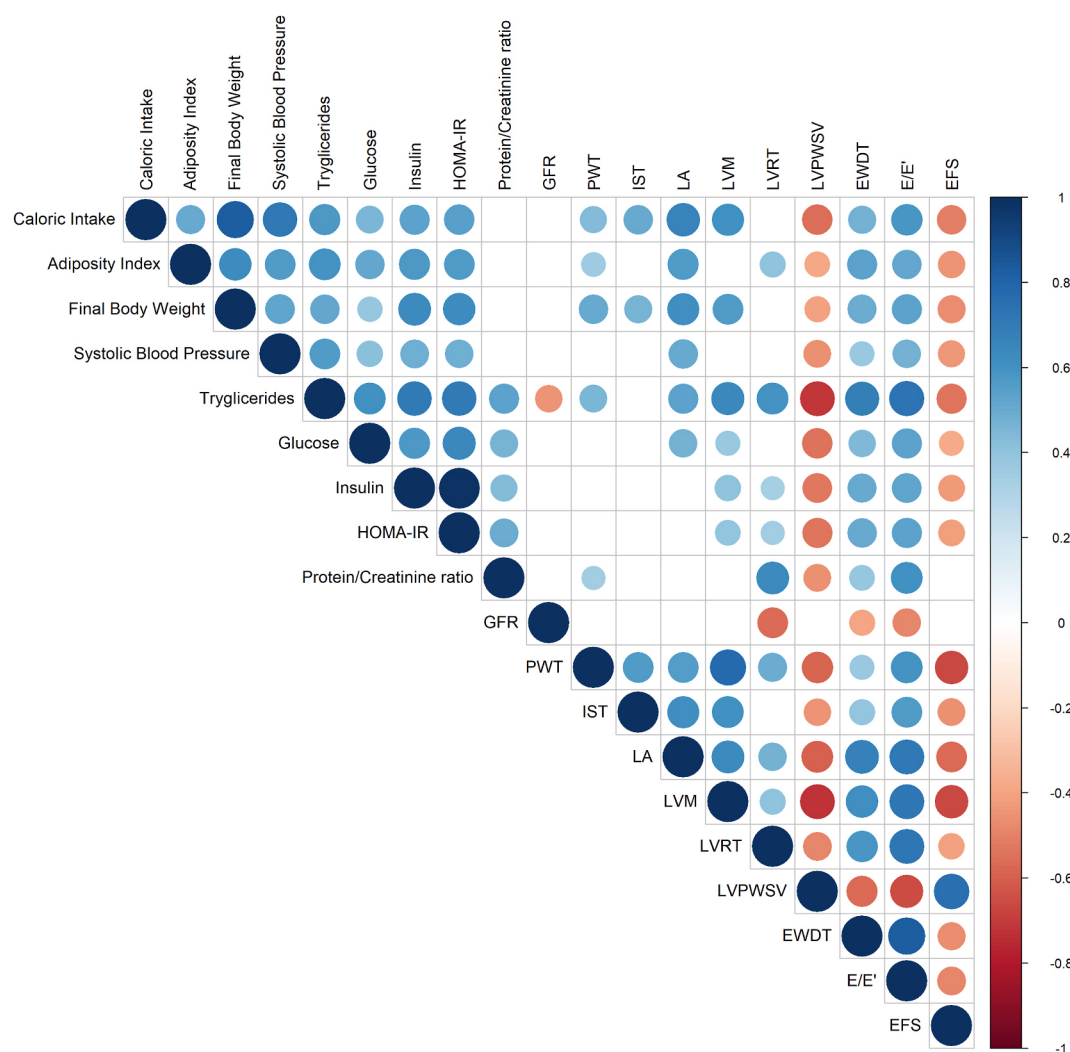


Fig. 3. Correlation matrix among the variables. Positive correlations are presented in blue and negative correlations are presented in red color. Color intensity and the size of the circle are proportional to the correlation coefficients. Correlations with $p > 0,05$ were excluded from the matrix. Glomerular filtration rate– GFR; PWT– Diastolic thickness of the left ventricle posterior wall; IST– diastolic thickness of the interventricular septum; LA–left atrium; LVM– Left ventricle mass; LVRT– Left ventricle Relative Thickness; LVPWSV– Left ventricle posterior wall shortening velocity; EWDT– E wave deceleration time; EFS– Endocardial fractional shortening.

contractility and heart failure (Spinale et al., 1998). Also, increased ROS are related to reduced renal function, leading to kidney hyperfiltration through compensatory mechanisms that contributes to glomerular hypertension, proteinuria or even loss of function (Cachofeiro et al., 2008).

