



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

**ANDERSON SEIJI SOARES FUJIMORI**

**Influência do suco de laranja Pera (*Citrus sinensis*) e do  
suco de laranja Moro [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] na ma-  
triz extracelular miocárdica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre  
em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa Dra. Bertha Furlan Polegato

**Botucatu  
2019**

**ANDERSON SEIJI SOARES FUJIMORI**

**Influência do suco de laranja Pera (*Citrus sinensis*) e do suco de laranja Moro [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] na matriz extracelular miocárdica**

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

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu

2019

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

Fujimori, Anderson Seiji Soares.

Influência do suco de laranja Pera (*Citrus sinensis*) e do suco de laranja Moro [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] na matriz extracelular miocárdica / Anderson Seiji Soares Fujimori. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Bertha Furlan Polegato

Capes: 20702027

1. Laranja. 2. Suco de laranja. 3. Matriz extracelular. 4. Remodelação ventricular.

Palavras-chave: *Citrus Sinensis*; *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; Matriz extracelular; Metaloproteinases de matriz; TIMP; Metabolômica.

# DEDICATÓRIA

À toda minha família, por sempre me apoiar na realização de todos meus objetivos e por toda a paciência durante esses 2 anos.

Amo vocês!

**AGRADECIMIENTO**

**ESPECIAL**

À minha orientadora Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato por ter me dado a oportunidade de realizar este objetivo, por ser um grande exemplo de humanismo e profissionalismo, por ter me acalmado em momentos decisivos e pela sabedoria com que me orientou, tornando possível a realização desse trabalho.

# **AGRADECIMENTOS**

A todos os docentes do departamento de clínica médica pelas realizações dos procedimentos e pelas contribuições durante todo o projeto, em especial à Dra. Silméia Garcia Zanati Bazan, Dr. Sérgio A.R. de Paiva, Dr. Marcos F. Minicucci, Dr. Leonardo A. M. Zornoff, Dra. Paula S. A. Gaiola e Dra. Estela Lima.

À Dra. Priscila P. dos Santos pela amizade, pelo apoio, por ter sido minha mentora no aprendizado das técnicas realizadas no laboratório, pelas contribuições e por ter participado na minha banca de qualificação.

Aos colegas do grupo de pesquisa RECAN, Marina, Amanda, Matheus, Angelo, Nara, Tatiana, Priscila e Mariana pela amizade, parceria, carinho, contribuição e aprendizados.

À profa. Dra. Estela Lima pelos ensinamentos e contribuição com a realização da análise metabólica.

À Flávia e ao prof. Dr. Rodrigo do laboratório Innovare da UNICAMP, pela contribuição com a análise metabólica.

Aos colegas do laboratório de Inficiência Cardíaca, por todas as contribuições e parceria.

Aos meus colegas de viagem, em especial a minha amiga Thainá pela parceria e momentos de descontração.

A todos os funcionários da UNIPEX que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e em especial à Vickeline, Ana Paula, Leandro e Denise.

À Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) pela oportunidade de me profissionalizar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

À FUNDECITRUS de Araraquara, pelo fornecimento dos sucos de laranja,  
sem nenhum custo, meu muito obrigado!

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>25</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
Delineamento experimental.....	27
Ecocardiograma .....	28
Histologia.....	29
Atividade de MMP-2 por zimografia .....	29
Western blot .....	30
Espectrometria de massas de alta resolução.....	32
Análise estatística .....	33
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
Ecocardiograma .....	35
Histologia.....	36
Atividade de MMPs por zimografia.....	37
Western blot .....	37
Espectrometria de massas de alta resolução.....	38
Marcadores identificados por meio da espectrometria de massa in tandem ...	45
<b>Moléculas identificadas no grupo LP</b> .....	<b>47</b>
N-docosahexaenoylphenylalanine.....	47
DG(44:5).....	47
Phosphatidylethanolamine PE (O-36:0) .....	48
<b>Moléculas identificadas no grupo LM</b> .....	<b>49</b>
N-formylmaleamicacid .....	49
N2-Acetyl-L-ornithine.....	49
Casegravol isovalerate .....	50
Abscisicalcohol 11-glucoside.....	50
CPA(18:2).....	51
Torvoside C .....	51
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência cardíaca e variáveis estruturais ao Ecocardiograma.....	35
Tabela 2 -Variáveis funcionais ao Ecocardiograma. ....	36
Tabela 3 - Atividade de MMP-2.....	37
Tabela 4 - Expressão proteica analisada por Western blot.....	38
Figura 1 - Delineamento experimental. ....	28
Figura 2- Cortes histológicos corados por Picrosirius Red.....	36
Figura 3 - Atividade da MMP-2 por Zimografia.....	37
Figura 4 - Estrutura química da N-docosahexaenoylphenylalanine. ....	47
Figura 5 - Estrutura química da DG(44:5). ....	48
Figura 6 - Estrutura química da PE(O-36:0).....	48
Figura 7 - Estrutura química do N-formylmaleamicacid.....	49
Figura 8 - Estrutura química da N2-Acetyl-L-ornithine. ....	49
Figura 9 - Estrutura química da Casegravolisovalerate.....	50
Figura 10 - Estrutura química da Absciscalcohol 11-glucoside. ....	50
Figura 11 - Estrutura química do CPA(18:2) .....	51
Figura 12 - Estrutura química da Torvoside C.....	52

**RESUMO**

**Introdução:** A matriz extracelular (MEC) além de fornecer suporte estrutural e participa de maneira ativa da homeostase do tecido cardíaco, regulando diversos processos fisiológicos e também patológicos. Desse modo, intervenções que afetem a composição e dinâmica da MEC se constituem importante alvo terapêutico. O suco de laranja Pera possui atividade anti-inflamatória, inclusive em indivíduos saudáveis. O suco de laranja Moro possui maior quantidade de compostos anti-inflamatórios e antioxidantes que a laranja Pera. Estudos experimentais observaram diminuição da atividade e da expressão metaloproteinases de matriz com a administração de componentes do suco de laranja de forma isolada, porém a administração do suco integral ainda não foi estudada. **Objetivo:** Avaliar a influência da ingestão de suco de laranja Pera na matriz extracelular miocárdica e comparar com os efeitos do suco da laranja Moro em corações saudáveis. **Material e Métodos:** foram utilizados 60 ratos Wistar machos alocados em 3 grupos: C, LP, LM. O grupo C recebeu água com maltodextrina, o grupo LP recebeu suco de laranja Pera e o grupo LM recebeu suco de laranja Moro, a vontade, por 4 semanas. Após 4 semanas de suplementação, os animais foram submetidos ao ecocardiograma e eutanásia para coleta de material biológico. **Resultados:** Não observamos diferenças na estrutura e função cardíaca ao ecocardiograma. Também não foi observada diferença entre os grupos na avaliação do percentual de colágeno tecidual (C:  $2,33 \pm 0,66$ ; LP:  $2,53 \pm 0,58$ ; LM:  $2,50 \pm 0,64$ ;  $p=0,744$ ) e na expressão das proteínas Colágeno I (C:  $1,022 \pm 0,199$ ; LM:  $1,026 \pm 0,167$ ; LP:  $1,026 \pm 0,229$ ;  $p=0,999$ ), TIMP-2 (C:  $1,079 \pm 0,372$ ; LP:  $0,902 \pm 0,325$ ; LM:  $1,223 \pm 0,548$ ;  $p=0,297$ ), TIMP-4 [C: 1,000 (0,839-1,115); LP: 1,016 (0,823-1,229); LM: 1,081 (1,007-1,179);  $p=0,588$ ], MMP-9 [C: 1,004 (0,883-1,246); LP: 1,119 (0,859-1,472); LM: 1,098 (0,821-1,450);  $p=0,647$ ] e TNF-alfa [C: 0,708 (0,569-0,857); LP: 0,933 (0,564-95,633); LM: 0,828 (0,422-1,092)  $p=0,297$ ] pela técnica de Western Blot. Não foi observado diferença entre os grupos na avaliação de atividade da MMP-2 por zimografia. A análise de metabolômica identificou alterações na intensidade de sinal para diferentes metabólitos no grupo LP e LM em comparação ao grupo C. **Conclusão:** A ingestão de suco de laranja Pera e do suco de laranja Moro não causaram alterações prejudiciais na matriz extracelular miocárdica em corações saudáveis e induziram alterações nos metabólitos presentes no soro desses animais.

**Palavras Chaves:** Matriz extracelular; *Citrus Sinensis*; *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; Metaloproteinases de matriz; TIMP; Metabolômica.

# ABSTRACT

**Introduction:** Beyond to providing structural support, the extracellular matrix (ECM) actively participates in cardiac tissue homeostasis, regulating several physiological and pathological processes. Thus, interventions that affect the composition and dynamics of ECM constitute an important therapeutic target. Pera orange juice has anti-inflammatory activity, even in healthy individuals. Moro orange juice has more anti-inflammatory and antioxidant compounds than Pera orange. Experimental studies have observed decreased activity and expression of matrix metalloproteinases after administration of orange juice components alone, but the administration of whole juice has not been studied. **Objective:** To evaluate the influence of Pera orange juice intake on the myocardial extracellular matrix and to compare with the effects of Moro orange juice on healthy hearts. **Material and Methods:** 60 male Wistar rats were allocated in 3 groups: C, LP, LM. Group C received water with maltodextrin, group LP received orange juice Pera and group LM received orange juice Moro, all with free access, for 4 weeks. Afterwards, the animals underwent echocardiography and euthanasia to collect biological material. **Results:** No differences in cardiac structure and function were observed on echocardiography. Also, there was no difference between the groups in the evaluation of the percentage of tissue collagen (C:  $2,33\pm 0,66$ ; LP:  $2,53\pm 0,58$ ; LM:  $2,50\pm 0,64\%$ ;  $p=0,744$ ) and expression of Collagen I proteins (C:  $1,022\pm 0,199$ ; LM:  $1,026\pm 0,167$ ; LP:  $1,026\pm 0,229$ ;  $p= 0,999$ ), TIMP-2 (C:  $1,079\pm 0,372$ ; LP:  $0,902\pm 0,325$ ; LM:  $1,223\pm 0,548$ ;  $p= 0,297$ ), TIMP-4 [C: 1,000 (0,839-1,115); LP: 1,016 (0,823-1,229); LM: 1,081 (1,007-1,179);  $p=0,588$ ], MMP-9 [C: 1,004 (0,883-1,246); LP: 1,119 (0,859-1,472); LM: 1,098 (0,821-1,450);  $p= 0,647$ ] and TNF-alfa [C: 0,708 (0,569-0,857); LP: 0,933 (0,564-95,633); LM: 0,828 (0,422-1,092)  $p= 0,297$ ] by Western Blot. No difference between groups was observed in the assessment of MMP-9 activity by zymography. Metabolomics analysis identified differential markers in the LP and LM groups compared to group C. **Conclusion:** Ingestion of Pera orange juice and Moro orange juice did not cause harmful changes in myocardial extracellular matrix in healthy hearts and induced changes in the metabolites present in the serum of these animals.

**Keywords:** Extracellular matrix; Citrus Sinensis; Citrus sinensis (L.) Osbeck; Matrix metalloproteinases; TIMP; Metabolomics.

# INTRODUÇÃO

O espaço entre os cardiomiócitos presentes no tecido cardíaco é comumente denominado interstício cardíaco. É composto por diversos tipos celulares como células endoteliais, pericitos, células musculares lisas, e células mesenquimais, como os fibroblastos cardíacos, e também pela matriz extracelular (MEC), que compreende uma rede tridimensional que fornece suporte estrutural para esses diversos tipos celulares (1). A MEC, além de fornecer suporte estrutural, participa de maneira ativa da homeostase do tecido cardíaco, uma vez que atua como facilitadora na sinalização química, elétrica e mecânica miocárdica, modulando a interação celular e regulando processos como migração, proliferação e adesão celulares durante estados fisiológicos ou também sob estímulos patológicos (2,3).

A MEC é composta, principalmente, por colágenos tipos I e III, embora apresente quantidades menores de colágeno IV, V e VI. O colágeno tipo I representa 85% do colágeno em miocárdio normal, sendo a principal proteína estrutural do coração (2,4). Além dos colágenos, ainda há a presença de outras glicoproteínas, como periostina, elastina e fibronectina, proteoglicanas e glicosaminoglicanas (4).

A interação da MEC com as células teciduais ocorre, principalmente, por meio das integrinas, que são receptores transmembrana que possuem capacidade de interagir com diversos componentes da MEC, como colágeno, periostina e fibronectina, e ativar várias vias de sinalização intracelular como Akt, PI3-K (phosphoinositide 3-kinase), MAPK (mitogen-activated protein kinases), regulando diferenciação, proliferação, migração e apoptose celular (5,6).

Proteínas estruturais como o colágeno e fibronectinas também participam da comunicação intercelular. Estudos *in vitro* mostraram que o colágeno fornece estímulo de sobrevivência para a célula por inibir apoptose via ativação de integrinas (7), além de induzir proliferação e migração celular (6). As fibronectinas também interagem com as superfícies celulares, provocando reorganização do citoesqueleto, estimulando a expressão gênica de forma a favorecer a migração celular, além de regular o crescimento e a sobrevivência celular por via de sinalização que envolve o NF- $\kappa$ B (nuclear transcription factor  $\kappa$ B) (6,8).

A MEC também pode servir como depósito para fatores de crescimento, como o FGF2 (Fibroblast Growth Factor) e o VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), diversos hormônios e citocinas não inflamatórias. A sinalização induzida por essas substâncias depende, pelo menos em

parte, da interação dessas substâncias com os componentes da MEC (1). Assim, alterações no perfil inflamatório podem interferir na composição da MEC.

Os fibroblastos são um dos principais tipos celulares presentes no interstício. Essas células são responsáveis pela produção de colágeno e fibronectina, IL-6 (interleucina-6), TGF-beta, endotelina-1 e TNF-alfa (tumor necrosifator alfa) (9). Adicionalmente, os fibroblastos são os principais produtores das metaloproteinases de matriz (MMP) e seus inibidores teciduais (TIMP), essenciais para o equilíbrio entre a produção e degradação da MEC e sua manutenção (4).

