

LARISSA FROEDE BRITO

EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE MANGA UBÁ (*MANGÍFERA INDICA* L) E DA MANGIFERINA NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CB₁, PPAR γ E ADIPOCINAS EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

B862e
2013 Brito, Larissa Froede, 1982-
Efeito do extrato das folhas de manga Ubá
(*Mangifera indica* L) e da mangiferina na modulação da
expressão dos receptores CB₁, PPAR γ e adipocinas em ratos
alimentados com dieta de cafeteria / Larissa Froede Brito. –
Viçosa, MG, 2013.
x, 100f. : il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Humberto de Queiroz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Antioxidantes. 2. Manga. 3. Síndrome metabólica.
4. Ensaio biológico. 5. *Mangifera indica*. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 572

LARISSA FROEDE BRITO

EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE MANGA UBÁ (*MANGÍFERA INDICA* L) E DA MANGIFERINA NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CB₁, PPAR γ E ADIPOCINAS EM RATOS ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2013.

Sônia Machado Rocha Ribeiro
(Coorientadora)

João Paulo Viana Leite

Josefina Bressan

Lirlândia Pires de Sousa

José Humberto de Queiroz
(Orientador)

O caminho que eu escolhi é o do amor. Não importam as dores, as angústias, nem as decepções que vou ter que encarar. Escolhi ser verdadeira. No meu caminho, o abraço é apertado, o aperto de mão é sincero. Por isso, não estranhe a minha maneira de sorrir e de te desejar tanto bem. Eu sou aquela pessoa que acredita no bem, que vive no bem e que anseia o bem. É assim que eu enxergo a vida e é assim que eu acredito que vale a pena viver."

(Clarice Lispector)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

A minha mãe, Vania, pela educação, dedicação, confiança, incentivo e amor incondicional.

As minhas irmãs, Karla e Thaise, pela amizade, apoio e presença nos momentos difíceis.

Ao meu cunhado Thiago pelo carinho e apoio sempre.

A minha sobrinha Antonia por dar um novo sentido a minha vida.

Ao meu namorado Douglas pelo carinho e compreensão.

A minha cadela e companheira Aninha (“meu pitoco bunito”), que mesmo sem entender o contexto que me encontrava, não hesitava nas suas demonstrações de carinho e afeto nos momentos de aflição.

Ao meu querido orientador, professor José Humberto de Queiroz, pela dedicada orientação, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo companheirismo e pela amizade construída e cultivada durante esses anos de convivência. Carinho especial extensivo a sua esposa, professora Maria Eliana Lopes de Queiroz que tornou essa convivência e amizade ainda mais agradável.

A professora Maria do Carmo Peluzio e ao professor Luciano Fietto pela co-orientação e sugestões tão pertinentes nesse trabalho.

A Professora Sônia Ribeiro, pela coorientação, sugestões, amizade e ainda por aceitar compor a banca contribuindo ainda mais para o enriquecimento desse trabalho.

Ao Professor João Paulo Viana Leite pelas sugestões e orientação tão precisa na obtenção do extrato e do isolamento da mangiferina. E ainda por fazer parte da banca acrescentando mais conhecimento ao estudo.

As professoras Lirlândia Pires de Sousa (UFMG) e Josefina Bressan (UFV) por aceitarem participar da banca de defesa desse trabalho.

Aos demais professores do DBB pela troca de experiências e convivência, em especial ao professor Cláudio Mafra e a professora Juliana Ramos.

Ao Eduardo Monteiro, Priscila e demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela amizade e convivência tão saudáveis. Du, não lia seus emails até o final porque assim poderia ir na secretaria bater papo com você...Rsrs...

Aos amigos do laboratório Filipe, Fernando, Bruna, Wilton, Samuel, Hugo, Mônica, Gabi, Angélica e Paula. E é claro que não poderia deixar de agradecer as amigas que ultrapassaram a convivência de laboratório, Izabela e Renata pela amizade e cumplicidade durante todos esses anos. Amoocêisdimaidsdacontasô....

A Aloirta pela amizade e imensa ajuda na obtenção do extrato.

Aos amigos Monikete, Pato, Claudinha, Bill, Higo, Raquel, Dick, Hugo, Yasmin, Pablo, Valéria, Brunão, Baiana, Dani, Lívia, Ritinha, Lalá, Amanda, Carolzinha, Paola, Marcelinha, Carol, Taty, Camila, Eduardo, Edvaldo, Paty, Francine, Rafael, Mary Helen e outros que eventualmente esqueci de citar, mas não menos importante, pela convivência, amizade cultivada e encontros regados a gargalhadas.