In opposition, animals that consumed BLE in addition to the HSF diet presented lower triglycerides, insulin levels and insulin resistance compared to the group that consumed just the HSF diet. The amelioration of these parameters, which are risk factors for CRMS, are in accordance with studies that evaluated the same parameters with bergamot fruit, highlighting the power of leaves as a possible adjuvant in the treatment of these comorbidities (Mollace et al., 2011). However, the mechanisms responsible by the positive effects of BLE are not fully elucidated. Bergamot fruit and leaf extract share the same class of polyphenolic compounds, and some of them, like flavones and flavanones, in higher concentrations in the leaf, showing promising results treating complications associated with the HSF diet consumption (Baron et al., 2021). Some of these flavonoids, such as naringin, neoeriocitrin and rutin, have been shown to exert an antiatherogenic effect on animal models and low density lipoproteins (LDLs) oxidation inhibition, contributing to the potential hypolipidemic effect in the BLE (Miceli et al., 2007; Mollace et al., 2011). The buteridine, naringin and melitidine of BPF are structurally similar to HMG-CoA reductase substrate

statins and thus can competitively inhibit HMG-CoA reductase (Leopoldini et al., 2010). The flavonoids may also lower cholesterol levels by binding bile acids and increasing the turnover rate of blood and liver cholesterol, reducing TG accumulation in the liver, and enhancing the excretion of fecal neutral sterols and total bile acids (Miceli et al., 2007; Parafati et al., 2015). Naringin and neohesperidin may reduce hepatic TG accumulation by inhibiting the activity of phosphatidate phosphohydrolase, a TG synthetic enzymes and by reducing the availability of lipids for assembly of lipoproteins via reduced activities of acyl CoA: cholesterol acyltransferases.

As above described, oxidative stress is a condition associated with cardiorenal metabolic syndrome. In this sense, in order to alleviate oxidative stress, different mechanisms are activated, such as Nrf-2, increasing the production of endogenous antioxidants, preventing and controlling the formation of free radicals and consequently the damage caused by them (Ishii et al., 2002). By using a gene reporter cell model of NRF2 activation, we here report the ability of the extract to induce, in the concentration range 100–250 $\mu\text{g/ml}$, the Nrf2-ARE pathway which regulates the expression of a large battery of genes involved in the cellular antioxidant and anti-inflammatory defense as well as mitochondrial protection. Fig. 5 reports the main flavonoid and non flavonoid constituents of bergamot leaves (Baron et al., 2021). The structure