As MMP são uma família de 23 enzimas (MMP-1 a -23) capazes de degradar os diversos componentes da MEC. São essenciais para processos fisiológicos, como a embriogênese, e para o crescimento e a manutenção normal dos tecidos (10). A maioria das MMP é produzida na forma inativa e a ativação ocorre, mais comumente, por meio da quebra e perda do peptídeo terminal, que expõe o sítio catalítico zinco-dependente das MMP (10). Cada MMP apresenta afinidade e especificidade para determinado substrato da MEC, no entanto, mais recentemente, descobriu-se que as MMP também tem a capacidade de degradar ou modificar outras proteínas que não as proteínas da MEC, como fatores de crescimento, citocinas, receptores celulares, inibidores e até mesmo outras MMP (11).

A atividade das MMP é regulada, principalmente, por seus inibidores teciduais (TIMP). Constituem uma família de quatro membros (TIMP-1 a -4) que tem como função principal inibir as MMP, regulando e impedindo sua atividade excessiva. A predominância de formação de MEC ou degradação da mesma depende de um equilíbrio fino entre a concentração de MMP e TIMP no tecido (12).

Alterações na homeostase da MEC estão fortemente relacionadas a processos patológicos que envolvem vários órgãos, como pulmão, rins, fígado, medula óssea, ossos, cartilagens e o coração (13). O acúmulo anormal de MEC leva à fibrose e a doenças como cirrose, fibrose pulmonar idiopática, mielodisplasias, osteoartrite, além de estar relacionada a aumento do risco de surgimento de neoplasias (13). Nesse contexto, as doenças cardiovasculares ainda representam a principal causa de morte por doenças não transmissíveis em todo o mundo e o processo pelo qual o coração responde a determinada injúria e denominado remodelação cardíaca.

A remodelação cardíaca é caracterizada por alterações moleculares, celulares e intersticiais que se manifestam como mudanças no tamanho, forma e função do coração após uma injúria miocárdica (14). A homeostase da MEC pode ser alterada

frente a vários estímulos comumente presentes nas cardiopatias, como sobrecargas hemodinâmicas, ativação de sistemas hormonais, inflamação, aumento do estresse oxidativo, entre outros (12). A ruptura da estrutura da MEC interrompe a conexão entre os cardiomiócitos, quebra a estrutura cardíaca, podendo cursar com disfunção do coração. Além disso, o excesso de produção, ou a mudança do padrão de produção, de proteínas estruturais da MEC resulta em aumento da rigidez do miocárdio, dificultando tanto o relaxamento quanto a contração miocárdica (15). As MMP presentes de maneira mais abundante no coração são as MMP-2 e -9 (10,12).

Desse modo, a MEC tem papel crucial na patogênese de diversas doenças, o que faz com que intervenções que afetem a composição e dinâmica da MEC se constituam importante alvo terapêutico. Nesse sentido, os produtos de origem natural vêm ganhando destaque devido suas composições ricas em grande variedade de substâncias com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, como vitaminas e minerais, que podem influenciar a MEC por terem a possibilidade de interferir em diferentes vias e processos fisiológicos. Dentre esses produtos de origem natural, o suco de laranja se torna um importante alvo de estudo, uma vez que é uma bebida largamente consumida em quase todo o mundo e rica em compostos com propriedades benéficas à saúde.

A laranja mais comumente utilizada no país para extração de suco é a laranja Pera (*Citrus sinensis*). Essa laranja possui em sua composição, aproximadamente por litro, 420 Kcal, 100 g de carboidratos, 336 mg de vitamina C, 1,48 g de  $\beta$ -criptoxantina, 280 mg de  $\beta$ -caroteno, 110 mg de hesperidina (16).

Recentemente, variedades de laranjas sanguíneas, assim denominadas por conta de sua cor avermelhada, vêm ganhando destaque. Os compostos responsáveis pela cor vermelho-violácea dessas laranjas são as antocianinas, que possuem altíssima capacidade antioxidante e anti-inflamatória (17). Uma dessas variedades é a laranja Moro [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], que possui em sua composição quantidades maiores de vitamina C (400 mg/L) e de hesperidina (550 mg/L) (18) que a laranja Pera e, adicionalmente, possui em torno de 30 mg/L de antocianinas, que não estão presentes na laranja Pera (19). Sabe-se que o suco de laranja possui atividade anti-inflamatória (20), inclusive em indivíduos saudáveis (21). Essas diferenças na composição conferem ao suco da laranja Moro maior capacidade antioxidante e anti-inflamatória que o suco das variedades claras, como a Pera (16,18).

Estudos *in vitro* utilizando células de câncer de pulmão observaram diminuição da atividade de MMP-2 e -9 com a administração de naringenina, uma substância presente no suco de laranja (22). A administração de naringenina também diminuiu a atividade de MMP-2 e -9 em fígado de ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica (23). Em modelo de câncer de pulmão, a administração de hesperidina levou a diminuição de MMP-2 e -9 (24) e em estudo *in vitro* com células de hepatocarcinoma houve diminuição da expressão de MMP-9 (25).

No entanto, todos esses estudos avaliaram apenas um componente do suco de laranja isoladamente. Acredita-se que a administração do suco total provocaria efeitos diferentes na MEC, uma vez que um componente poderia interferir com a absorção e metabolização de outro componente presente no suco.

Apesar de sabermos que a ingestão do suco de laranja pode provocar algumas mudanças metabólicas no organismo de humanos e outros animais (20,21,26,27), ainda não são conhecidas todas as alterações metabólicas provocadas pela ingestão de suco de laranja. Mais recentemente, a técnica de metabolômica vem ganhando destaque, pois permite avaliar por um único método diferentes metabólitos presentes em amostra de sangue ou tecido. A aplicação da técnica metabolômica em estudos tem permitido o aumento da compreensão, em nível molecular, da patogênese de diversas doenças. Adicionalmente, por meio da metabolômica também é possível avaliar o perfil metabólico de um indivíduo após a administração de um alimento específico, permitindo analisar a correlação de dietas com genes, proteínas e metabólitos, tanto em situações fisiológicas como patológicas (28). Curiosamente, não identificamos estudos que tenham utilizado a técnica de metabolômica para avaliar as alterações metabólicas ocorridas após a ingestão de suco de laranja.

**HIPÓTESE**

A administração de suco de laranja Pera interfere com a dinâmica e a composição da matriz extracelular miocárdica e a administração do suco de laranja Moro, devido a seu maior efeito anti-inflamatório e antioxidante, tem efeito mais pronunciado que o suco de laranja Pera. Acreditamos, ainda, que a ingestão de suco de laranja Moro provoque maiores alterações metabólicas que o suco de laranja Pera, quando avaliadas pela técnica da metabolômica.

# OBJETIVO

Avaliar a influência da ingestão de suco de laranja Pera na matriz extracelular miocárdica e comparar com os efeitos do suco da laranja Moro em corações saudáveis e avaliar o efeito da ingestão de ambos os sucos na metabolômica no soro desses animais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

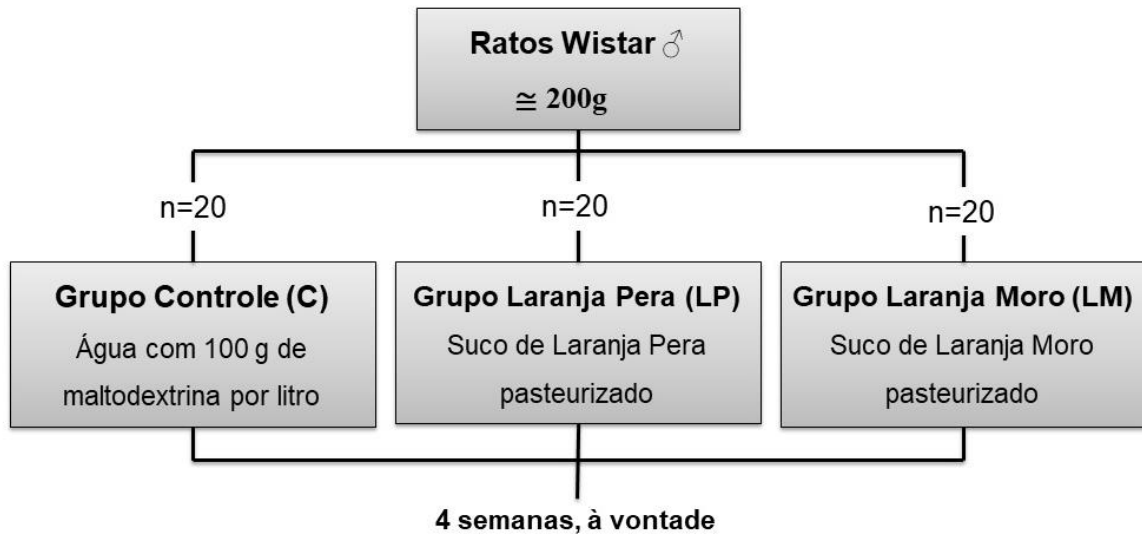
## **Delineamento experimental**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (parecer CEUA nº1285/2019). Foram utilizados 60 animais, que foram alocados em 3 grupos, com 20 animais cada: controle (C), suco de laranja Pera (LP) e suco de laranja Moro (LM). Os animais foram mantidos em caixas com cama de maravalha, com 2 animais por caixa, em ambiente com umidade e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à ração.

Com relação à oferta de líquidos, foi feita da seguinte forma: os animais do grupo C receberam água com 100 g de maltodextrina por litro, para igualar os carboidratos do suco, à vontade, durante todo o período experimental. O grupo LP recebeu suco de laranja pasteurizado extraído de laranja Pera, por 4 semanas, à vontade. O grupo LM recebeu suco de laranja Moro pasteurizado, por 4 semanas, à vontade. Os sucos foram fornecidos pela Fundecitrus, Araraquara-SP, armazenados em freezer a -80°C até o momento de sua utilização. Mapelli-Brahm et al., demonstrou em seu estudo que o processo de pausterização e de congelamento pode aumentar a bioacessibilidade dos micronutrientes presentes no suco (29). Os líquidos (tanto os sucos quanto a água com maltodextrina) foram trocados a cada 24 horas e a ingestão foi mensurada durante todo o experimento.

Após o período de 4 semanas de oferta dos sucos, todos os animais foram submetidos ao ecocardiograma sob anestesia leve (descrita a seguir). Após o ecocardiograma, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (120 mg/kg) para realização da eutanásia. A decaptação foi utilizada como método secundário por permitir coleta de maior volume de sangue com menos risco de interferência na coleta e hemólise. Após, o tórax foi aberto, o coração retirado, dissecado e armazenado a -80°C para posteriores análises. Além disso, o sangue coletado de todos os animais foi centrifugado e armazenado a -80°C. O delineamento experimental encontra-se resumido na figura 1.

Figura 1 - Delineamento experimental.



## Ecocardiograma

Os ratos receberam anestesia leve com quetamina (50 mg/kg) xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal e foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. O exame foi realizado utilizando-se equipamento Vivid S6 (General Electric Medical Systems), com transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz. Todos os exames foram realizados pelo mesmo examinador que desconhecia os grupos dos animais.

As variáveis estruturais foram obtidas por análise bidimensional e foram mensuradas as espessuras da parede posterior e do septo interventricular do ventrículo esquerdo na diástole e diâmetros da aorta, do átrio esquerdo e do ventrículo esquerdo na sístole e diástole. Também foi mensurada a área do átrio esquerdo e do átrio direito.

Além disso, foi obtido pelo doppler transmitral o pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E), pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A), tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de desaceleração da onda E. O estudo foi complementado pela avaliação por Doppler tissular dos deslocamentos sistólico (S'), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral na parede lateral e septal.

Com os dados obtidos, foram realizados cálculos da espessura relativa da parede posterior, fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, relação E/A, tem-

po de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca, relação  $E'/A'$ , relação  $E/E'$  e massa do ventrículo esquerdo (30).

## **Histologia**

Após a eutanásia, o ventrículo esquerdo foi seccionado transversalmente 5 mm a partir do ápice e foi obtido anel com 2 mm de espessura. O anel foi colocado em solução de formol tamponado a 10% e permaneceu por 24 a 48 horas. Após esse período, o material foi transferido para solução de etanol a 70%. As secções foram incluídas em bloco de parafina. Posteriormente, o material foi cortado em micró-tomo com espessura de 5  $\mu$ m para confecção das lâminas histológicas, que foram coradas com Picrosirius Red, que é uma coloração específica para colágeno. O colágeno foi mensurado por densidade óptica. Foram avaliados 20 campos por lâmina e o colágeno perivascular foi excluído das análises e para a análise da porcentagem de colágeno utilizou-se o software de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) (31).

## **Atividade de MMP-2 por zimografia**

A zimografia foi realizada para determinar a atividade de MMP-2 no tecido cardíaco. Aproximadamente 30 mg de tecido congelado serão utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo: 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X e 10 mM  $CaCl_2$ . As amostras serão trituradas utilizando o aparelho Ultra Turrax, 21.000 rpm e centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante será coletado e a proteína quantificada, utilizando método de Bradford e a concentração final ajustada. As amostras foram diluídas em tampão da amostra contendo 0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol 50 %, e 0,05% de azul de bromofenol. O gel de separação utilizado foi de poli(acrilamida) a 8% acrescido de 1% de gelatina e a corrida foi realizada com aparato Bio-Rad mini-protean, a 100 V por 2 horas, contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Após a corrida, o gel foi lavado por uma hora em 2,5% Triton X-100 e após, em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 16 horas em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500 mM de  $CaCl_2$ , em agitação contínua e à temperatura de 37°C. Após a incubação o gel foi corado com

coomassie brilliant blue 2,5% por 1 hora e descorado com solução de 30% metanol e 10% ácido acético. Os géis foram fotografados e analisados utilizando-se o programa GelPro 32, que mediu a área de digestão da gelatina. A normalização entre os experimentos foi realizada pela inclusão de um mesmo animal controle em todo gel. A localização das MMP-2 foi confirmada utilizando-se como controle positivo a MMP-2 recombinante de rato/camundongo (32).