Não posso deixar de agradecer ainda a hospedagem nesse momento final na casa Renata e na casa do Pato e da Claudinha....Obrigada por me receberem tão bem e desculpa pela visita de “Santa Izabel” ...Ah...e “brigadão” pelos lanches, almoço e jantar tão gostosos que alimentavam minhas idéias....kkkkkkk....

A todos que de alguma forma conviveram e contribuíram, direta ou indiretamente, para realização desse sonho. Seja com trabalho, seja com amizade.

A Fapemig pelo apoio financeiro e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

MUITO OBRIGADA!!!

APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada no formato de artigos científicos e organizada da seguinte forma:

Resumo e abstract. Em seqüência, quatro artigos científicos.

Artigo 1 – Artigo de revisão aceito para publicação na Revista Brasileira de Plantas Mediciniais com título “Produtos naturais ativadores de PPAR e marcadores associados ao processo inflamatório na Síndrome Metabólica”.

Artigo 2 – Artigo de revisão submetido à Revista Nutrire com título “Sistema Endocanabinóide e Receptores PPARs nas desordens fisiológicas relacionadas à Síndrome Metabólica”.

Artigo 3 – Artigo original submetido à Revista Nutrition com título “Extrato de *Mangifera indica* e Mangiferina modulam receptores e marcadores de risco metabólico no tecido adiposo de animais”.

Artigo 4 – Artigo original que será submetido à Revista Obesity com título “O extrato da Folha de Manga e a Mangiferina modulam a expressão dos receptores CB₁, PPAR γ e adipocinas no tecido adiposo”.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT	X
ARTIGO 1: PRODUTOS NATURAIS ATIVADORES DE PPAR E MARCADORES ASSOCIADOS AO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA SÍNDROME METABÓLICA	1
1. Introdução.....	3
2. Síndrome metabólica e inflamação.....	3
3. Interesse clínico por ligantes de PPARs.....	7
4. Ligantes para PPARs de origem natural.....	9
5. Considerações Finais	11
6. Referências bibliográficas	12
ARTIGO 2: SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E RECEPTORES PPARS NAS DESORDENS FISIOLÓGICAS RELACIONADAS À SÍNDROME METABÓLICA	21
Resumo	22
Abstract.....	22
1. Introdução.....	23
2. Síndrome Metabólica.....	24
3. Função fisiopatológica do tecido adiposo	26
4. Sistema Endocanabinóide.....	27
5. Receptores proliferadores peroxissomais (PPARs).....	32
6. Canabinóides e PPAR γ	33
7. Mecanismos de interação entre os canabinóides e PPARs.....	35
8. Considerações Finais	36
9. Referências Bibliográficas.....	36
ARTIGO 3: EXTRATO DE <i>MANGIFERA INDICA</i> E MANGIFERINA MODULAM RECEPTORES E MARCADORES DE RISCO METABÓLICO NO TECIDO ADIPOSEO DE ANIMAIS.....	43
Resumo	44
Abstract.....	45

1. Introdução.....	45
2. Materiais e Métodos	47
2.1. Obtenção do extrato e da Mangiferina	47
2.1.1. Análise da mangiferina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	48
2.2. Ensaio Biológico.....	49
2.3. Análises da expressão gênica dos receptores CB ₁ e PPAR γ , adiponectina, leptina e resistina no tecido adiposo por RT- PCR.....	51
2.4. Análises estatísticas	51
3. Resultados.....	52
3.1. Isolamento da mangiferina e confirmação estrutural	52
3.2. Ganho de Peso e evolução ponderal	53
3.3. Análises da expressão gênica dos receptores CB ₁ e PPAR γ , adiponectina, leptina e resistina no tecido adiposo por RT- PCR.....	53
4. Discussão	59
5. Conclusão	61
6. Referências Bibliográficas.....	61

ARTIGO 4: O EXTRATO DA FOLHA DE MANGA E A MANGIFERINA MODULAM A EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CB₁, PPAR γ E DE ADIPOCINAS NO TECIDO ADIPOSEO 66

Resumo	67
Abstract.....	68
1. Introdução.....	69
2. Materias e Métodos	70
2.1. Obtenção do extrato da folha de manga e da mangiferina	70
2.2. Ensaio Biológico.....	70
2.2.1. Animais e tratamentos	70
2.2.2. Desenho experimental	71
2.2.3. Análises bioquímicas séricas	72
2.3. Análises da expressão gênica dos receptores CB ₁ e PPAR γ , adiponectina, leptina e resistina no tecido adiposo por RT- PCR.....	73
2.4. Análises estatísticas	73
3. Resultados.....	74
3.1. Ganho de peso e evolução ponderal	74
3.2. Parâmetros Bioquímicos.....	75
3.3. Análises da expressão gênica dos receptores CB ₁ e PPAR γ , adiponectina, leptina e resistina no tecido adiposo por RT- PCR.....	76