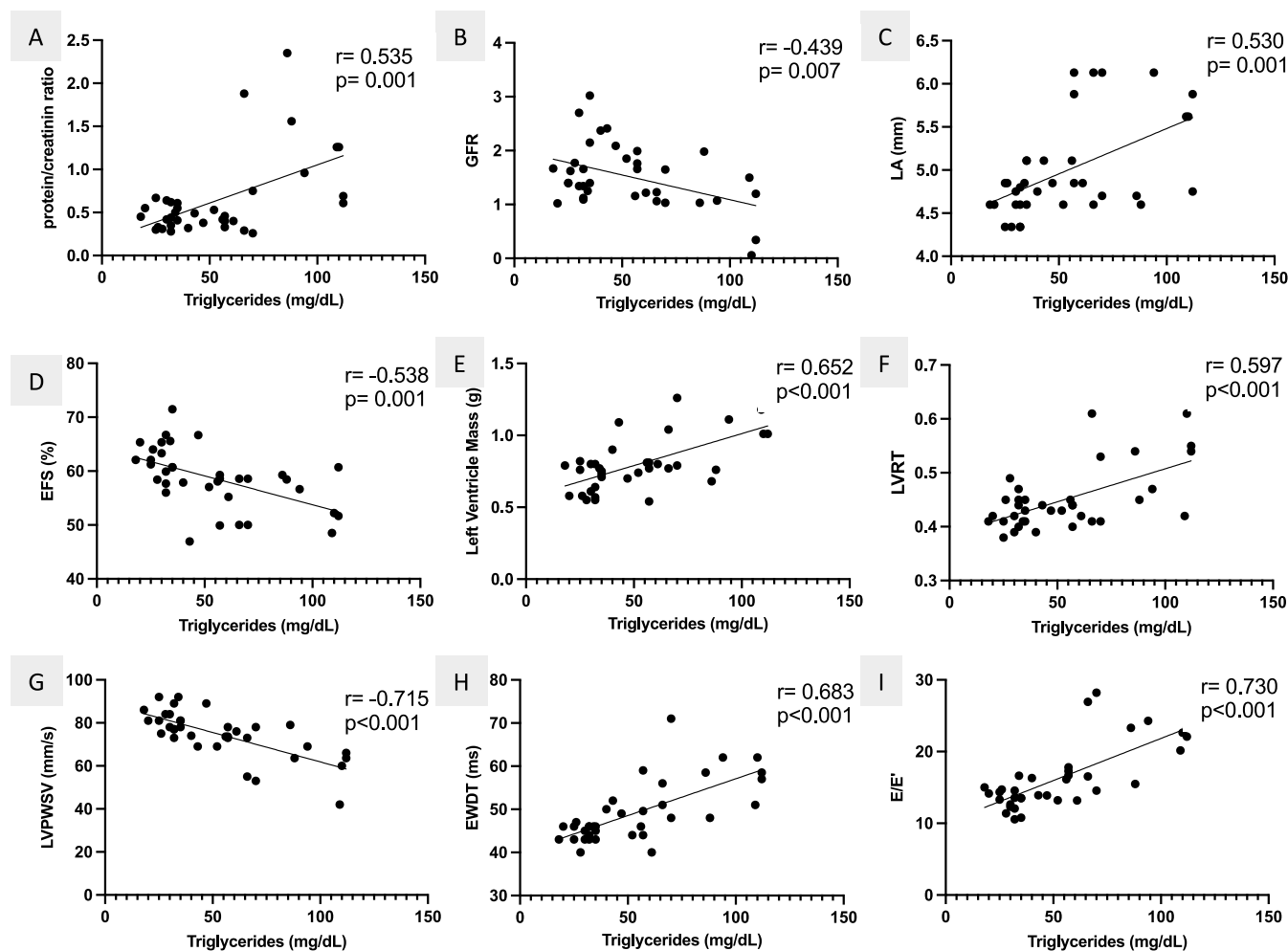


Fig. 4. Pearson correlations among triglycerides and Cardiorenal metabolic syndrome parameters. (A) Triglycerides (mg/dL)/protein/creatinine ratio; (B) Triglycerides (mg/dL)/Glomerular filtration rate–GFR (mL/min); (C) Triglycerides (mg/dL)/Left atrium–LA(mm); (D) Triglycerides (mg/dL)/Endocardial fractional shortening–EFS(%); (E) Triglycerides (mg/dL)/Left Ventricle Mass (g); (F) Triglycerides (mg/dL)/Left ventricle Relative Thickness–LVRT; (G) Triglycerides (mg/dL)/Left ventricle posterior wall shortening velocity–LVPWSV (mm/s); (H) Triglycerides (mg/dL)/E Wave deceleration time–EWDT (ms); (I) Triglycerides (mg/dL)/E/E'; Pearson regression was used to examine the association between variables.

of each aglycone is depicted and the derivatives reported in the table. In the figure, each aglycone structure is linked by an arrow to the ortho-diphenol moiety which is the required structure for Nrf2 activation for this class of compounds, through a mechanism shown in the upper part of the figure. In particular, the di-phenol moiety is activated by an oxidative stress environment to the corresponding quinone which being an electrophilic derivative it binds the thiol of KEAP-1, inducing the release of NRF2 which, upon translocation at the nuclear level, binds to the antioxidant response elements (AREs) in the regulatory region of target genes that encode proteins involved in redox homeostasis, xenobiotic metabolism and survival responses. When a phase I metabolic activation (O-demethylation and/or aromatic hydroxylation) is required for the conversion of the compound to the ortho-diphenol moiety, the link arrow is labelled by an M. Eriodictyol and luteolin do not require a metabolic conversion because they already contain the ortho-diphenol moiety and hence they act as direct Nrf2 activators. We believe that the overall Nrf2 activity of the extract is more likely underestimated because many polyphenol compounds require a metabolic conversion which should occur in vivo, mainly in liver and not in cell lines, as already demonstrated for resveratrol and sylibin which are activated to the ortho-diphenol derivatives by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1 and by CYP mediate O-demethylation, respectively (Potter et al., 2002; Xie and Zhang, 2019).