## **Western blot**

Foi empregada a técnica de Western blot para a quantificação da expressão das proteínas MMP-9, TIMP-2, TIMP-4, colágeno tipo I e TNF-alfa. O método foi constituído pelas seguintes etapas:

1) Extração: amostras do VE foram homogeneizadas com tampão de lise RIPA no aparelho de dispersão UltraTurrax. O Homogenato das amostras foi centrifugado para separação da fração sólida e líquido sobrenadante, que foi coletado. A concentração de proteína total foi obtida pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

2) Eletroforese em gel: após a quantificação de proteína, a concentração proteica nas amostras foi igualada por meio de diluição com água Mili-Q e, em seguida, foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCl 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e  $\beta$ -mercaptoetanol 200mM) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. As amostras foram separadas por meio da técnica de eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 ElectrophoresisCell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCl 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCl 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4°C. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução variou de 10 a 15%, de acordo com o peso molecular da proteína determinada. Para a identificação da massa molecular da proteína determinada, no primeiro poço do gel, foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e nos poços seguintes as amostras foram aplicadas alternadamente. A corrida eletroforética no gel de empilhamento foi realizada a 30 min a 50 V e a 2 ho-

ras a 120 V no gel de resolução (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

3) Transferência e bloqueio: após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-TransBlot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). O bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana de nitrocelulose foi realizado por meio da incubação em solução de bloqueio (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M, detergente Tween 20 e leite em pó desnatado 5%) durante 120 minutos em temperatura ambiente sob constante agitação.

4) Incubação com os anticorpos e análise: após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos com leite em pó desnatado 3% em solução basal, durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 por 3 vezes a cada 5 minutos e incubadas com os anticorpos secundários específicos, diluídos com leite em pó desnatado 1% em solução basal. As membranas permaneceram incubadas por 90 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 por 3 vezes a cada 5 minutos e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific, USA (33). As imagens foram fotografadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA). A expressão de todas as proteínas analisadas foi normalizada pela expressão da proteína glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). As imagens foram analisadas no programa Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

## Espectrometria de massas de alta resolução

A espectrometria de massas de alta resolução foi empregada para avaliar as alterações metabólicas ocorridas após a administração do suco de Laranja Pera (n=18) e do suco de Laranja Moro (n=17) em comparação com o grupo controle (n=19). Para isso, amostras de soro de ratos foram coletadas e submetidas a técnicas analíticas para avaliação do perfil metabolômico. Inicialmente, as amostras de soro dos animais foram preparadas de acordo com Melo e colaboradores (34), sendo que para cada amostra, cinco replicatas analíticas foram avaliadas. Após o preparo, as amostras foram ionizadas por electrospray e submetidas a injeção direta em espectrômetro de massas de alta resolução (ESI-HRMS), no equipamento ESI-LTQ-XL Orbitrap Discovery (ThermoScientific, Bremen, Germany), cuja resolução nominal equivale a 30.000 (FWHM). Duas faixas de massa foram definidas para a presente análise, como sendo de 100-700  $m/z$  e 700-1700  $m/z$ , tanto no modo positivo quanto negativo de análise, e os espectros foram analisados utilizando-se o software XCalibur (v. 2.4, ThermoScientific, San Jose, Ca).

A identificação e elucidação estrutural dos marcadores foi realizada da seguinte forma: inicialmente, a análise dos biomarcadores foi realizada com base na comparação entre as massas experimental e teórica utilizando-se de bancos de dados online, como o METLIN (Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, CA, USA). A análise inicial sugeriu alguns biomarcadores com base na precisão de massa, expressa em ppm. Dentre esses, alguns mais relevantes foram selecionados. Por fim, a identificação dos biomarcadores selecionados foi confirmada com base no perfil de fragmentação iônica *in tandem* (MS/MS), utilizando o software Mass Frontier (v. 6.0, ThermoScientific, San Jose, CA).

## **Análise estatística**

Os dados com distribuição normal foram apresentados em média  $\pm$  desvio-padrão. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram apresentadas em mediana e valores de primeiro e terceiro quartil. As comparações entre os grupos foram feitas por ANOVA de uma via ou ANOVA onRanks e foi adotada significância estatística de 5% para todas as análises.

Para a análise da metabolômica, os dados obtidos foram analisados por meio de estatística multivariada, usando análise de componentes principais (PCA) e mínimos quadrados parciais para análises de discriminantes (do inglês Partial Least Squares Discriminant Analysis – PLS-DA). Por meio dessa análise é possível identificar as moléculas diferencialmente presentes nos grupos avaliados. A seleção de cada íon / biomarcador é baseada na sua importância para cada modelo de estudo avaliado, a qual é identificada utilizando-se o VIP score (do inglês *Variable Importance in Projection score*). As análises de PLS-DA e VIP score foram realizadas por meio do software online gratuito MetaboAnalyst 3.0 (35).

# RESULTADOS

## Ecocardiograma

Os resultados do ecocardiograma não evidenciaram alterações funcionais e estruturais nos corações de nenhum dos grupos (tabela 1 e 2).

Tabela 1 - Frequência cardíaca e variáveis estruturais ao Ecocardiograma.

Variáveis	Controle (n=20)	Laranja Pera (n=20)	Laranja Moro (n=20)	Valor p
FC (bpm)	323±78	334±67	350±60	0,453*
PP (mm)	1,53 (1,45-1,53)	1,53 (1,53-1,53)	1,53 (1,45-1,53)	0,306 <sup>#</sup>
ERPP	0,45±0,04	0,45±0,05	0,45±0,04	0,912*
SIV (mm)	1,53 (1,53-1,64)	1,53 (1,53-1,58)	1,53 (1,53-1,65)	0,674 <sup>#</sup>
DDVE (mm)	6,68±0,59	6,78±0,64	6,71±0,55	0,850*
DSVE (mm)	2,60±0,37	2,80±0,5	2,70±0,56	0,486*
AE (mm)	4,34±0,31	4,51±0,32	4,47±0,24	0,162*
Ao (mm)	3,58 (3,32-3,83)	3,58 (3,58-3,83)	3,58 (3,58-3,77)	0,238 <sup>#</sup>
AE/Ao	1,21 (1,15-1,30)	1,22 (1,14-1,30)	1,22 (1,20-1,26)	0,896 <sup>#</sup>
Área AE (mm <sup>2</sup> )	17,9 (14,6-20,5)	18,3 (16,3-20,6)	17,5 (16,3-19,7)	0,690 <sup>#</sup>
Área AD (mm <sup>2</sup> )	13,9 (12,0-16,9)	14,8 (13,2-16,4)	13,7 (12,7-15,6)	0,487 <sup>#</sup>
Massa VE (g)	656±121	678±115	661±105	0,819*

FC: frequência cardíaca; PP: espessura da parede posterior; ERPP: espessura relativa da parede posterior; SIV: espessura do septo interventricular; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta; Área AE: área do átrio esquerdo; Área AD: área do átrio direito; Massa VE: Massa do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão para distribuição normal ou mediana com percentil 25 e 75 para distribuição não normal. Valor de p: \* ANOVA de uma via; # ANOVA on Ranks.

Tabela 2 -Variáveis funcionais ao Ecocardiograma.

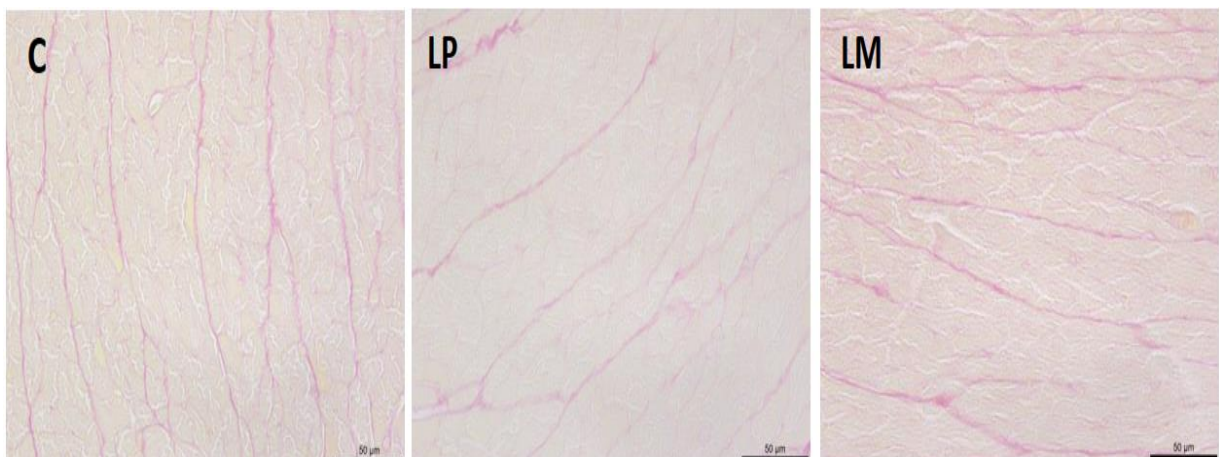
Variáveis	Controle (n=20)	Laranja Pera (n=20)	Laranja Moro (n=20)	Valor p
E/A	1,42 (1,25-1,60)	1,46 (1,38-1,62)	1,41 (1,34-1,57)	0,501 <sup>#</sup>
E' médio (cm/s)	6,21±1,09	6,17±0,86	6,10±0,23	0,947*
A' médio (cm/s)	3,93±0,47	3,91±0,56	4,11±0,55	0,403*
E'/A'	1,58 (1,44-1,70)	1,54 (1,47-1,64)	1,54 (1,45-1,63)	0,591 <sup>#</sup>
E/E'	14,8 (13,9-15,6)	14,4 (13,2-15,3)	13,8 (13,3-15,6)	0,502 <sup>#</sup>
TRIVcor	53,4 (47,9-58,0)	53,6 (50,4-60,3)	57,2 (53,1-59,3)	0,253 <sup>#</sup>
TDE (ms)	45,8±6,60	49,6±6,10	48,6±5,20	0,132*
S' médio (cm/s)	5,82 (5,47-6,00)	5,97 (5,80-6,10)	5,95 (5,72-6,22)	0,351 <sup>#</sup>
Fenc	0,62 (0,58-0,64)	0,59 (0,56-0,62)	0,60 (0,56-0,64)	0,349 <sup>#</sup>

E/A: relação entre a onda E onda A; E' médio: onda E ao doppler tissular; A' médio: onda A medida pelo doppler tissular; onda E: velocidade de pico do enchimento ventricular precoce; onda A: velocidade de pico do fluxo transmitral durante a contração atrial; TRIVcor: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca; TDE: tempo de desaceleração da onda E; S' médio: velocidade de fluxo tecidual durante a sístole obtido pelo doppler tissular; Fenc: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão para distribuição normal ou mediana com percentil 25 e 75 para distribuição não normal. Valor de p: \* ANOVA de uma via; # ANOVA on Ranks.

## Histologia

Por meio da análise quantitativa das lâminas histológicas coradas por Picrosirius Red (figura 2) não foi observada diferença no percentual de colágeno dos grupos LP e LM em comparação ao grupo C (C:2,33±0,66; LP:2,53±0,58; LM: 2,50±0,64%; p=0,744).

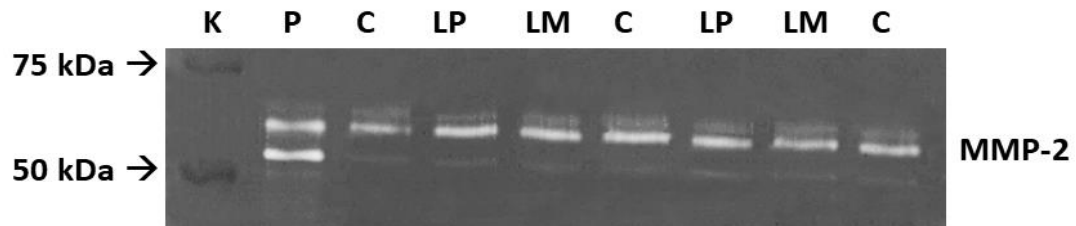
Figura 2- Cortes histológicos corados por Picrosirius Red



## Atividade de MMPs por zimografia

A atividade da MMP-2 pode ser observada na figura 3. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupo na análise de atividade de MMP-2 mensurada por meio da técnica de Zimografia (Tabela 03).

Figura 3 - Atividade da MMP-2 por Zimografia.



As áreas brancas no gel correspondem às áreas de digestão da gelatina e, portanto, não são coradas. K= Kaleidoscope Prestained Standards; P= Controle positivo (MMP-2 recombinante de rato/camundongo); C= Grupo Controle; LP = Grupo Laranja Pera; LM= Grupo Laranja Moro.

Tabela 3 - Atividade de MMP-2.

Variáveis	Controle (n=9)	LaranjaPera (n=9)	Laranja Moro (n=9)	Valor p
MMP-2 75 KDa	0,936±0,265	1,117±0,540	1,350±0,514	0,234*
MMP-2 72KDa	0,949± 0,0727	0,984± 0,0999	1,000± 0,0774	0,495*
MMP-2 64 KDa	0,741(0,598 - 1,000)	0,871(0,653 - 1,031)	0,822(0,706 - 0,872)	0,662*

Os dados são expressos em média ± desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75, em unidades arbitrárias. Valor de p: \* ANOVA de uma via; # ANOVA on Ranks.

## Western blot

Foram analisadas as proteínas Colágeno tipol, TIMP-2, TNF-alfa, MMP-9 e TIMP-4. Não foi observado diferença estaticamente significativa entre os grupos na expressão de nenhuma das proteínas analisadas pela técnica de Western Blot (Tabela 4).