4. Discussão	83
5. Conclusão	89
6. Referências Bibliográficas:.....	89
ANEXO 1.....	97
ANEXO 2.....	98

RESUMO

BRITO, Larissa Froede, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Efeito do extrato das folhas de manga Ubá (*Mangifera indica L*) e da mangiferina na modulação da expressão dos receptores CB₁, PPAR γ e adipocinas em ratos alimentados com dieta de cafeteria.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Sônia Machado Rocha Ribeiro, Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Luciano Gomes Fietto.

A Obesidade é uma doença multifatorial fortemente associada com a adipogênese, inflamação e síndrome metabólica. A distribuição da gordura corporal é um fator relevante, e especificamente os tecidos adiposos, visceral e subcutâneo, parecem ser o elo entre o aumento de peso, a adipogênese, a inflamação e os riscos metabólicos. Os adipócitos estão envolvidos na regulação do balanço energético e seu metabolismo pode ser modulado por hormônios, citocinas e nutrientes, entre eles a adiponectina, a leptina e a resistina. Os receptores CB₁ e PPAR γ estão envolvidos na regulação da produção de adipócitos, na sensibilidade à insulina e no processo inflamatório. A ativação do PPAR γ desencadeia atividades anti-inflamatórias em vários tipos de células pela modulação da expressão de genes próinflamatórios. Já os receptores CB₁ estão diretamente relacionados à obesidade e outras desordens metabólicas, sendo que, em determinadas situações comportam-se como próinflamatórios e em outras como anti-inflamatórios. O extrato da folha de manga e a mangiferina (principal composto bioativo isolado do extrato), possuem propriedades farmacológicas antioxidante, anti-inflamatória, antiadipogênica, dentre outras. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do extrato da folha de manga e da mangiferina isolada o mesmo, a profilaxia e o tratamento na adipogênese, por meio da evolução ponderal, parâmetros bioquímicos e expressão gênica dos receptores CB₁, PPAR γ e das adipocinas adiponectina, resistina e leptina no tecido adiposo de ratos alimentados com dieta de cafeteria. O extrato da folha de manga e a mangiferina foram administrados nos animais, por gavagem, na dose de 250mg/kg e 40mg/kg respectivamente. Antes do início dos experimentos os animais ficaram em adaptação por 8 dias. O estudo foi dividido em dois tempos: profilaxia e tratamento. Na profilaxia os animais receberam a dieta de cafeteria, o extrato da folha de manga e a mangiferina juntos por 8 dias. No período de tratamento, os animais receberam somente dieta de cafeteria por 8 dias para estimular a adipogênese e em seguida tratados com o extrato da folha de manga, a mangiferina e os antagonistas dos receptores CB₁ e PPAR γ por 5 dias. Para a evolução ponderal, o ganho de peso e o consumo alimentar

foram acompanhados diariamente. Após cada período experimental, os animais foram submetidos a eutanásia, onde o sangue foi retirado para obtenção do soro para a realização das análises bioquímicas de triacilgliceróis, glicose, colesterol total e suas frações (realizadas por kits colorimétricos) e o tecido adiposo (visceral e subcutâneo) removido para as análises da expressão gênica dos receptores e adipocinas propostas (realizados por RT-PCR). No período experimental referente à profilaxia, houve diminuição significativa no consumo alimentar no grupo que recebeu o extrato da folha de manga e o peso do tecido adiposo foi estatisticamente inferior nos grupos que foram tratados com o extrato e a mangiferina, comparados ao grupo controle. No grupo de animais que receberam extrato houve uma redução significativa na expressão da resistina e do receptor CB_1 , enquanto a adiponectina apresentou uma expressão estatisticamente superior comparada ao controle. No grupo de animais que receberam a mangiferina, houve um aumento significativo na expressão do CB_1 e uma diminuição estatisticamente significativa na expressão das adipocinas adiponectina e leptina. No período experimental referente ao tratamento, os grupos tratados com o extrato da folha de manga e a mangiferina, diminuíram significativamente o acúmulo do tecido adiposo e os níveis de triacilgliceróis enquanto os níveis de HDL aumentaram significativamente comparados ao grupo controle. No grupo tratado com o extrato a expressão da leptina e do receptor CB_1 foi estatisticamente superior, enquanto a adiponectina foi significativamente inferior. Os dados demonstraram um possível efeito anti-inflamatório e antiadipogênico da mangiferina, uma vez que a expressão dos receptores CB_1 e $PPAR\gamma$ e as adipocinas leptina e resistina foram estatisticamente superiores e que a expressão da adiponectina diminuiu significativamente comparados ao grupo controle. Nesse sentido, o estudo mostrou o efeito benéfico do extrato da folha de manga e da mangiferina na profilaxia e tratamento da adipogênese, inflamação e fatores de risco metabólicos associados à obesidade e síndrome metabólica.