The polyphenol content also exerts antioxidant and inflammatory effects, as demonstrated by Baron et al. (2021), in a mechanism that seems to be associated with inhibition of NF- κ B activation. The literature reports that NF- κ B translocation to the nucleus encodes inflammatory mediators such as tumoral necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1-beta (IL-1 β) and interleukin- 6 (IL-6). This inflammatory condition causes serine kinase phosphorylation of insulin receptor substrate –1 or 2 (IRS-1 or IRS-2), which may block insulin signaling and finally lead to the occurrence of insulin resistance (Chen et al., 2015). Therefore, the improvement in insulin sensitivity can be result of the antioxidant and antiinflammatory effect of BLE, especially addressed to flavanone and flavone glycosides, as well as to their aglycones, including naringin and hesperidin, diosmetin, apigenin, and luteolin glycosides (Baron et al., 2021). This antioxidant and antiinflammatory effect can also explain the protection against heart and kidney dysfunction even in the presence of hypertension, an independent factor for CRMS. Some studies of our research group showed a local antioxidant and antiinflammatory effect of lycopene in the heart of obese animals and the same positive effect of gamma-oryzanol in the kidney of obese animals, preserving renal function (Ferron et al., 2020; Francisqueti et al., 2018). This same effect may be exerted BLE in the heart and kidney of animals from this study. Fig. 6 presents a summary of the observed effects.