Tabela 4 - Expressão proteica analisada por Western blot

Variáveis	Controle (n=9)	LaranjaPera (n=9)	Laranja Moro (n=9)	Valor p
<b>Colágeno I</b>	1,022±0,199	1,026±0,167	1,026±0,229	0,999*
<b>TIMP-2</b>	1,079± 0,372	1,223± 0,548	0,902± 0,325	0,297*
<b>TNF-alfa</b>	0,682 ±0,321	0,767 ±0,389	0,654 ±0,280	0,759*
<b>MMP-9</b>	1,004 (0,883-1,246)	1,098 (0,821-1,450)	1,119 (0,859-1,472)	0,647 <sup>#</sup>
<b>TIMP-4</b>	1,000 (0,839-1,115)	1,081 (1,007-1,179)	1,016 (0,823-1,229)	0,588 <sup>#</sup>

Os dados são expressos em média ± desvio padrão ou mediana com percentil 25 e 75, em unidades arbitrárias. Valor de p: \* ANOVA de uma via; # ANOVA on Ranks.

### Espectrometria de massas de alta resolução

A análise de metabolômica identificou alterações na intensidade de sinal para diferentes metabólitos no grupo LP em comparação ao grupo C (gráfico 1 e 2) e no LM em comparação ao grupo C (gráfico 3 e 4), revelando que a administração do suco de laranja Pera e do suco de laranja Moro foi capaz de causar alterações na concentração de metabólitos nos grupos LP e LM em comparação ao grupo C.

Nos gráficos de VIP score podemos observar as massas dos principais metabólitos selecionados, responsáveis pela discriminação entre os grupos LP e C (gráfico 5 e 6) e entre os grupos LM e C (gráfico 7 e 8).

Gráfico1 - Agrupamento dos grupos LP e C por meio da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a faixa de massa de 100 a 700  $m/z$ , no modo positivo de análise.

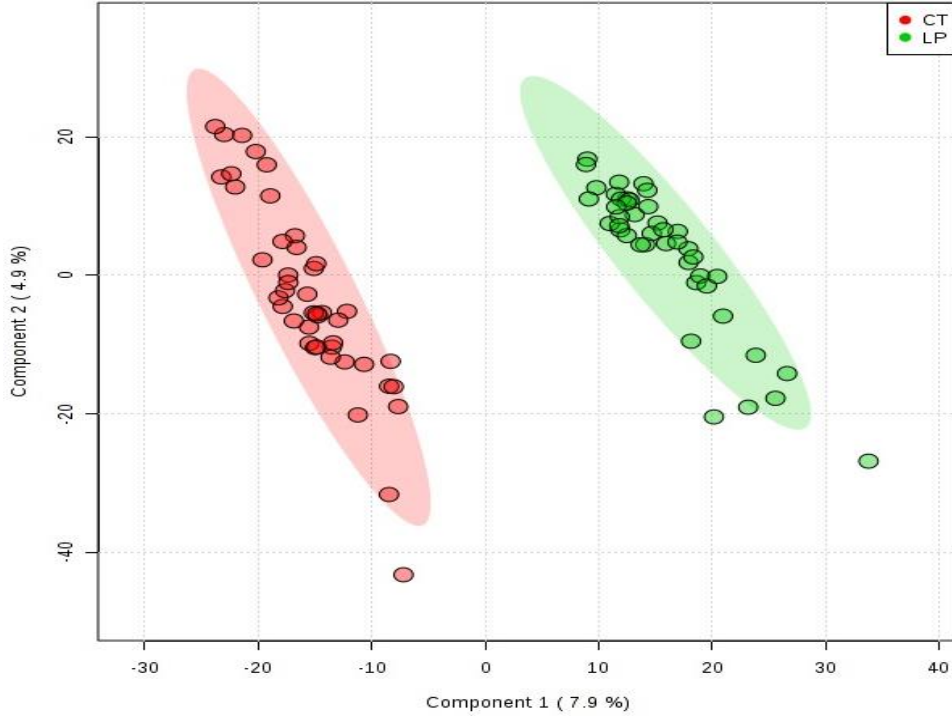


Gráfico 2 - Agrupamento dos grupos LP e C por meio da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a faixa de massa de 700 a 1700  $m/z$ , no modo positivo de análise.

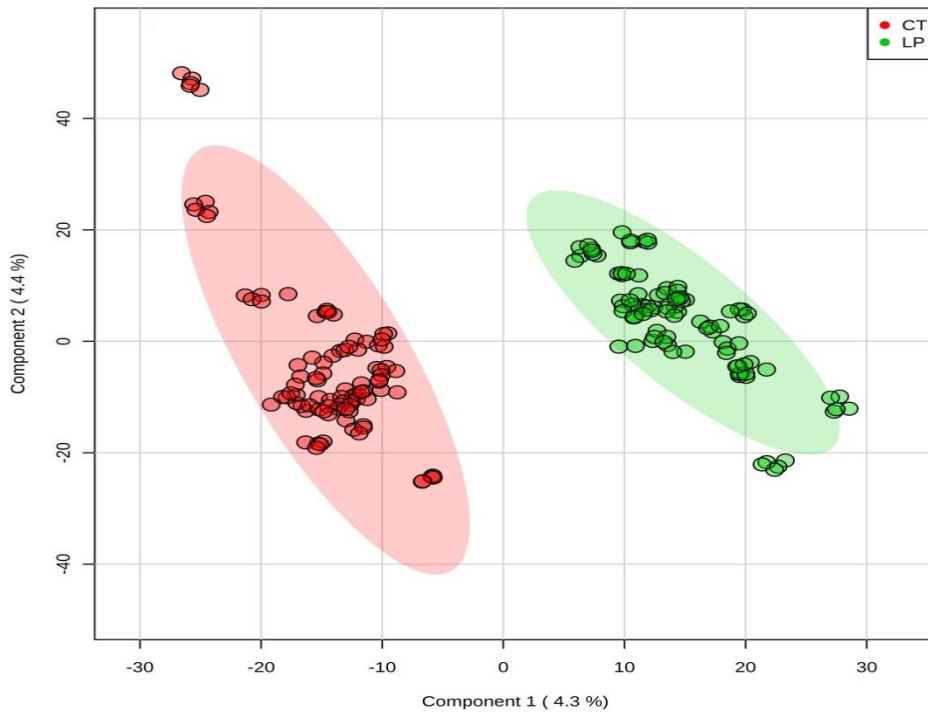


Gráfico 3 - Agrupamento dos grupos LM e C por meio da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a faixa de massa de 100 a 700  $m/z$ , no modo positivo de análise.

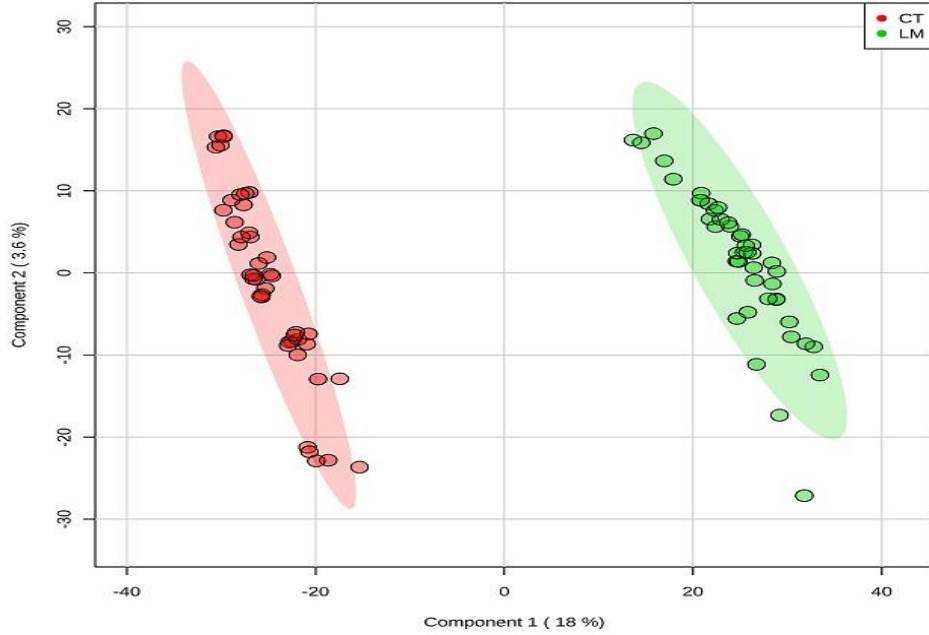


Gráfico 4 - Agrupamento dos grupos LM e C por meio da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a faixa de massa de 700 a 1700  $m/z$ , no modo positivo de análise.

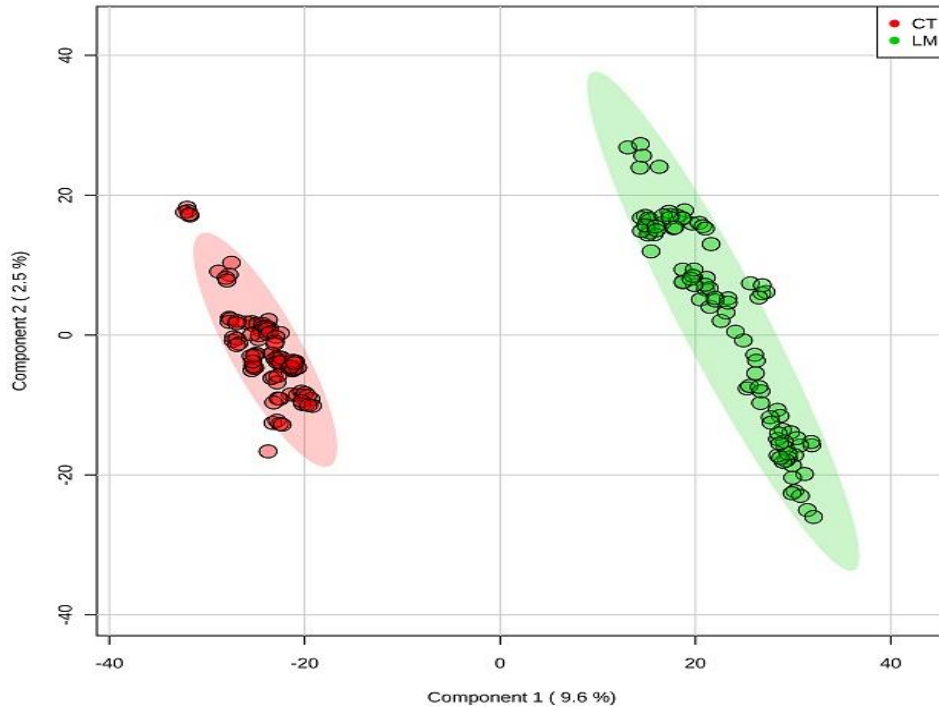


Gráfico 5 - Análise das variáveis importantes na projeção (VIP).

Principais massas de baixo peso molecular (100 a 700  $m/z$ ) responsáveis pela discriminação entre o grupo LP e grupo C.

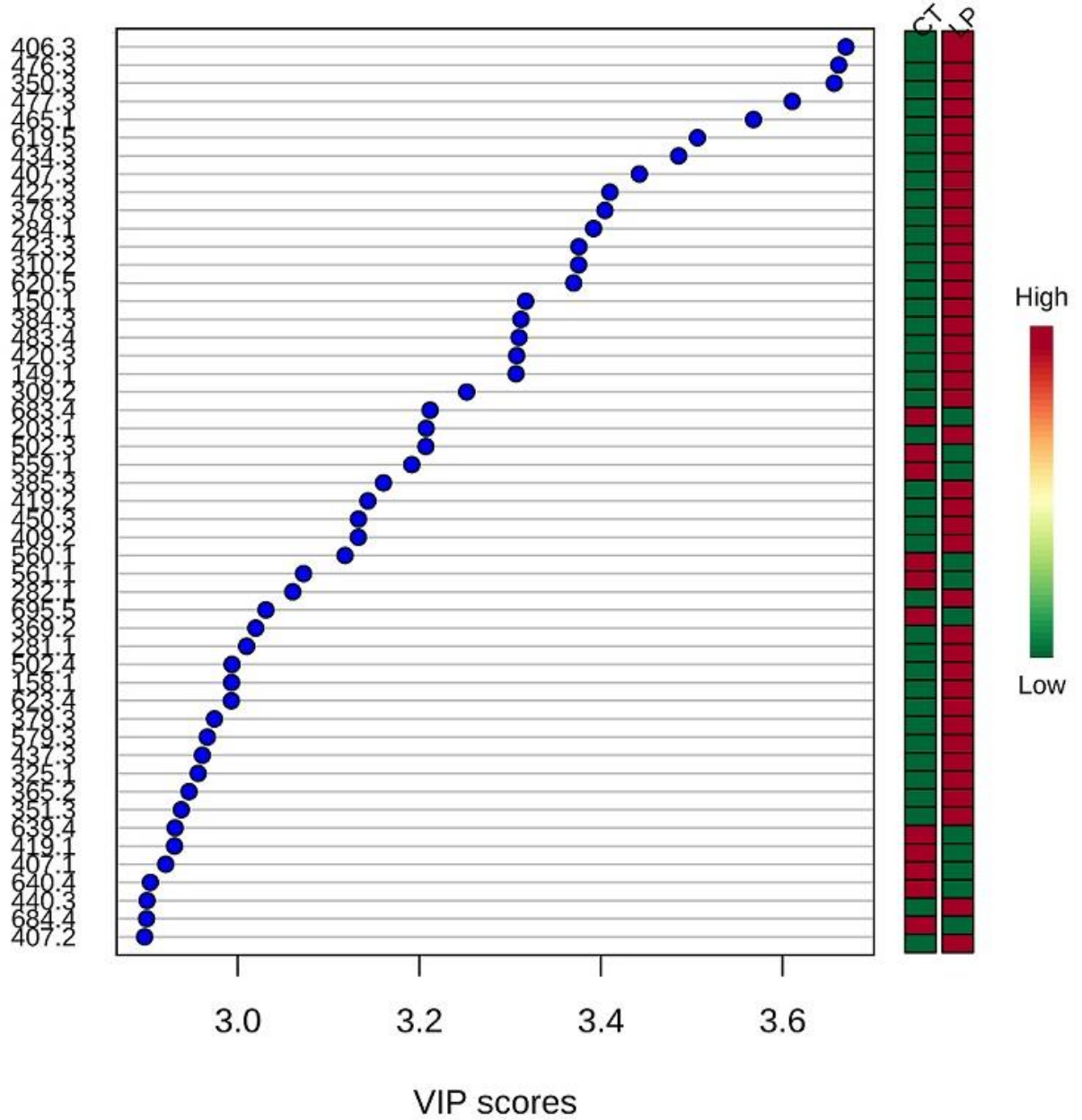


Gráfico 6 - Análise das variáveis importantes na projeção (VIP).