ABSTRACT

BRITO, Larissa Froede, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2013. **Effect of extract of mango Uba (*Mangifera indica* L) and mangiferin in modulating the expression of CB1 receptors, PPAR γ and adipokines in rats fed cafeteria diet.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-advisors: Sônia Machado Rocha Ribeiro, Maria do Carmo Gouveia Peluzio and Luciano Gomes Fietto.

Obesity is a multifactorial disease strongly associated with adipogenesis, inflammation and metabolic syndrome. The distribution of body fat is an important factor, and specifically adipose tissue, visceral and subcutaneous seem to be the link between weight gain, adipogenesis, inflammation and metabolic risk. Adipocytes are involved in the regulation of energy balance and metabolism can be modulated by hormones, cytokines and nutrients, including adiponectin, leptin and resistin. And PPAR gamma CB1 receptors are involved in regulating the production of adipocytes, and insulin sensitivity in the inflammatory process. Activation of PPAR gamma triggers anti-inflammatory activities in several cell types by modulating the expression of pro-inflammatory genes. As for the CB1 receptors are directly related to obesity and other metabolic disorders, and, in certain cases behave as other pro-inflammatory and as anti-inflammatory agents. The mango leaf extract and mangiferin (main bioactive compound isolated from the extract), possess pharmacological antioxidant, anti-inflammatory, antiadipogênica, among others. The aim of the study was to evaluate the effect of leaf extract of mango and mangiferin isolated the same, prophylaxis and treatment in adipogenesis, through weight gain, biochemical and gene expression of CB1 receptors, PPAR gamma and the adipokines adiponectin, resistin and leptin in adipose tissue of rats fed a cafeteria diet. The mango leaf extract and mangiferin were administered to the animals by gavage at a dose of 40mg/kg and 250mg/kg respectively. Before the start of the experiments the animals were adapted for 8 days. The study was divided into two stages: prevention and treatment. Prophylaxis animals receive the cafeteria diet, the leaf extract and mangiferin Mango together for eight days. In the treatment period, the animals received only cafeteria diet for 8 days to stimulate adipogenesis and then treated with the leaf extract of the sleeve, the mangiferin and CB1 receptor antagonists and PPAR gamma for 5 days. For weight gain, weight gain and food consumption were monitored daily. After each trial, the animals were euthanized, where blood was withdrawn to obtain the serum for performing the biochemical analysis of triacylglycerols, glucose, total cholesterol and its fractions (performed by colorimetric

kits) and adipose tissue (visceral and subcutaneous) removed for analysis of gene expression of adipokines receptors and proposals (obtained by RT-PCR). At the trial concerning the prophylaxis, a significant decrease in food intake in the group receiving the mango leaf extract and weight of adipose tissue was significantly lower in the groups treated with the extract and mangiferin, compared to the control group. In the group of animals receiving extracts a significant reduction in the expression of CB1 receptor and resistin, adiponectin as presented a statistically higher expression compared to the control. In the group of animals receiving mangiferin, there was a significant increase in the expression of CB1 and a statistically significant decrease in expression of adipokines leptin and adiponectin. In the trial for the treatment groups treated with leaf extract and mangiferin Mango, significantly decreased the accumulation of adipose tissue and triglyceride levels while HDL levels increased significantly compared to the control group. In the group treated with the extract and the expression of the leptin receptor CB1 was statistically significantly higher, while adiponectin were significantly lower. The data showed a possible anti-inflammatory effect of mangiferin and antiadipogênico, since the expression of CB1 and PPAR gamma and adipokines resistin and leptin were significantly higher and that the expression of adiponectin decreased significantly compared to the control group. In this sense, the study showed the beneficial effect of the leaf extract of mango and mangiferin in the prophylaxis and treatment of adipogenesis, inflammation and metabolic risk factors associated with obesity and metabolic syndrome.