Despite there are no clinical trials evaluating the effect of bergamot

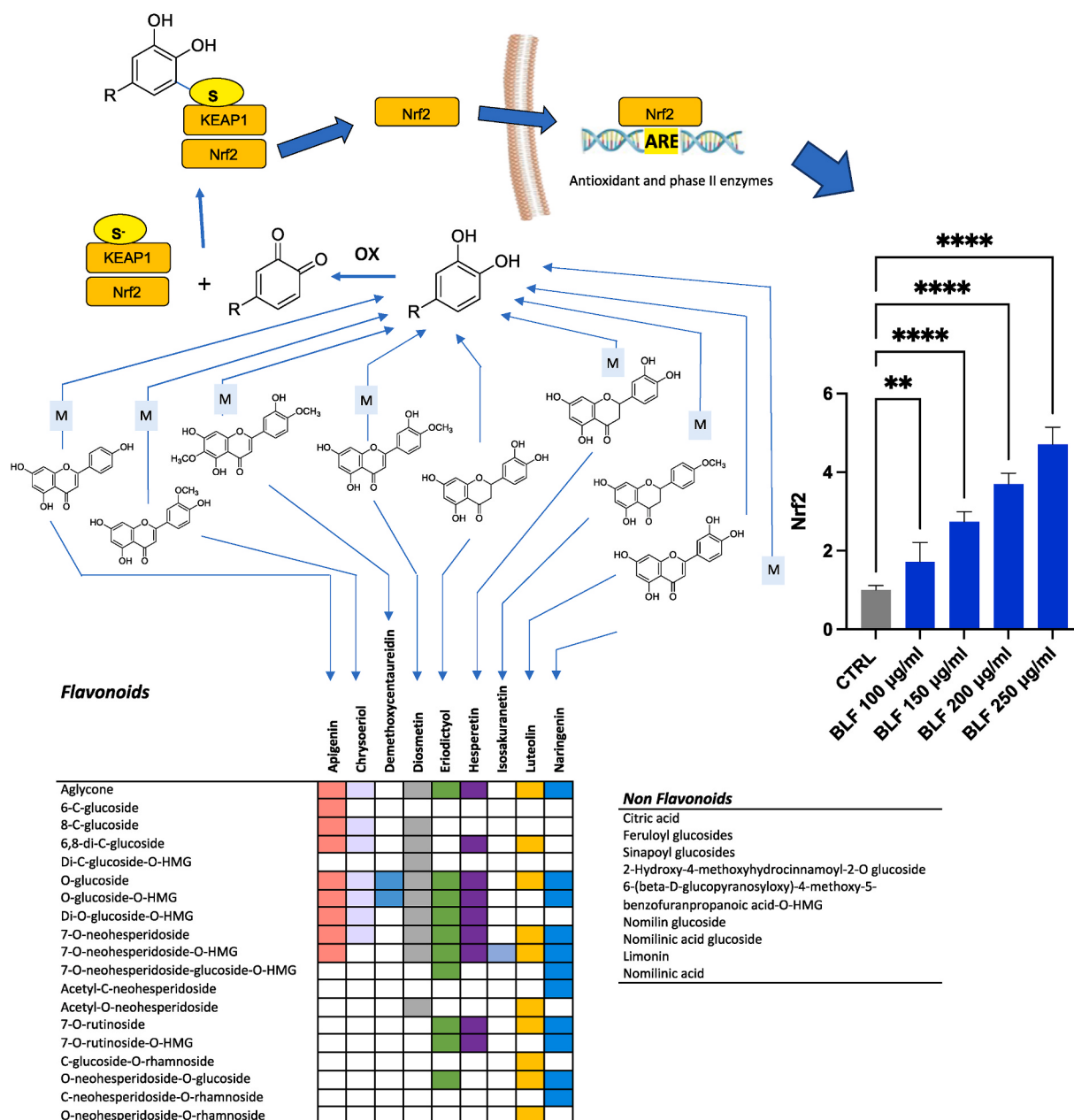


Fig. 5. BLF activates the Nrf2 pathway. The graph bar shows the dose-dependent effect of BLF as Nrf2 activator as determined in NRF2/ARE Responsive Luciferase Reporter HEK293 stable cell line. The main flavonoid and non flavonoid constituents of bergamot leaves as reported in Baron et al. are summarized in the two tables (Baron et al., 2021). The structure of each aglycone is depicted and linked by an arrow to the ortho-diphenol moiety which is the required structure for Nrf2 activation through a mechanism shown in the upper part of the figure and described in the text. The link arrow is labelled by an M when a phase I metabolic activation (O-demethylation and/or aromatic hydroxylation) is required for the conversion of the compound to the ortho-diphenol moiety.

leaf extract in humans, the extract may be a promising candidate in preventing and improving factors associated with the development and progression of Cardiorenal Metabolic Syndrome.

5. Conclusion

In summary, this study showed that the HSF diet induced obesity, insulin resistance, dyslipidemia, systolic blood pressure, and cardiorenal metabolic syndrome. On the other hand, the HSF group treated with bergamot leaves extract presented amelioration on insulin resistance, dyslipidemia and cardiorenal metabolic syndrome. Therefore, it is possible to conclude that bergamot leaf extract was able to treat cardiorenal metabolic syndrome in animals fed with a high sugar-fat diet.

Fundings

Francesca Gado is a temporary researcher (RTDA) supported by Ministero dell'Università e della Ricerca PON "Ricerca e Innovazione" 2014-2020, Azione IV.6 – "Contratti di ricerca su tematiche Green"; and São Paulo Research Foundation (FAPESP) [Grant number 2018/15294-3].

CRediT authorship contribution statement

Juliana Silva Siqueira: Conceptualization, Data curation, Methodology, Project administration, Writing – original draft. **Taynara Aparecida Vieira:** Methodology. **Erika Tiemi Nakandakare-Maia:** Methodology. **Thiago Luiz Novaga Palacio:** Methodology. **Felipe**

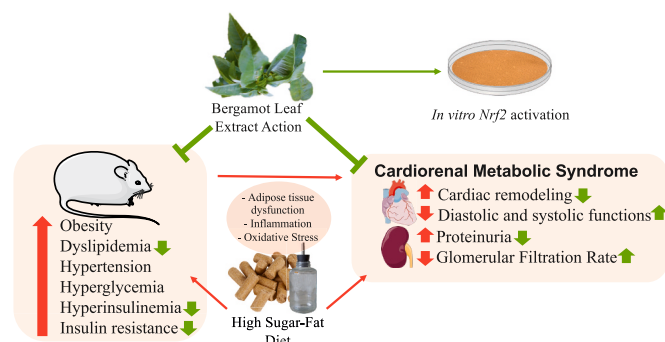


Fig. 6. Role of Bergamot Leaf Extract in the pathophysiological process of Cardiorenal Metabolic Syndrome (CRMS). The results demonstrate that the high sugar-fat diet promoted the risk factors for CRMS in the HSF groups, such as obesity, systolic arterial hypertension, dyslipidemia, higher glucose, insulin levels and insulin resistance. The high consumption of high sugar-fat diets contributes to adipose tissue dysfunction, inflammatory pathways activation and reactive oxygen species production, promoting oxidative stress. These conditions contribute directly with CRMS development by the presence of increased protein/creatinine ratio, decreased glomerular filtration rate and cardiac remodeling characterized by changes in morphological variables, diastolic deterioration and systolic dysfunction. Bergamot (*Citrus bergamia*) Leaf Extract was efficient in controlling and treating CRMS and pathophysiological process involved with the disease. In addition, the extract was able to induce the Nrf2-ARE pathway, which regulates the expression of a large battery of genes involved in the cellular antioxidant and anti-inflammatory defense as well as mitochondrial protection.