Principais massas de alto peso molecular (700 a 1700  $m/z$ ) responsáveis pela discriminação entre o grupo LP e grupo C.

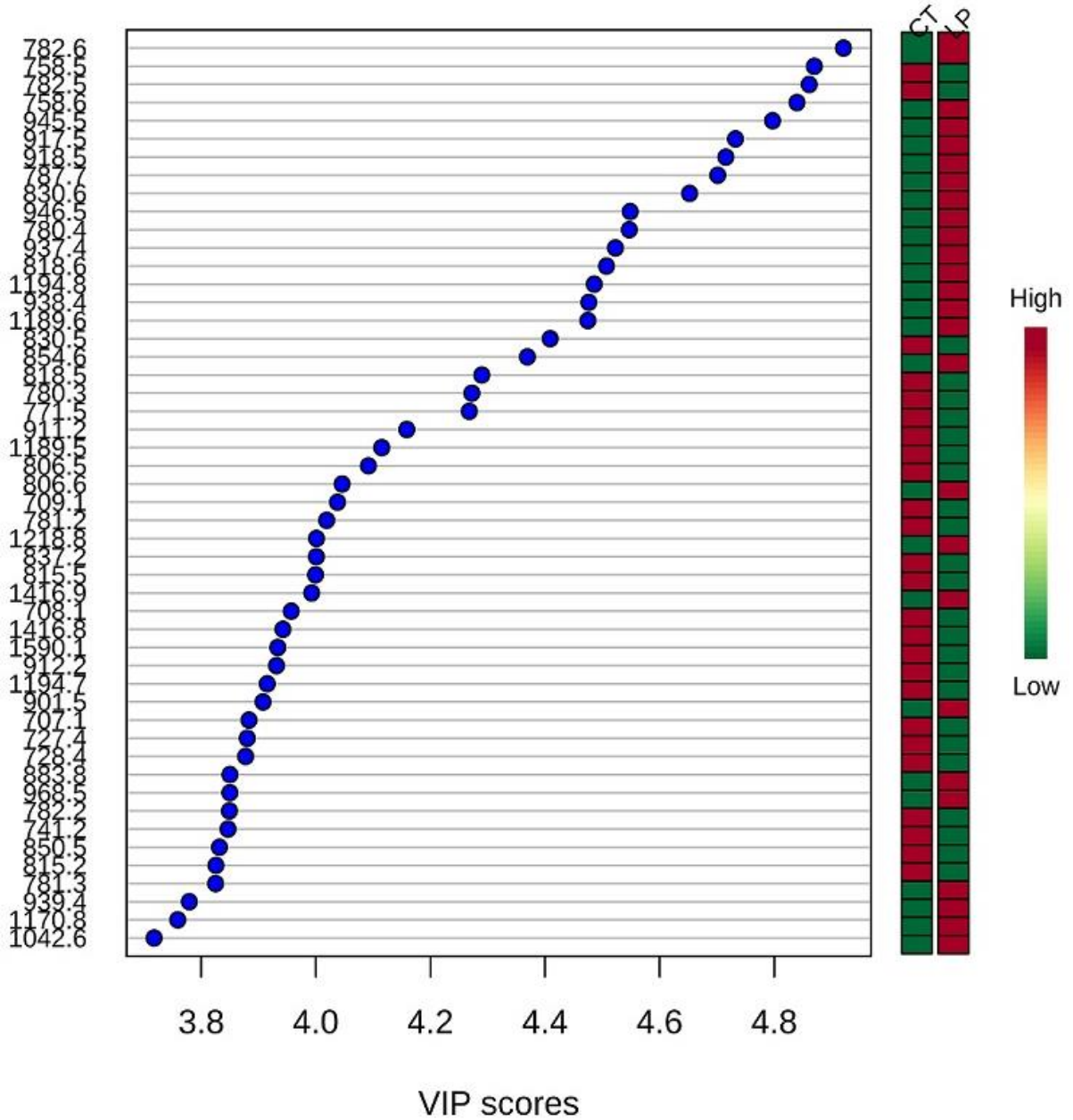


Gráfico 7 - Análise das variáveis importantes na projeção (VIP).

Principais massas de baixo peso molecular (100 a 700  $m/z$ ) responsáveis pela discriminação entre o grupo LM e grupo C.

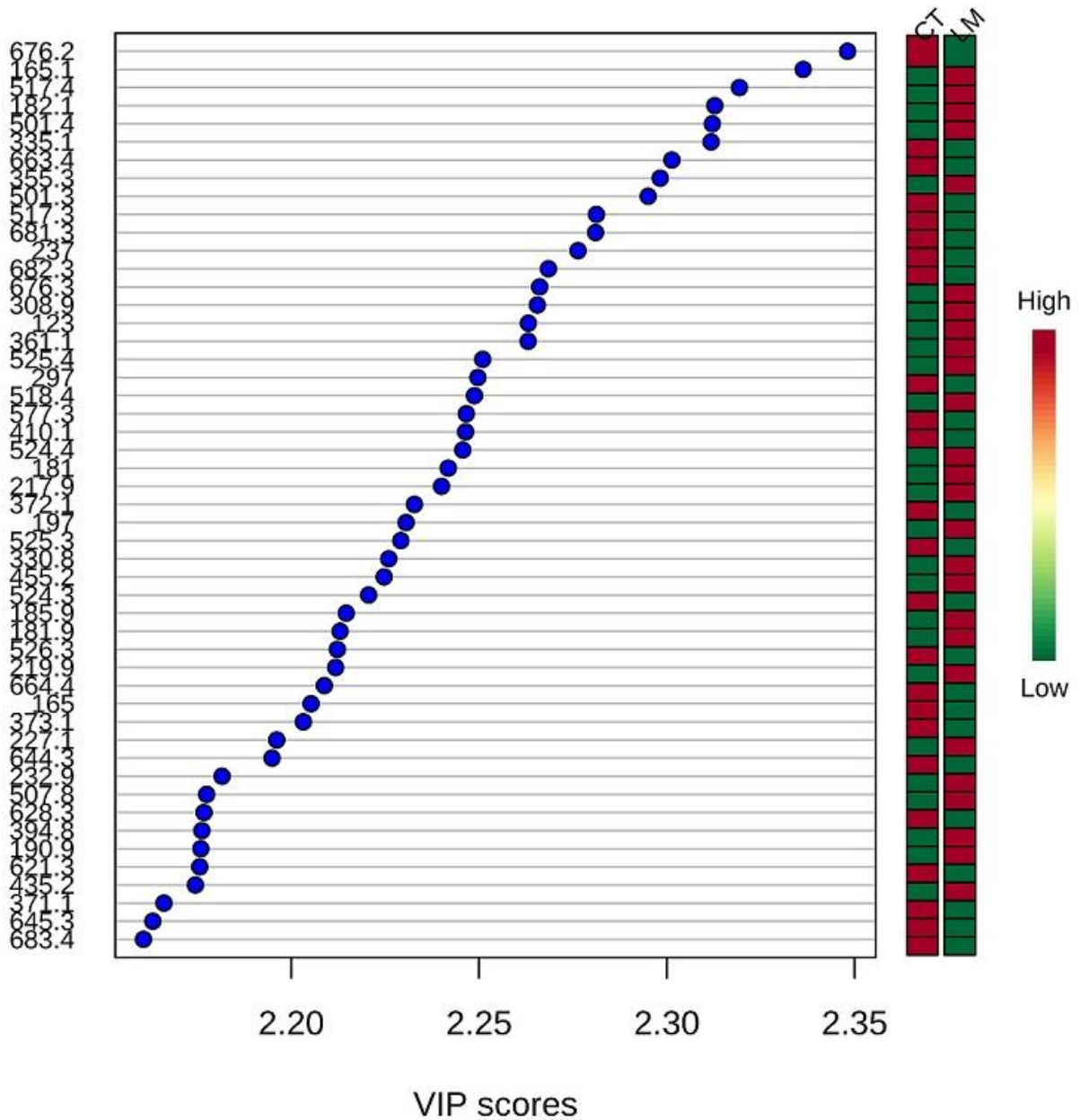
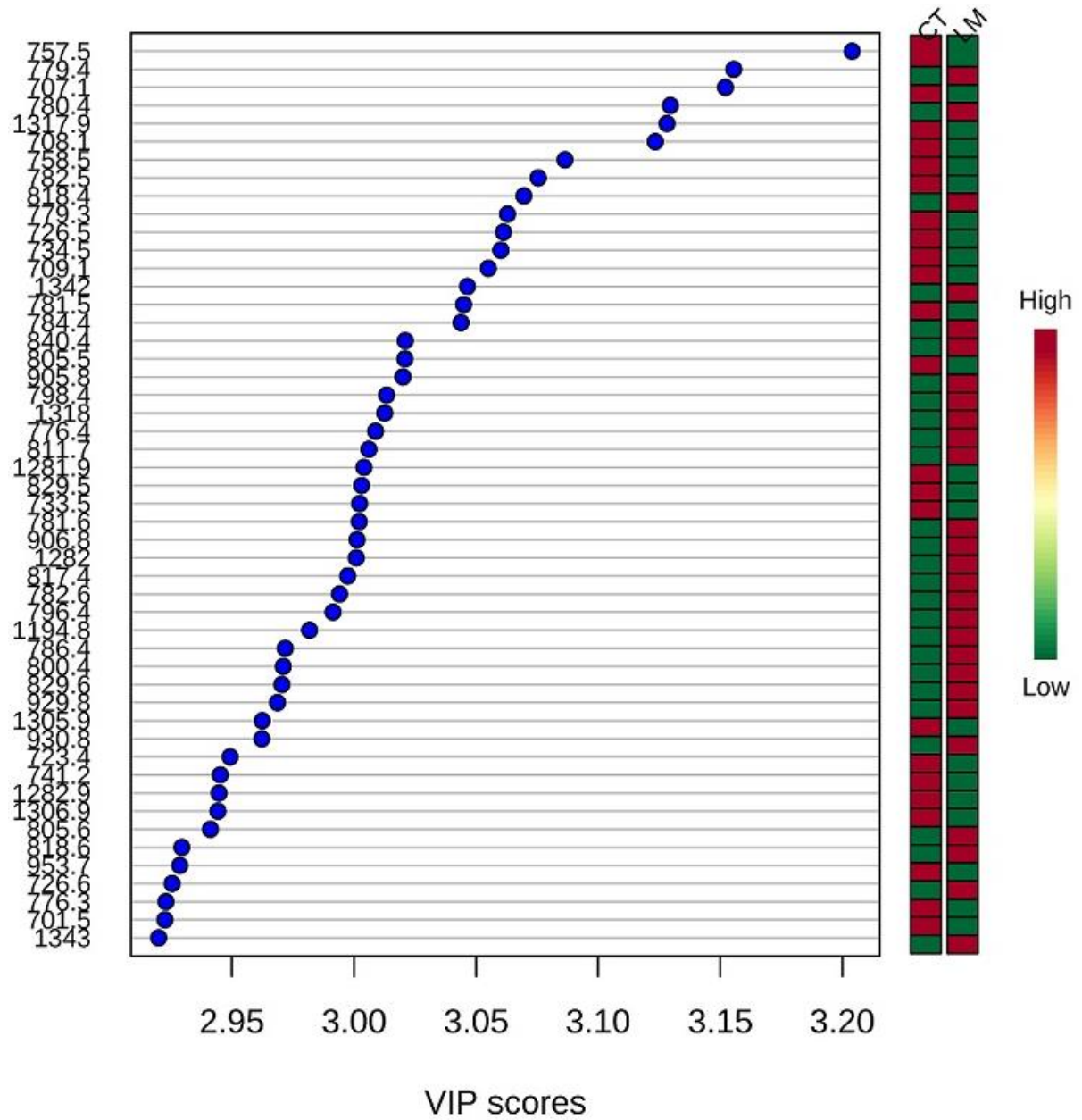


Gráfico 8 - Análise das variáveis importantes na projeção (VIP).

Principais massas de alto peso molecular (700 a 1700  $m/z$ ) responsáveis pela discriminação entre o grupo LM e grupo C.



## Marcadores identificados por meio da espectrometria de massa in tandem

Por meio da espectrometria de massas in tandem e busca nos bancos de dados de metabólitos, foi possível selecionar e identificar 3 moléculas no soro dos animais do grupo LP (tabela 4) e 6 moléculas no grupo LM (tabela 5), que foram marcadores diferenciais em comparação ao grupo C.

Tabela 4 - Moléculas que diferiram pelo PLS-DA na análise do soro do grupo LP comparado com o grupo C no modo de íon positivo.

Massa exata	MS/MS	Massa teórica	Aduto	MID <sup>a</sup>	Molécula	Erro (ppm)
476,3168 <sup>*</sup>	325, 572, 755, 492, 843	476,3159	[M+H] <sup>+</sup>	75476	N-docosahexaenoylphenylalanine	-1,889502324
709,6141 <sup>#</sup>	485 - 493 - 659 - 507	709,6135	M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	59046	DG(44:5)a	-0,845530701
734,6044 <sup>#</sup>	615 - 703 - 367 - 418	734,6058	[M+H] <sup>+</sup>	77570	PE(O-36:0)a	1,905784027

HRMS biomarcadores eleitos pelo PLS-DA associados ao VIP score. Identificação baseada em espectrometria de massas in tandem e bancos de dados metabolômicos. MS/MS = Perfil de fragmentação iônica. M: massa; H: hidrogênio, O: oxigênio. DG: diglicerídeo; PE: Phosphatidylethanolamine. MID<sup>a</sup> = METLIN ID; <sup>\*</sup> = faixa de massa de 100 a 700 *m/z*; <sup>#</sup> = faixa de massa de 700 a 1700 *m/z*. <sup>a</sup> = (número de carbono:ligação dupla)

Tabela 5 - Moléculas que difereriram pelo PLS-DA na análise do soro do grupo LM comparado com o grupo C no modo de íon positivo.