**ARTIGO 1: PRODUTOS NATURAIS ATIVADORES DE PPAR E
MARCADORES ASSOCIADOS AO PROCESSO
INFLAMATÓRIO NA SÍNDROME METABÓLICA**

Produtos naturais ativadores de PPAR e marcadores associados ao processo inflamatório na Síndrome Metabólica

BRITO, LF^{1*}; TOLEDO, RCL¹; CARVALHO, IMM¹; LEITE, JPV¹; RIBEIRO, SMR²;
PELUZIO, MCG²; QUEIROZ, JH¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular; ²Departamento de Nutrição e Saúde; Universidade Federal de Viçosa, Av, PH Rolfs, s/n, Cep: 36571-001, Viçosa-Brasil. *larissafroede@yahoo.com.br

Resumo: O processo inflamatório é o elo entre a síndrome metabólica e as doenças cardiovasculares. Para verificar a presença e o grau da inflamação, vários biomarcadores têm sido propostos e investigados. Este trabalho tem como objetivo revisar as recentes pesquisas que associam alguns marcadores expressos no tecido adiposo, enfatizando, dentre eles, a adiponectina, a resistina, a leptina e o transportador de glicose GLUT-4 na síndrome metabólica, a relação da inflamação decorrente desse conjunto de desordens metabólicas sobre os receptores ativadores de proliferação peroxissomal (PPARs), bem como o efeito de diferentes extratos vegetais e produtos naturais bioativos na ativação desses receptores.

Palavras chave: síndrome metabólica, processo inflamatório, tecido adiposo, adipocinas.

Abstract: **Natural products activators of PPAR and markers associated with inflammation in the metabolic syndrome.** The inflammatory process is the link between metabolic syndrome and cardiovascular diseases. To verify the presence and degree of inflammation, several biomarkers have been proposed at the same time that different receptors have been investigated. This study aims to review recent research involving some markers expressed in adipose tissue, emphasizing, among them, adiponectin, resistin, leptin and glucose transporter GLUT-4 in metabolic syndrome, the relationship of inflammation arising from the set of metabolic disorders under the peroxisome proliferator activator receptors (PPARs) and the effect of different bioactive compounds in the activation of these receptors.

Key words: Metabolic syndrome, inflammation, adipose tissue, adipokines.

1. Introdução

A Síndrome Metabólica (SM) abrange uma grande variedade de alterações fisiopatológicas, de repercussões sistêmicas, acometendo os mais distintos órgãos, nos quais são observadas diferentes alterações nos marcadores expressos em diferentes tecidos, como por exemplo, no tecido adiposo (HUANG et al., 2009).

Os receptores proliferadores peroxissomais (PPARs), têm sido estudados nos últimos anos pelo número crescente de evidências demonstrando um papel importante na diferenciação dos adipócitos, metabolismos glicídico e lipídico, além do controle vascular. São conhecidos três tipos de PPAR: alfa, gama e beta, sendo que o PPAR γ é o regulador-chave da diferenciação dos adipócitos, estimulando o aumento ou a diminuição da expressão de vários genes. Os efeitos benéficos de agonistas dos PPARs já foram demonstrados em estudos clínicos em portadores de doença coronariana, melhorando o perfil metabólico e inflamatório (BAHIA et al., 2006).

O uso clínico de agonistas de PPARs como fibratos e tiazolidinedionas (TZDs) sugere que a ativação de PPAR pode modular o processo inflamatório envolvido no conjunto de desordens metabólicas da SM. As ações benéficas e os efeitos indesejáveis provocados pelos fibratos, TZDs e por outros ligantes sintéticos em avaliações clínicas têm fortalecido a relevância clínica dos PPARs, e contribui com o aumento em pesquisas com foco em substâncias com propriedades mais seletivas e menos tóxicas (BROWN; PLUTZKY, 2007).

A busca por compostos bioativos, a partir de plantas medicinais, que regulam a atividade transcricional é bastante recente. Nos últimos anos, agonistas e antagonistas de PPARs foram isolados a partir de espécies vegetais. A atividade de diferentes extratos também tem sido explorada (HUANG et al., 2005a).

Nesse sentido, essa revisão aborda o processo inflamatório decorrente da síndrome metabólica, marcadores envolvidos nesse conjunto de desordens fisiológicas, bem como compostos bioativos vegetais que atuam como agonistas dos receptores PPARs na modulação da inflamação.