Sarzi: Methodology. **Jessica Leite Garcia:** Methodology. **Bruno Henrique de Paula:** Methodology. **Silmeia Garcia Zanati Bazan:** Methodology. **Giovanna Baron:** Methodology, Conceptualization. **Luigi Tucci:** Methodology. **Elzbieta Janda:** Methodology. **Alessandra Altomare:** Methodology. **Francesca Gado:** Methodology. **Artur Junio Togneri Ferron:** Conceptualization, Data curation. **Giancarlo Aldini:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing – original draft. **Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron:** Conceptualization, Data curation, Supervision, Project administration, Writing – original draft. **Camila Renata Correa:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Supervision, Project administration, Writing – original draft.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

We acknowledge support by the Open APC European Project fund of the Università degli Studi di Milano and São Paulo Reuter Foundation (Fapesp 2018/15294-3).

References

- Ammar, L.A., Nahlawi, M.I., Shayya, N.W., Ghadieh, H.E., Azar, N.S., Harb, F., Eid, A.A., 2021. Immunomodulatory approaches in diabetes-induced cardiorenal syndromes. *Front. Cardiovasc. Med.* 7 <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.630917>.
- Anna, V.O., Mátyus, J., Sárkány, E., Horváth, A., Fodor, B., 2010. New trends in the laboratory diagnostics of proteinuria and albuminuria. *Orv. Hetil.* 151, 864–869. <https://doi.org/10.1556/OH.2010.28891>.
- Baron, G., Altomare, A., Mol, M., Garcia, J.L., Correa, C., Raucci, A., Mancinelli, L., Mazzotta, S., Fumagalli, L., Trunfio, G., Tucci, L., Lombardo, E., Malara, D., Janda, E., Mollace, V., Carini, M., Bombardelli, E., Aldini, G., 2021. Analytical profile and antioxidant and anti-inflammatory activities of the enriched polyphenol fractions isolated from bergamot fruit and leave. *Antioxidants* 10, 141. <https://doi.org/10.3390/antiox10020141>.
- Bischoff, S.C., Boirie, Y., Cederholm, T., Chourdakis, M., Cuerda, C., Delzenne, N.M., Deutz, N.E., Fouque, D., Genton, L., Gil, C., Koletzko, B., Leon-Sanz, M., Shamir, R., Singer, J., Singer, P., Stroebele-Benschop, N., Thorell, A., Weimann, A.,