Massa exata	MS/MS	Massa teórica	Aduto	MID <sup>a</sup>	Molécula	Erro (ppm)
181.9853 <sup>*</sup>	165 - 136 - 112	1.819,850	[M+K]	72080	N-formylmaleamicacid	-1,6484875
197.0893 <sup>*</sup>	127 - 134 - 179 - 81	1.970,897	[M+Na]	3303	N2-Acetyl-L-ornithine	2,0295327
361.1639 <sup>*</sup>	305 - 291 - 231 - 213	3.611,646	[M+H]	93640	Casegravol isovalerate	1,9381745
435.1981 <sup>*</sup>	403 - 393 - 365 - 417	4.351,989	[M+Na]	94192	Absciscalcohol 11-glucoside	1,8382399
455.1968 <sup>*</sup>	437 - 385 - 315 - 329	4.551,959	[M+K]	58642	CPA(18:2) <sup>a</sup>	-1,9771707
779.3994 <sup>#</sup>	659 - 719 - 709 - 733	7.793,979	[M+K]	86383	Torvoside C	-1,9245625

HRMS biomarcadores eleitos pelo PLS-DA associados ao VIP score. Identificação baseada em espectrometria de massas in tandem e bancos de dados metabolômicos. MS/MS = Perfil de fragmentação iônica. M: Massa; K: potássio; Na: sódio; H: hidrogênio. CPA: ácido fosfatídico cíclico. MID<sup>a</sup> = METLIN ID; <sup>\*</sup> = faixa de massa de 100 a 700 m/z; <sup>#</sup> = faixa de massa de 700 a 1700 m/z. <sup>a</sup> = (número de carbono:ligação dupla)

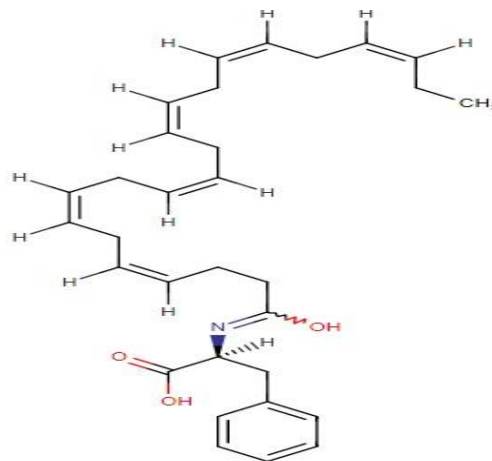
A identificação das moléculas selecionadas pelo PLS-DA na análise do soro dos grupos LP e LM está descrita a seguir.

### Moléculas identificadas no grupo LP

#### N-docosaehaenoylphenylalanine

Este marcador pertence à classe de compostos orgânicos denominados como fenilalanina e derivados. Estes compostos são moléculas que contêm fenilalanina ou um derivado gerado pela reação da fenilalanina no grupo amino ou no grupo carboxi ou da substituição de qualquer hidrogênio da glicina por um heteroátomo, pertencentes a e subclasse de N-acylamines (figura 4) (36).

Figura 4 - Estrutura química da N-docosaehaenoylphenylalanine.

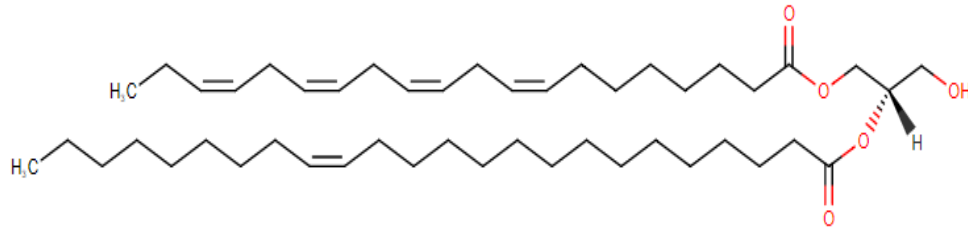


Fonte: (KIM et al., 2019).

#### DG(44:5)

Este marcador é um diglicerídeo formado por duas cadeias de ácidos graxos ligadas por meio de uma ligação covalente a uma molécula de glicerol através de ligações éster. Os diglicerídeos podem ter muitas combinações diferentes de ácidos graxos ligados nas posições C-1 e C-2. O DG(44:5) consiste em uma cadeia de ácido eicsoatetraenóico na posição C-1 e uma cadeia de ácido nervônico em a posição C-2 (figura 5) (32).

Figura 5 - Estrutura química da DG(44:5).

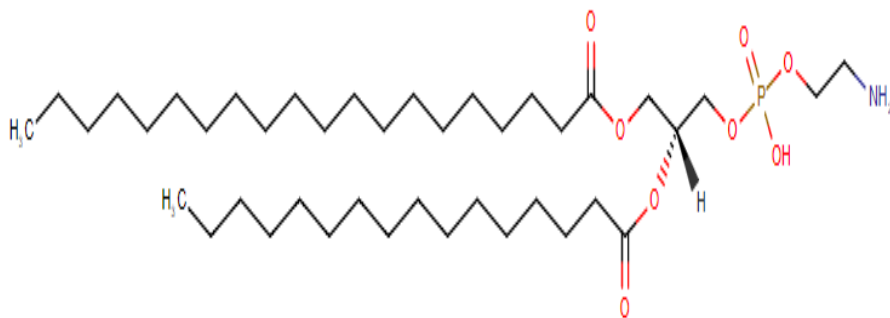


Fonte: (WISHART et al., 2018).

### PE(O-36:0)

É uma molécula pertencente a classe de fosfolipídeos, no qual são conhecidas as posições e a composição relativa de ácidos graxos individuais ou álcoois graxos, mas sua estrutura precisa é desconhecida (37). A PE é um dos principais fosfolípidos componentes da membrana celular, estando localizados, principalmente, no folheto interno da membrana plasmática (figura 6) (38).

Figura 6 - Estrutura química da PE(O-36:0).



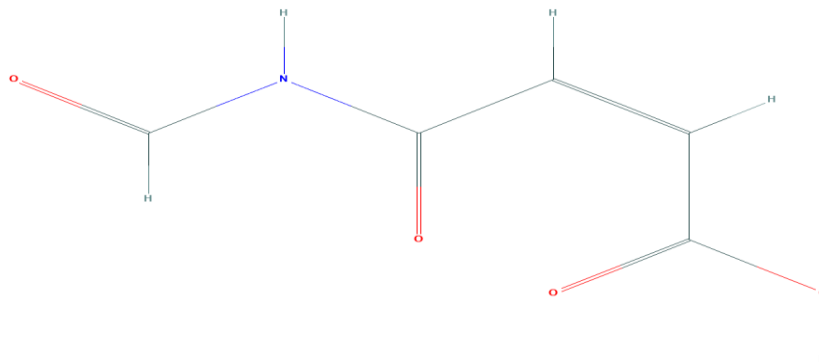
Fonte: (WISHART et al., 2018).

## Moléculas identificadas no grupo LM

### N-formylmaleamicacid

O N-formylmaleamicacid é um precursor no metabolismo da nicotinamida (vit. B3) e também está envolvido no metabolismo de microorganismos em diferentes ambientes (figura 7) (39,40).

Figura 7 - Estrutura química do N-formylmaleamicacid.

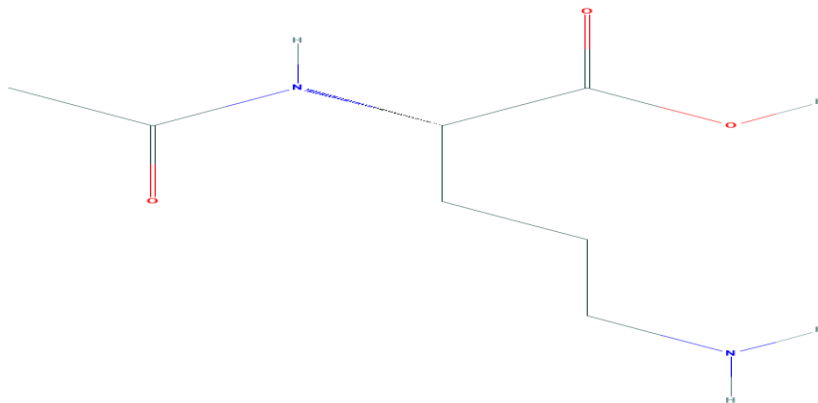


Fonte: (KIM et al., 2019).

### N2-Acetyl-L-ornithine

Esta molécula pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como N-acil-L-alfa-aminoácidos e é precursora na síntese de diversos aminoácidos, dentre eles a L-arginina (figura 8) (35,36).

Figura 8 - Estrutura química da N2-Acetyl-L-ornithine.

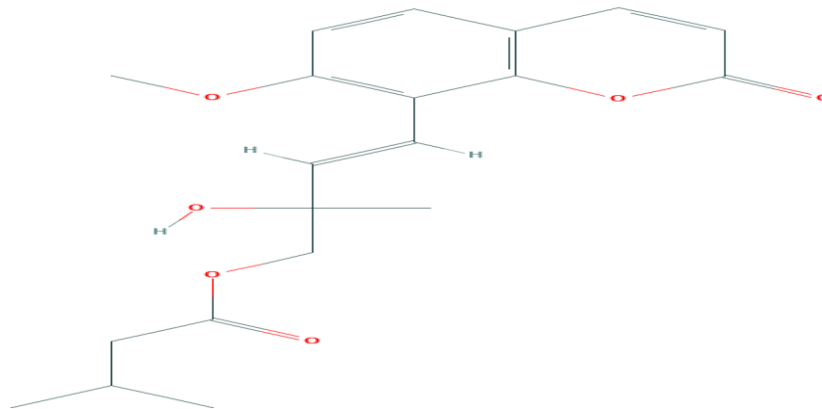


Fonte: (KIM et al., 2019).

### Casegravol isovalerate

Esta molécula pertence à classe de compostos aromáticos policíclicos contendo uma porção 1-benzopirano com um grupo cetona no átomo de carbono C2 (1-benzopirano-2-ona), denominados cumarinas e derivados (figura 9) (36).

Figura 9 - Estrutura química da Casegravolisovalerate.

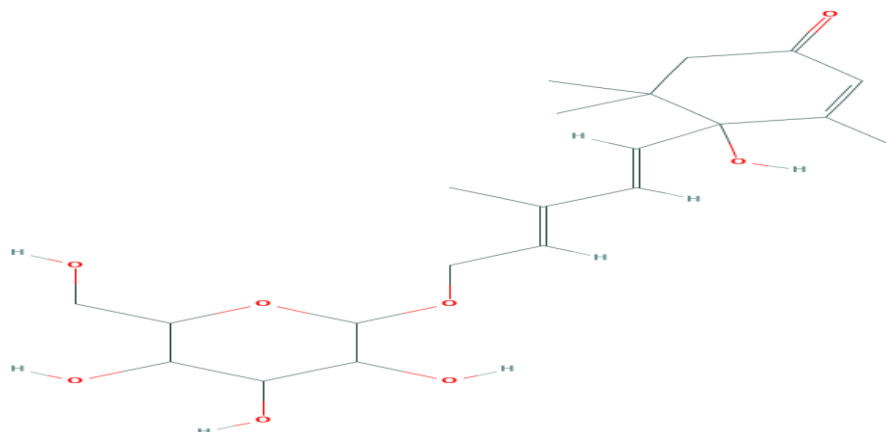


Fonte: (KIM et al., 2019).

### Abscisicalcohol 11-glucoside

Esta molécula pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como glicosídeos terpenos e é uma intermediário na biossíntese do ácido abscísico (ABA) (figura 10) (36,41).

Figura 10 - Estrutura química da Abscisicalcohol 11-glucoside.

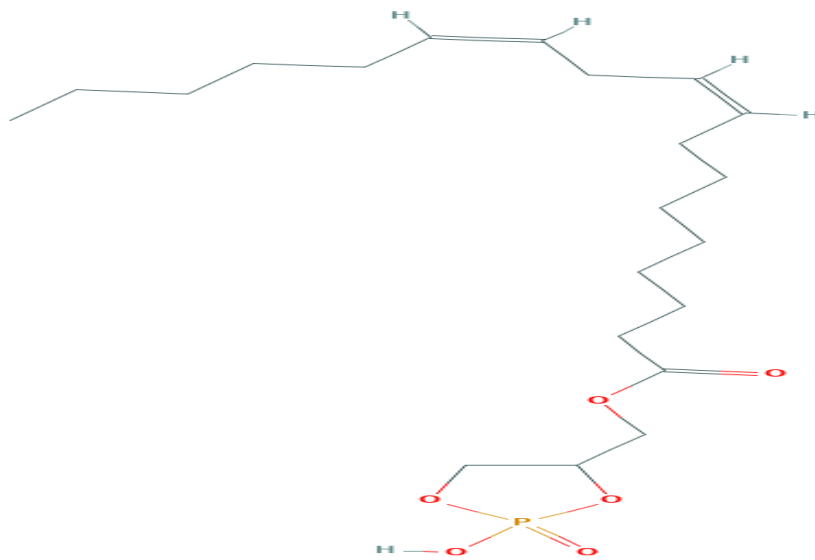


Fonte: (KIM et al., 2019).

## CPA(18:2)

Esta molécula pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como ácido fosfatídico cíclico (CPA), no qual o fosfato cíclico ocupa dois locais de substituição de glicerol, podendo apresentar diferentes combinações de ácidos graxos de diferentes comprimentos e saturação associados ao C-1(36). O CPA é um mediador fosfolipídico, o qual está presente em uma grande variedade de organismos, incluindo seres humanos (figura 11) (42).