2. Síndrome metabólica e inflamação

A Síndrome Metabólica (SM) é vista atualmente como uma epidemia mundial, com números alarmantes, associada à alta morbi-mortalidade cardiovascular e elevado custo sócio-econômico (FILHO et al., 2006). Reaven (1988), o primeiro a relatar a associação de fatores de risco metabólico, descreve que a SM consiste de obesidade,

resistência à insulina, hipertensão, diminuição da tolerância à glicose ou diabetes, hiperinsulinemia, e dislipidemia caracterizada pela elevação plasmática de triacilgliceróis e diminuição da concentração de lipoproteína de alta densidade (HDL-c). Essas alterações ocorrem devido à associação de diferentes fatores, tais como, influências genéticas (alterações nos receptores, enzimas e sinalização) e ambientais (obesidade, tabagismo, consumo excessivo de gordura saturada e ausência de atividade física), acarretando um conjunto de desordens fisiológicas e desenvolvimento da patologia.

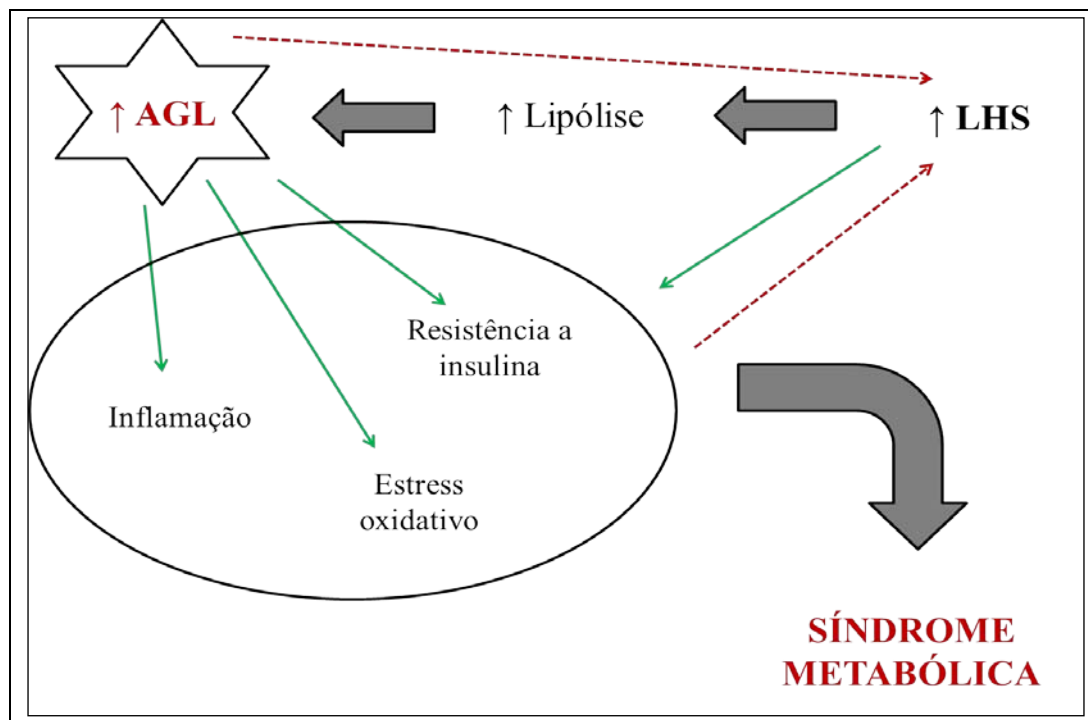
O tecido adiposo é o maior reservatório energético do organismo. Ele é constituído por adipócitos, por uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos e macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas diferenciadas). Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilgliceróis, e dispõem do conjunto de enzimas e proteínas responsáveis pela síntese, armazenamento e mobilização de ácidos graxos, em resposta a alterações na demanda fisiológica. Esses processos são estritamente regulados por fatores genéticos, nutricionais, hormonais e parácrinos (AHIMA; FLIER, 2000).

Em mamíferos estão presentes dois tipos de tecido adiposo: tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB). O TAM está presente durante o desenvolvimento fetal, porém diminui a partir do nascimento durante os primeiros anos de vida. É um tecido que atua no controle da temperatura corporal, por ser especializado na produção de calor (PEREIRA, 2008).

O TAB é um órgão heterogêneo que inclui depósitos múltiplos distintos, tais como depósitos subcutâneo, intra-abdominal e intratorácico. Além do papel importante de reserva energética corporal, o TAB tem funções endócrinas, as quais respondem pela secreção de várias moléculas bioativas, denominadas adipocinas. Estas substâncias são produzidas e atuam tanto nos próprios adipócitos, quanto em outros tecidos do organismo (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2005).