- Barazzoni, R., 2017. Towards a multidisciplinary approach to understand and manage obesity and related diseases. *Clin. Nutr.* 36, 917–938. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.11.007>.
- Cachoeiro, V., Goicochea, M., de Vinuesa, S.G., Oubiña, P., Lahera, V., Luño, J., 2008. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int.* 74, S4–S9. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.516>.
- Chen, L., Chen, R., Wang, H., Liang, F., 2015. Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. *Internet J. Endocrinol.* 1–9 <https://doi.org/10.1155/2015/508409>, 2015.
- Cuadrado, A., Manda, G., Hassan, A., Alcaraz, M.J., Barbas, C., Daiber, A., Ghezzi, P., León, R., López, M.G., Oliva, B., Pajares, M., Rojo, A.I., Robledinos-Antón, N., Valverde, A.M., Guney, E., Schmidt, H.H.H.W., 2018. Transcription factor Nrf2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach. *Pharmacol. Rev.* 70, 348–383. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014753>.
- Di Donna, L., De Luca, G., Mazzotti, F., Napoli, A., Salerno, R., Taverna, D., Sindona, G., 2009. Statin-like principles of bergamot fruit (*Citrus bergamia*): isolation of 3-hydroxymethylglutaryl flavonoid glycosides. *J. Nat. Prod.* 72, 1352–1354. <https://doi.org/10.1021/np900096w>.
- Echeverría, F., Valenzuela, R., Bustamante, A., Álvarez, D., Ortiz, M., Soto-Alarcon, S.A., Muñoz, P., Corbari, A., Videla, L.A., 2018. Attenuation of high-fat diet-induced rat liver oxidative stress and steatosis by combined hydroxytyrosol- (HT-) eicosapentaenoic acid supplementation mainly relies on HT. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/5109503>, 2018.
- Ferlemi, A.V., Lamari, F.N., 2016. Berry leaves: an alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants* 5. <https://doi.org/10.3390/antiox5020017>.
- Ferron, A.J.T., Francisqueti-Ferron, F.V., De Almeida Silva, C.C.V., Bazan, S.G.Z., De Campos, D.H.S., Garcia, J.L., Ghiraldini, L., Minatel, I.O., Correa, C.R., Moreto, F., Ferreira, A.L.A., 2020. Tomato-oleoresin anti-inflammatory effect recovers obesity-induced cardiac dysfunction by modulating myocardial calcium handling. *Cell. Physiol. Biochem.* 54, 1013–1025. <https://doi.org/10.33594/000000284>.
- Formisano, C., Rigano, D., Lopatriello, A., Sirignano, C., Ramaschi, G., Arnoldi, L., Riva, A., Sardone, N., Tagliatela-Scafati, O., 2019. Detailed phytochemical characterization of bergamot polyphenolic fraction (BPF) by UPLC-DAD-MS and LC-NMR. *J. Agric. Food Chem.* 67, 3159–3167. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06591>.
- Francisqueti, F., Minatel, I., Ferron, A., Bazan, S., Silva, V., Garcia, J., de Campos, D., Ferreira, A., Moreto, F., Cicogna, A., Corrêa, C., 2017. Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet. *Nutrients* 9, 1299. <https://doi.org/10.3390/nu9121299>.
- Francisqueti, F.V., Ferron, A.J.T., Hasimoto, F.K., Alves, P.H.R., Garcia, J.L., Santos, K.C., Moreto, F., Ferreira, A.L.A., Minatel, I.O., Corrêa, C.R., 2018. Gamma oryzanol treats obesity-induced kidney injuries by modulating the adiponectin receptor 2/PPAR-α Axis. *2018 Oxid. Med. Cell. Longev.* 1–9.
- Gonc, D.F., Paola, B., Rafacho, M., Assis, B., Jaldin, G., Bruder, T., Alves, M., Silva, B., Antonio, L., Zornoff, M., Alberto, S., Paiva, R. De, 2014. Vitamin D induces increased systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical properties. *PLoS One* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098895>.
- Gugliandolo, A., Bramanti, P., Mazzon, E., 2020. Activation of Nrf2 by natural bioactive compounds: a promising approach for stroke? *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4875. <https://doi.org/10.3390/ijms21144875>.
- Ishii, T., Itoh, K., Yamamoto, M., 2002. Roles of Nrf2 in activation of antioxidant enzyme genes via antioxidant responsive elements. *Methods Enzymol.* 348, 182–190. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)48637-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)48637-5).
- Leopoldini, M., Malaj, N., Toscano, M., Sindona, G., Russo, N., 2010. On the inhibitor effects of bergamot juice flavonoids binding to the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10768–10773. <https://doi.org/10.1021/jf102576j>.
- Luvizotto, R.D.A.M., Nascimento, A.F., Imaizumi, E., Pierine, D.T., Conde, S.J., Correa, C. R., Yeum, K.-J., Ferreira, A.L. a, 2013. Lycopene supplementation modulates plasmas concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br. J. Nutr.* 110, 1803. <https://doi.org/10.1017/S0007114513001256>, –9.
- Mashek, D.G., 2021. Hepatic lipid droplets: a balancing act between energy storage and metabolic dysfunction in NAFLD. *Mol. Metabol.* 50, 101115 <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101115>.
- Matsuda, M., Shimomura, I., 2013. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes. Res. Clin. Pract.* 7, e330–e341. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.05.004>.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., T, R., Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R. C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 28, 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>.
- Miceli, N., Mondello, M.R., Monforte, M.T., Sdraffakis, V., Dugo, P., Crupi, M.L., Taviano, M.F., De Pasquale, R., Trovato, A., 2007. Hypolipidemic effects of Citrus bergamia Risso et Poiteau juice in rats fed a hypercholesterolemia diet. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10671–10677. <https://doi.org/10.1021/jf071772i>.
- Mollace, V., Sacco, I., Janda, E., Malara, C., Ventrice, D., Colica, C., Visalli, V., Muscoli, S., Ragusa, S., Muscoli, C., Rotiroli, D., Romeo, F., 2011. Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: from animal models to human studies. *Fitoterapia* 82, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.fito.2010.10.014>.
- Musolino, V., Gliozzi, M., Scarano, F., Bosco, F., Scicchitano, M., Nucera, S., Carresi, C., Ruga, S., Zito, M.C., Maiuolo, J., Macrì, R., Amodio, N., Juli, G., Tassone, P., Mollace, R., Caffrey, R., Marioneaux, J., Walker, R., Ehrlich, J., Palma, E.,