Figura 11 - Estrutura química do CPA(18:2)

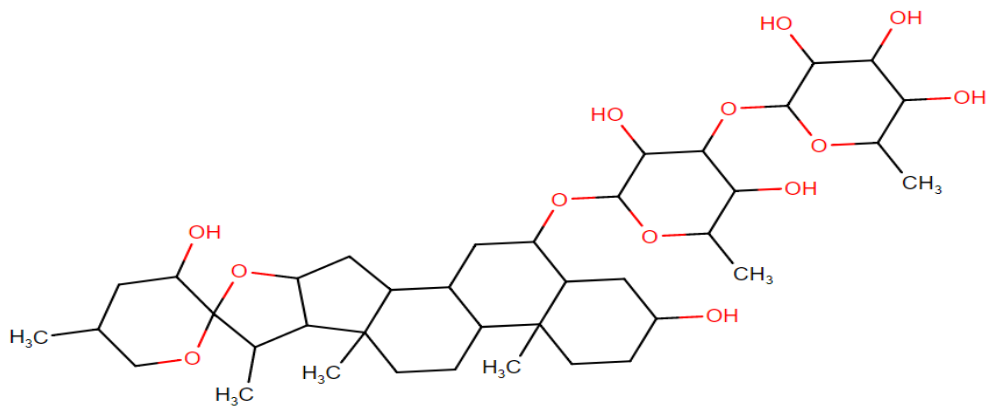


Fonte: (KIM et al., 2019).

## Torvoside C

O torvoside c é molécula encontrada em frutas, que pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como saponinas esteroidais (SE). São saponinas nas quais a porção aglicona é um esteroide (figura 12) (36).

Figura 12 - Estrutura química da Torvoside C



Fonte: (WISHART et al., 2018).

# DISCUSSÃO

Diversos estudos têm avaliado a influência da administração de componentes da laranja, como a naringenina e hesperidina, na matriz extracelular em diferentes modelos experimentais. Entretanto, todos esses estudos avaliaram apenas um componente do suco de forma isolada e em condições patológicas (21,22,23,24). Nesse contexto, torna-se relevante o objetivo do presente estudo, que foi avaliar a influência da ingestão do suco de laranja Pera (*Citrus sinensis*) e do suco de laranja Moro [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] na regulação da dinâmica e composição da matriz extracelular miocárdica de ratos saudáveis.

Em relação à avaliação da composição estrutural da MEC, examinamos a expressão do colágeno tipo 1, que representa 85% do colágeno em miocárdio saudável, sendo a principal proteína estrutural do coração (2,4). Os resultados obtidos por meio da técnica de western blot e coloração histológica por picrossirius red não mostraram alterações na expressão de colágeno na comparação entre os grupos.

Para avaliação de componentes relacionados à manutenção da MEC, examinamos a expressão dos inibidores de MMPs, TIMP-2 e 4 e a atividade e expressão de MMP-2 e -9, que são essenciais para o equilíbrio entre a produção e degradação da MEC (4). Os resultados obtidos por western blot não evidenciaram alterações na expressão de MMP-9 e TIMP-2 e 4, assim como não foi observado alterações na atividade de MMP-2, analisada pela técnica de zimografia.

Estes resultados podem ser parcialmente explicados por se tratar de um modelo experimental sem agressão miocárdica. Em situação fisiológica, a atividade de proteínas que regulam a composição da MEC, como os TIMPs e MMPs não se apresentam muito alteradas. Consequentemente, não há alterações significativas dos componentes estruturais da MEC, como o Colágeno tipo 1. Por conta das modificações da MEC em situações fisiológicas não ser tão intensa, torna-se mais difícil identificarmos alterações mais sutis. Se considerássemos modelo experimental com agressão miocárdica, esses resultados poderiam ser diferentes. Todavia, é importante ressaltar que o fato de não observarmos alterações na dinâmica e composição da MEC indica que a ingestão de ambos os sucos de laranja é segura em situações fisiológicas.

Adicionalmente, os resultados obtidos pela espectrometria de massas de alta resolução, realizada no soro dos animais, revelaram diferenças entre os metabólitos presentes nos grupos controle e tratados com suco de laranja Pera e Moro. Identificamos maior intensidade de metabólitos que são precursores de moléculas que se

relacionam com vias e processos biológicos que interferem com a MEC, como a inflamação e o equilíbrio redox nos grupos tratados com ambos os sucos de laranja. Também foi identificados metabólitos que atuam regulando o metabolismo e a atividade de moléculas, como as MMPs e os TIMPs, os quais participam na regulação da composição da MEC.

Como descrito anteriormente, 3 moléculas foram identificadas no soro dos animais do grupo LP que foram marcadores diferenciais em comparação ao grupo C: N-docosahexaenoylphenylalanine, DG(44:5) e PE(O-36:0).

A N-docosahexaenoylphenylalanine é um composto pertencente ao grupo de fenilalanina e derivados, sub classe das N-acylamines (32). As propriedades biológicas dessa moléculas ainda não estão elucidadas na literatura. No entanto, sabe-se que as N-acylamines são uma família de moléculas relacionadas a sinalização endógena que atuam na regulação da dor e da inflamação.

O processo inflamatório causa alterações na dinâmica e composição da MEC, como ativação de metaloproteinases, proliferação de fibroblastos e perda progressiva de miócitos por meio de apoptose. Nesse contexto, a molécula N-docosahexaenoylphenylalanine, sendo um membro da classe das N-acylamines, torna-se um importante alvo de estudo, a fim de verificar sua possível ação como fator protetivo dessas alterações na MEC subsequente a inflamação (43).

O DG(44:5), pertence ao grupo do diglicerídeos. Os diglicerídeos são precursores dos triglicerídeos, que são formados pela adição de um terceiro ácido graxo ao diglicerídeo por meio da ação da enzima diglicerídeoaciltransferase.(32). Não encontramos evidências da participação desta molécula em algum processo que esteja associado a MEC.

Interessantemente, este diglicerídeo foi identificado como marcador diferencial somente no grupo LP. Esse achado sugere que a ingestão do suco de laranja Pera pode ter interferido no metabolismo lipídico no grupo LP.

A PE(O-36:0) é uma molécula que pertence ao grupo do fosfolipídeos, sendo um dos principais componentes da membrana celular (37,38). Em estudo *in vitro* realizado com células mutantes com redução de PE, observou-se interrupção do crescimento celular no processo da citocinese, demonstrando que essa molécula desempenha um papel crucial no processo de divisão celular (38). Adicionalmente, em um outro estudo *in vitro* também foi observado que a PE é mobilizada do folheto interno para o folheto externo da bicamada lipídica da membrana plasmática nas

fases iniciais da apoptose (44). Podemos observar que a PE desempenha um papel fundamental no ciclo celular. No entanto, não encontramos evidências de sua participação direta na modulação na composição e dinâmica da MEC.

Já no grupo LM, foram identificadas 5 moléculas, que foram marcadores diferenciais em comparação ao grupo C: N-formylmaleamicacid, N2-Acetyl-L-ornithine, Casegravolisovalerate, Absciscalcohol11-glucoside, CPA(18:2) e Torvoside C.

A N-formylmaleamicacid é precursor na síntese da nicotinamida ou niacina (vit. B3). A nicotinamida tem uma importante participação em diversos processos fisiológicos, como a regulação da inflamação e sinalização celular, além de ser essencial para a síntese das enzimas NAD<sup>+</sup>/ NADH e NADP<sup>+</sup>/ NADPH, que atuam no metabolismo energético das células e na regulação do estado redox (39,40,45). O aumento do estresse oxidativo desempenha um importante papel na ativação das meloproteinases da MEC.

Nesse contexto, o aumento da intensidade do N-formylmaleamicacid, como precursor da niacina, poderia constituir um possível alvo de estudo dos efeitos antioxidantes do suco de laranja, especialmente em modelos experimentais que envolvam remodelação cardíaca, como cardiotoxicidade induzida por quimioterápicos (33) e miocardiopatia induzida pela exposição à fumaça do cigarro (32), em que há aumento da ativação de MMP conseqüente ao aumento do estresse oxidativo.

A N2-Acetyl-L-ornithine, é uma molécula precursora na biossíntese do aminoácido L-arginina (39,40). A L-arginina é um aminoácido essencial, e sua suplementação tem sido realizada em algumas situações clínicas, como na encefalopatia hepática na cirrose, além de ser amplamente estudada em outras situações patológicas por ser precursor na síntese de óxido nítrico (NO) (46).

O NO é um radical livre, que possui um papel essencial como fator de proteção vascular por meio da manutenção do tônus vascular, regulação da pressão sanguínea e prevenção da agregação plaquetária no vasos, além de atuar como mediador citotóxico de células imunes efectoras, agindo na destruição de patógenos e células tumorais e de desempenhar a função de sinalizador e mediador em diversos processos fisiológicos. Entretanto, em situações de estresse oxidativo, o NO é potencialmente tóxico (47).

Interessantemente, O'Sullivan et al., apresentam em sua revisão diversos estudos que têm evidenciado a participação do NO na modulação da expressão e atividade da MMP-9. No entanto, o resultados destes estudo são conflitantes, uma vez

que o NO parece atuar tanto na inibição quanto na ativação da MMP-9 (48). Nesse contexto, sabendo que a N<sup>2</sup>-Acetyl-L-ornithine pode ser metabolizada em NO, o qual regula a atividade da MMP-9, acredita-se que o aumento dessa molécula identificada no grupo LM, poderia interferir na dinâmica e composição da MEC.

O Casegravol isovalerate é uma molécula da classe das cumarinas, que são naturalmente encontrada em plantas, inclusive em cítricos (32,43). As cumarinas são moléculas que pertencem à família das benzopironas, naturalmente derivadas de plantas, especialmente, em frutas cítricas, entretanto, também podem ser obtidas sinteticamente. Sua utilização tem sido empregada em terapias para diversas patologias, devido a ampla variedade de atividades biológicas, como fator anticoagulante, antitumoral, antifúngico e antioxidante (36,49).

Deng e colaboradores, desenvolveram um novo composto derivado de cumarina, o qual foi testado em modelos *in vitro* e *in vivo* de fibrose pulmonar. A administração do composto no modelo *in vitro*, foi capaz de diminuir a expressão proteica induzida pelo TGF-beta de COL1A1,  $\alpha$ -SMA e p-Smad3. Já no modelo *in vivo* observou-se diminuição do infiltrado inflamatório, que também pode estar associado a inibição da via do TGF-beta e atividade anti-inflamatória do composto (50).

Adicionalmente, foi observado diminuição da expressão de colágeno 1 e Fibronectina e impedimento da via de sinalização do TGF-beta pela angiotensina II no modelo experimental de remodelamento da matriz extracelular (MEC) induzida por angiotensina II em cultura celular primária de fibroblastos cardíacos de ratos tratadas com esoparona, cumarina presente em diversos cítricos, incluindo uma grande variedade de laranjas (51–53).

Diante do exposto, observa-se que há evidências que os compostos pertencentes a classe das cumarinas e derivados, como o Casegravol isovalerate, podem inibir processos biológicos que culminam em alterações na dinâmica e composição da MEC.

O Absciscicalcohol 11-glucoside é um intermediário da biossíntese do ácido abscísico (ABA) (36,41). É um fito-hormônio que desempenha importantes funções nos processos fisiológicos de plantas, como a germinação de sementes, desenvolvimento de raízes e ativação de mecanismos de tolerância ao estresse abiótico. Além disso, este fito-hormônio também é responsável pela síntese de flavonoides em frutos de diversas variedades, incluindo as antocianinas (54–57).

Nesse contexto, o aumento do Absciscicalcohol 11-glucoside no grupo LP pode ser atribuído a algum processo fisiológico ocorrido na laranja Moro que culminou no aumento da via de síntese do ABA.

Apesar de termos encontrado algumas evidências da ação fisiológica do ABA em mamíferos, não encontramos estudos específicos sobre o Absciscicalcohol 11-glucoside (58,59). Sendo assim, a ação desta molécula em algum processo fisiológico que possa interferir na composição e dinâmica da MEC ainda permanece desconhecido.

O CPA(18:2), pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como ácido fosfatídico cíclico (CPA), o qual está presente em uma grande variedade de organismos, incluindo seres humanos (42). O CPA atua em diversas funções biológicas, incluindo regulação antimitogênica do ciclo celular, inibição da invasão de células tumorais e metástases e regulação da diferenciação e sobrevivência de células neuronais (42,60,61). Estudos têm evidenciado que o CPA induz a síntese de ácido hialurônico em modelos de estudos *in vivo* e *in vitro* (62,63).

Não encontramos evidências da participação direta do CPA na modulação da matriz extracelular cardíaca. Contudo, é importante ressaltar que o ácido hialurônico é um dos principais componentes da matriz extracelular dos vertebrados, estando presente nos tecidos conjuntivos, nos olhos, nas articulações e nas válvulas cardíacas, além de desempenhar um papel fundamental na manutenção no amortecimento e na lubrificação do corpo (64). Adicionalmente, existe evidências que o ácido hialurônico é capaz de modular, por meio de receptores específicos, a inflamação, migração celular e angiogênese, que são as principais fases do processo de cicatrização (65). Portanto, acreditamos que o aumento da intensidade de CPA, como um modulador da inflamação e da síntese de ácido hialurônico, pode interferir na matrix extracelular miocárdica.

O torvoside c é molécula encontrada em frutas, que pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como saponinas esteroidais (SE) (36). As saponinas são substâncias encontradas em uma variedade de plantas. São substâncias provenientes do metabolismo secundário das plantas superiores, relacionados, principalmente, com o sistema de defesa contra agentes bióticos (66).

Esta molécula tem sido amplamente estudada devido a suas variadas propriedades terapêuticas, como agente antimicrobiano, imunomodulador, anti-oxidante e anti-inflamatório (67). Adicionalmente, estudos tem evidenciado a capacidade das

SE de modular a matriz extracelular em diferentes modelos de estudo. Em modelo experimental de nefropatia diabética em ratos tratados cronicamente com SE, foi observado diminuição de colágeno-1 e fibronectina (68).