O acúmulo de tecido adiposo, principalmente na região abdominal, é fundamental para o desencadeamento da síndrome metabólica. Existe uma associação entre o tecido adiposo e as principais células inflamatórias, levando a um aumento da produção de diferentes mediadores inflamatórios e a maior liberação de ácidos graxos livres (AGL) (LOTTENBERG et al., 2007; LOTTENBERG, 2009). O aumento da concentração plasmática de AGL resulta na indução do estresse oxidativo, inflamação e

reatividade vascular junto a resistência à insulina (GUO; TABRIZCHI, 2006). Essa resistência resultante da ativação da lipase hormônio sensível em adipócitos leva a um ciclo vicioso de lipólise, e conseqüentemente, aumento de AGL, resistência à insulina e inflamação (FONSECA-ALANIZ et al., 2007). A Figura 1 mostra o desenvolvimento da síndrome metabólica decorrente do aumento da concentração de ácidos graxos livres.



LHS: Lipase hormônio sensível; AGL: ácidos graxos livres; - - - - -> Representação do ciclo vicioso de lipólise.

FIGURA 1 - Alterações metabólicas decorrentes do aumento de ácidos graxos livres levando à síndrome metabólica.

Dados recentes apontaram uma associação entre a obesidade e o estado inflamatório, mostrando que na obesidade ocorre um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TNF α , IL-6 e outros mediadores inflamatórios. O tecido adiposo apresenta uma maior expressão desses marcadores na obesidade (DANDONA et al., 2004).

Juntamente com TNF α e IL-6, três outras importantes proteínas foram relatadas como marcadores associados à síndrome metabólica: leptina, adiponectina e resistina (FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

A leptina está associada a funções como saciedade, inibição da ingestão alimentar, regulação da função sexual e modulação imune, além de induzir a agregação plaquetária. Contudo, o seu aumento, a longo prazo, pode contribuir para o estado próinflamatório da obesidade e aterogênese (NAKATA et al., 1999; LA CAVA et al., 2004). Essa proteína é produzida no TAB e demonstra similaridade estrutural com a resistina. Ela atua nos receptores expressos no hipotálamo promovendo uma sensação de saciedade e equilibrando o balanço energético. Em situações fisiológicas normais a leptina promove uma melhora na sensibilidade à insulina (hepática e no músculo esquelético) além de modular a função das células β pancreáticas (FORNARI, 2009). Tanto a deficiência como a resistência a leptina podem causar o aumento e o desenvolvimento da obesidade (RABE et al., 2008).

A adiponectina é secretada pelos adipócitos em indivíduos normais, tem propriedades anti-inflamatória, antiaterogênica, e, em altas concentrações pode levar ao ganho de peso e à obesidade (KUBOTA et al., 2002; UKKOLA; SANTANIEMIM, 2002). Isso sugere que em elevadas concentrações essa proteína pode ser marcador da aterosclerose e doenças cardiovasculares (PISCHON et al., 2004). A adiponectina é sintetizada exclusivamente no tecido adiposo, e ao contrário de outras proteínas que são secretadas pelos adipócitos, a expressão diminui à medida que o tecido adiposo aumenta. Sua concentração se encontra diminuída em humanos e camundongos obesos ou portadores de resistência insulínica. Alguns tratamentos nutricionais e terapêuticos que melhoram a sensibilidade à insulina, como por exemplo, a restrição energética, perda de peso e tratamento com glitazonas e tiazolidinodionas (TZDs) aumentam a expressão gênica de adiponectina e seus níveis circulantes (MAYNADIER et al. 2009).

A resistina induz a resistência à insulina (PACKER; SIES, 2008). Drogas anti-diabéticas como tiazolidinedionas (TZDs) ou glitazonas diminuem a concentração de resistina em humanos, e induzem um aumento da expressão de mRNA da adiponectina nos adipócitos, aumentando a concentração e a expressão da adiponectina no plasma, mostrando o efeito antiinflamatório dessas drogas (HAMMARSTED et al., 2005; GHANIM et al., 2006; MORIUCHI et al., 2007). A resistina também é sintetizada pelo TAB, e quando administrada intraperitonealmente, eleva os níveis de glicose plasmática e induz a resistência insulínica. Em nível celular, a resistina exerce efeito próinflamatório potente levando ao aumento da produção de citocinas próinflamatórias e moléculas de adesão, contudo, a literatura ainda é controversa (RABE et al., 2008).