- Muscoli, C., Bedossa, P., Salvemini, D., Mollace, V., Sanyal, A.J., 2020. Bergamot polyphenols improve dyslipidemia and pathophysiological features in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59485-3>.
- Parafati, M., Lascala, A., Morittu, V.M., Trimboli, F., Rizzuto, A., Brunelli, E., Coscarelli, F., Costa, N., Britti, D., Ehrlich, J., Isidoro, C., Mollace, V., Janda, E., 2015. Bergamot polyphenol fraction prevents nonalcoholic fatty liver disease via stimulation of lipophagy in cafeteria diet-induced rat model of metabolic syndrome. *J. Nutr. Biochem.* 26, 938–948. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.03.008>.
- Popkin, B.M., Adair, L.S., Ng, S.W., 2012. NOW and then: the global nutrition transition: the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr. Rev.* 70, 3–21. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x>.
- Potter, G.A., Patterson, L.H., Wanogho, E., Perry, P.J., Butler, P.C., Ijaz, T., Ruparel, K. C., Lamb, J.H., Farmer, P.B., Stanley, L.A., Burke, M.D., 2002. The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Br. J. Cancer* 86, 774–778. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600197>.
- Rangaswami, J., Bhalla, V., Blair, J.E.A., Chang, T.I., Costa, S., Lentine, K.L., Lerma, E.V., Mezue, K., Molitch, M., Mullens, W., Ronco, C., Tang, W.H.W., McCullough, P.A., 2019. Cardiorenal syndrome: classification, pathophysiology, diagnosis, and treatment strategies: a scientific statement from the American heart association. *Circulation* 139. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000664>.
- Risitano, R., Currò, M., Cirmi, S., Ferlazzo, N., Campiglia, P., Caccamo, D., Ientile, R., Navarra, M., 2014. Flavonoid fraction of bergamot juice reduces LPS-induced inflammatory response through SIRT1-mediated NF- κ B inhibition in THP-1 monocytes. *PLoS One* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107431>.
- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P.I., Contreras-Vargas, Y., Carvajal, K., 2020. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr. Diabetes* 10. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>.
- Romão Junior, J.E., 2004. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *J. Bras. Nefrol.* 26, 1–3.
- Rubattu, S., Mennuni, S., Testa, M., Mennuni, M., Pierelli, G., Pagliaro, B., Gabriele, E., Coluccia, R., Autore, C., Volpe, M., 2013. Pathogenesis of chronic cardiorenal syndrome: is there a role for oxidative stress? *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23011–23032. <https://doi.org/10.3390/ijms141123011>.
- Sahn, D.J., DeMaria, A., Kisslo, J., Weyman, A., 1978. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58, 1072–1083. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.58.6.1072>.
- Silva Junior, da, G.B., Bentes, A.C.S.N., Daher, E.D.F., Matos, S.M.A. de, 2017. Obesity and kidney disease. *J. Bras. Nefrol.* 39. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170011>.
- Spinale, F.G., Coker, M.L., Thomas, C.V., Walker, J.D., Mukherjee, R., Hebbard, L., 1998. Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure. *Circ. Res.* 82, 482–495. <https://doi.org/10.1161/01.RES.82.4.482>.
- Sun, Y., Ge, X., Li, Xue, He, J., Wei, X., Du, J., Sun, J., Li, Xin, Xun, Z., Liu, W., Zhang, H., Wang, Z.-Y., Li, Y.C., 2020. High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Dis.* 11, 914. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03122-4>.
- van der Velde, M., Matsushita, K., Coresh, J., Astor, B.C., Woodward, M., Levey, A.S., de Jong, P.E., Gansevoort, R.T., 2011. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int.* 79, 1341–1352. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.536>.
- Wali, J.A., Jarzebska, N., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., Rodionov, R.N., O'Sullivan, J. F., 2020. Cardio-metabolic effects of high-fat diets and their underlying mechanisms—a narrative review. *Nutrients* 12, 1505. <https://doi.org/10.3390/nu12051505>.
- Whaley-Connell, A., Sowers, J.R., 2014. The CardioRenal metabolic syndrome. *J. Am. Soc. Hypertens.* 8, 604–606. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2014.07.003>.
- Whaley-Connell, A., Sowers, J.R., 2012. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* 14, 360–365. <https://doi.org/10.1007/s11906-012-0279-2>.
- Wu, X., Huang, L., Liu, J., 2021. Relationship between oxidative stress and nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 signaling in diabetic cardiomyopathy (Review). *Exp. Ther. Med.* 22, 678. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10110>.
- Xie, Zhang, Zhang, Yuan, 2019. Metabolism, transport and drug–drug interactions of silymarin. *Molecules* 24, 3693. <https://doi.org/10.3390/molecules24203693>.