Em estudo *in vitro* com células de câncer de próstata foi observada inibição da expressão e da atividade de MMP-2 e 9 e do fator de transcrição nuclear kappa B (NFKb), além do aumento da atividade de TIMP-2 com a administração de SE (69). Em modelo experimental de cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, os animais tratados com SE apresentaram diminuição da expressão de TNF- $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6), interleucina-1-beta (IL-1b), além de diminuir a atividade de proteína quinase ativada por mitógeno 38 (p38 MAPK), suprimindo a resposta inflamatória (70).

Considerando o exposto, podemos observar que as saponinas esteroidais são substâncias promissoras no tratamento de patologias que envolvem processos que culminam em alterações da MEC. Sendo assim, o torvoside c, se torna um importante alvo de estudo em modelos de avaliação de alterações na MEC.

Apesar de termos observado, por meio da análise de espectrometria de massa de alta resolução, que o suco de laranja Moro provocou maior intensidade de maior número de moléculas que podem estar relacionadas com alterações na MEC, isso não se relacionou com alterações na expressão e atividade de componentes da matriz extracelular miocárdica. Adicionalmente, é importante ressaltar que a análise de espectrometria de massa de alta resolução foi realizada no soro dos animais. Sendo assim, as moléculas identificadas podem ser proveniente de diferentes sítios que não só o tecido cardíaco.

A identificação desses metabólitos no soro de animais saudáveis que ingeriram suco de laranja constitui resultado inédito, uma vez que não conseguimos identificar nenhum estudo que tenha avaliado a metabolômica após ingestão de suco de laranja. Esses achados podem contribuir para maior compreensão dos efeitos benéficos da administração do suco de laranja já demonstrados em estudos que envolvem situações patológicas (18,20,21,27) e também seus efeitos benéficos para a saúde, mesmo em situações fisiológicas.

**CONCLUSÃO**

A ingestão de suco de laranja Pera e do suco de laranja Moro não causaram alterações na dinâmica e na composição da matriz extracelular miocárdica em corações saudáveis, mostrando que a ingestão do suco de laranja é segura. Adicionalmente, a ingestão de ambos os sucos induziu alterações nos metabólitos presentes no soro desses animais que se relacionam com inflamação, estresse oxidativo e composição e regulação da MEC, em maior número no soro dos animais que ingeriram suco de laranja Moro. A identificação desses compostos pode contribuir para o melhor entendimento dos efeitos benéficos do suco de laranja para a saúde.

## REFERÊNCIAS

1. Pogontke C, Guadix JA, Ruiz-Villalba A, Pérez-Pomares JM. Development of the Myocardial Interstitium. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019;302:58-68.
2. Frangogiannis NG. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circ Res*. 2019;125:117–46.
3. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:4–27.
4. Li L, Zhao Q, Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol*. 2018;68–69:490–506.
5. Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med*. 2019;65:70–99.
6. Valiente-Alandi I, Schafer AE, Blaxall BC. Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;91:228–37.
7. Mooney A, Jackson K, Bacon R, Streuli C, Edwards G, Bassuk J, et al. Type IV collagen and laminin regulate glomerular mesangial cell susceptibility to apoptosis via beta(1) integrin-mediated survival signals. *Am J Pathol*. 1999;155:599–606.
8. Han SW, Roman J. Fibronectin induces cell proliferation and inhibits apoptosis in human bronchial epithelial cells: pro-oncogenic effects mediated by PI3-kinase and NF-kappa B. *Oncogene*. 2006;25:4341–9.
9. Bowers SLK, Banerjee I, Baudino TA. The extracellular matrix: At the center of it all. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48:474-82.
10. DeCoux A, Lindsey ML, Villarreal F, Garcia RA, Schulz R. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;77:64–72.
11. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg J-O. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J*. 2011;278:28–45.
12. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 2007;87:1285–342.
13. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15:786-801.
14. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol*. 2016; 106:62-9.
15. Riaz S, Zeidan A, Mraiche F. Myocardial proteases and cardiac remodeling. *J Cell Physiol*. 2017;232:3244–50.
16. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO. UNICAMP/NEPA. 2011;4:161.

17. Liobikas J, Skemiene K, Trumbeckaite S, Borutaite V. Anthocyanins in cardioprotection: A path through mitochondria. *Pharmacol Res.* 2016;113:808–15.
18. Barreca D, Bellocco E, Leuzzi U, Gattuso G. First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chem.* 2014;149:244–52.
19. Grosso G, Galvano F, Mistretta A, Marventano S, Nolfo F, Calabrese G, et al. Red orange: Experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:157240.
20. Coelho RCLA, Hermsdorff HHM, Bressan J. Anti-inflammatory properties of orange juice: possible favorable molecular and metabolic effects. *Plant Foods Hum Nutr.* 2013;68:1–10.
21. Dourado GKZS, Cesar TB. Investigation of cytokines, oxidative stress, metabolic, and inflammatory biomarkers after orange juice consumption by normal and overweight subjects. *Food Nutr Res.* 2015;59:28147.
22. Chang HL, Chang YM, Lai SC, Chen KM, Wang KC, Chiu TT et al. Naringenin inhibits migration of lung cancer cells via the inhibition of matrix metalloproteinases-2 and -9. *Exp Ther Med.* 2017;13:739-744.
23. Chtourou Y, Fetoui H, Jemai R, Ben Slima A, Makni M, Gdoura R. Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B pathway. *Eur J Pharmacol.* 2015;746:96–105.
24. Kamaraj S, Anandakumar P, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T. Modulatory effect of hesperidin on benzo(a)pyrene induced experimental lung carcinogenesis with reference to COX-2, MMP-2 and MMP-9. *Eur J Pharmacol.* 2010;649:320–7.
25. Lee K-H, Yeh M-H, Kao S-T, Hung C-M, Liu C-J, Huang Y-Y, et al. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor- $\kappa$ B in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol Lett.* 2010;194:42–9.
26. Barreca D, Bellocco E, Leuzzi U, Gattuso G. First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chem.* 2014;149:244–52.
27. Ribeiro, APD. Influência do suco da laranja Pera (*Citrus sinensis*) e da laranja Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu; 2019. p. 54.
28. Canuto G, Costa JL, Cruz P, Souza A, Faccio A, Klassen A, et al. Metabolômica: Definições, Estado-da-arte e Aplicações Representativas. *Quim Nova.* 2017;1:75-91.

29. Mapelli-Brahm P, Stinco CM, Rodrigo MJ, Zacarías L, Meléndez-Martínez AJ. Impact of thermal treatments on the bioaccessibility of phytoene and phytofluene in relation to changes in the microstructure and size of orange juice particles. *J Funct Foods*. 2018;46:38–47.
30. Pagan LU, Damatto RL, Gomes MJ, Lima ARR, Cezar MDM, Damatto FC, et al. Low-intensity aerobic exercise improves cardiac remodelling of adult spontaneously hypertensive rats. *J Cell Mol Med*. 2019;23:6504–7.
31. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, et al. Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity is Associated with Matrix Metalloproteinase-2 Alterations in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35:1924–33.
32. Lustosa BB, Polegato B, Minicucci M, Rafacho B, Santos PP, Fernandes AA, et al. Green tea (*Cammellia sinensis*) attenuates ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2016;225:147–53.
33. Mathias LMBS, Alegre PHC, dos Santos I de OF, Bachiega T, Figueiredo AM, Chiuso-Minicucci F, et al. Euterpe oleracea Mart. (Açaí) Supplementation Attenuates Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53:388–99.
34. Melo CFOR, Delafiori J, de Oliveira DN, Guerreiro TM, Esteves CZ, Lima E de O, et al. Serum metabolic alterations upon ZIKA infection. *Front Microbiol*. 2017;8:2373.
35. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:251-7.
36. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vázquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46:608–17.
37. SwissLipids — SLM:000098737. Available from: <https://www.swisslipids.org/#/entity/SLM:000098737/?classification>
38. Emoto K, Umeda M. An Essential Role for a Membrane Lipid in Cytokinesis. *J Cell Biol*. 2000;149:1215–24.
39. Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:27–30.
40. Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, Morishima K, Tanabe M. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:590–5.
41. Rock CD, Heath TG, Gage DA, Zeevaart JAD. Abscisic Alcohol Is an Intermediate in Abscisic Acid Biosynthesis in a Shunt Pathway from Abscisic Aldehyde. *Plant Physiol*. 1991;97:670–6.
42. Fujiwara Y. Cyclic phosphatidic acid — A unique bioactive phospholipid. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2008;1781:519–24.

43. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106:62-9.
44. Emoto K, Toyama-Sorimachi N, Karasuyama H, Inoue K, Umeda M. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp Cell Res.* 1997 May 1;232(2):430–4.
45. Maria CABD, Moreira RFA. A Intrigante Bioquímica da Niacina-Uma Revisão Crítica. *Quim. Nova.* 2011;34: 1739-1752.
46. Puga, GM; Novais, IDP; Zanesco A. Therapeutic effects of L-arginine supplementation on the cardiovascular and endocrine-metabolic diseases. *Arq Med.* 2011;25:107–14.
47. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho M das G. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol e Med Lab.* 2003;39:343-350.
48. O’Sullivan S, Medina C, Ledwidge M, Radomski MW, Gilmer JF. Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: Biological and pharmacological significance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1843:603–17.
49. Detsi A, Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). *Expert Opin Ther Pat.* 2017;27:1201–26.
50. Deng D, Pei H, Lan T, Zhu J, Tang M, Xue L, et al. Synthesis and discovery of new compounds bearing coumarin scaffold for the treatment of pulmonary fibrosis. *Eur J Med Chem.* 2019;111790.
51. Fu B, Su Y, Ma X, Mu C, Yu F. Scoparone attenuates angiotensin II-induced extracellular matrix remodeling in cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci.* 2018;137:110–5.
52. Mohanlall V, Odhav B. Biocontrol of Aflatoxins B 1 ,B 2 ,G 1 ,G 2 , and Fumonisin B 1 with 6,7-Dimethoxycoumarin, a Phytoalexin from *Citrus sinensis*. *J Food Prot.* 2006;69:2224–9
53. Ference CM, Manthey J, Narciso J, Jones JB, Baldwin E. Detection of phenylpropanoids in citrus leaves produced in response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Phytopathology.* 2019;PHYTO-06-19-0219-R.
54. Hauser F, Li Z, Waadt R, Schroeder JI. SnapShot: Abscisic Acid Signaling. *Cell.* 2017;171:1708-1708.
55. Melo HC de, Rodrigues FJ, Queirós SF, Portes TDA. A aplicação exógena foliar de ácido abscísico desencadeia mecanismos de tolerância à deficiência hídrica em seringueira. *Ciência Florest.* 2019;29:40.
56. Katayama-Ikegami A, Sakamoto T, Shibuya K, Katayama T, Gao-Takai M. Effects of Abscisic Acid Treatment on Berry Coloration and Expression of Flavonoid Biosynthesis Genes in Grape. *Am J Plant Sci.* 2016;07:1325–36.

57. Ferrero M, Pagliarani C, Novák O, Ferrandino A, Cardinale F, Visentin I, et al. Exogenous strigolactone interacts with abscisic acid-mediated accumulation of anthocyanins in grapevine berries. *J Exp Bot*. 2018;69:2391–401.
58. Bruzzone S, Moreschi I, Usai C, Guida L, Damonte G, Salis A, et al. Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5759–64.
59. Magnone M, Leoncini G, Vigliarolo T, Emionite L, Sturla L, Zocchi E, et al. Chronic Intake of Micrograms of Abscisic Acid Improves Glycemia and Lipidemia in a Human Study and in High-Glucose Fed Mice. *Nutrients*. 2018;10:1495.
60. Yamamoto S, Yamashina K, Ishikawa M, Gotoh M, Yagishita S, Iwasa K, et al. Protective and therapeutic role of 2-carba-cyclic phosphatidic acid in demyelinating disease. *J Neuroinflammation*. 2017;14:142.
61. Murakami-Murofushi K, Uchiyama A, Fujiwara Y, Kobayashi T, Kobayashi S, Mukai M, et al. Biological functions of a novel lipid mediator, cyclic phosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:1–7.
62. Maeda-Sano K, Gotoh M, Morohoshi T, Someya T, Murofushi H, Murakami-Murofushi K. Cyclic phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce hyaluronic acid synthesis via CREB transcription factor regulation in human skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2014;1841:1256–63.
63. Gotoh M, Nagano A, Tsukahara R, Murofushi H, Morohoshi T, Otsuka K, et al. Cyclic Phosphatidic Acid Relieves Osteoarthritis Symptoms. *Mol Pain*. 2014;10:52.
64. Sudha PN, Rose MH. Beneficial effects of hyaluronic acid. *Adv Food Nutr Res*. 2014;72:137–76.
65. Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds a Compend Clin Res Pract*. 2016;28:78–88.
66. Wina E, Muetzel S, Becker K. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production A Review. *J Agric Food Chem*. 2005;53:8093–105.
67. Upadhyay S, Jeena GS, Shikha, Shukla RK. Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and in vitro production. *Planta*. 2018;248:519–44.
68. Liu Y-W, Hao Y-C, Chen Y-J, Yin S-Y, Zhang M-Y, Kong L, et al. Protective effects of sarsasapogenin against early stage of diabetic nephropathy in rats. *Phyther Res*. 2018;32:1574–82.
69. Chen P-S, Shih Y-W, Huang H-C, Cheng H-W. Diosgenin, a Steroidal Saponin, Inhibits Migration and Invasion of Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Reducing Matrix Metalloproteinases Expression. Means RE, editor. *PLoS One*. 2011;6:e20164.

70. Wu Z, Zhao X, Miyamoto A, Zhao S, Liu C, Zheng W, et al. Effects of steroidal saponins extract from *Ophiopogon japonicus* root ameliorates doxorubicin-induced chronic heart failure by inhibiting oxidative stress and inflammatory response. *Pharm Biol.* 2019;57:176–83.