Outro importante marcador da síndrome metabólica é o transportador de glicose insulino sensível, o GLUT-4, cujo papel principal é proporcionar a captação de glicose mediada pela insulina em tecidos adiposo e muscular (HUANG et al., 2009). Correlaciona-se de maneira direta com o aumento ou redução da sensibilidade à insulina (ISHIKI; KLIP, 2005; MACHADO et al., 2006).

O GLUT-4 tem sido investigado há mais de uma década em vários modelos experimentais, assim como em humanos com obesidade, resistência à insulina (RI), diabetes e hipertensão, todos componentes da síndrome metabólica (KLOTING et al., 2006). Papa e cols. (2002) revelaram que, durante o processo de desenvolvimento da obesidade, inicialmente, quando o ganho de peso é acelerado, há aumento na sensibilidade à insulina e da expressão do GLUT-4 no tecido adiposo; posteriormente, quando a obesidade se estabiliza, sobrevém redução do GLUT-4 no tecido adiposo e a resistência à insulina se manifesta.

Na síndrome metabólica, em consequência do desequilíbrio no metabolismo de ácidos graxos, ocorrem modificações na expressão gênica de alguns marcadores, como os citados anteriormente, podendo representar uma conexão regulatória entre a adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares.

3. Interesse clínico por ligantes de PPARs

Os receptores nucleares atuam diretamente no processo transcricional, controlando a expressão de genes-alvo que regulam diversos processos biológicos como a reprodução, o desenvolvimento e o metabolismo geral (PEREIRA, 2008).

Uma área importante no campo de pesquisas metabólicas se refere às funções dos receptores nucleares PPARs como alvos terapêuticos para distúrbios no metabolismo de lipídios e glicose em virtude desses fatores estarem associados a doenças como diabetes, dislipidemia, aterosclerose, obesidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (SHEARER; BILLIN, 2007). PPARs apresentam também papel importante na sensibilização periférica à insulina por meio da redução na expressão de resistina e TNF α , aumento da expressão da adiponectina e da atividade da lipase lipoprotéica (LLP) (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

O PPAR γ é um importante regulador da sensibilidade à insulina. A principal hipótese para o efeito sensibilizador dos agonistas de PPAR γ é de que, quando ativado, ele regula a transcrição de genes que expressam proteínas que participam da captação e armazenamento de ácidos graxos, e redirecionamento dos lipídios

depositados no músculo e no fígado para os adipócitos. Além disso, o PPAR α promove a diferenciação celular, originando novos adipócitos, os quais são mais sensíveis à insulina e representam, também, um aumento na capacidade de armazenamento de ácidos graxos, reduzindo o acúmulo em tecidos periféricos (PEREIRA, 2008).

O uso clínico de agonistas de PPARs como fibratos e tiazolidinedionas (TZDs), em conjunto com evidências que sugerem que a ativação de PPAR γ possa modular processos inflamatórios como a aterosclerose tem instigado o interesse e a busca por novos ligantes. Soma-se a esses fatores os efeitos indesejados provocados pelos fibratos, TZDs e por outros ligantes sintéticos em estudos clínicos, além dos resultados obtidos em estudos cardiovasculares. Em conjunto, as ações benéficas e os efeitos indesejados provocados pelos fibratos, TZDs e por outros ligantes sintéticos têm fortalecido a relevância clínica do PPAR γ , e contribuiu para o aumento em pesquisas com foco em substâncias com propriedades mais seletivas e menos tóxicas (BROWN; PLUTZKY, 2007).

As tiazolidinedionas (TZDs), agonistas de PPAR γ , são utilizadas no tratamento de diabetes tipo 2. Agonistas de PPAR γ também apresentaram efeitos antiaterogênicos em modelos animais. Entretanto, tais substâncias podem promover efeitos colaterais clinicamente significativos como ganho de peso, em função de retenção de líquido e do aumento na adiposidade, ações essas que parecem ser potencializadas quando as TZDs são utilizadas em associação à insulina. Alguns estudos apontam para o aumento dos efeitos de fármacos derivados dos TZDs, a rosiglitazona (Figura 2) e a pioglitazona (Figura 2). A rosiglitazona está associada ao aumento do risco de infarto de miocárdio e na morte por doenças cardiovasculares, embora essas informações ainda não sejam conclusivas. Efeitos hepatotóxicos têm sido associados ao uso de troglitazona, além de prejuízo no metabolismo ósseo. Devido aos relatos citados, esses medicamentos foram retirados do mercado (MICHALIK et al., 2006; BROWN; PLUTZKY, 2007; BERBEROGLU et al., 2007; NISSEN; WOLSKI, 2007; JUURLINK, 2010).

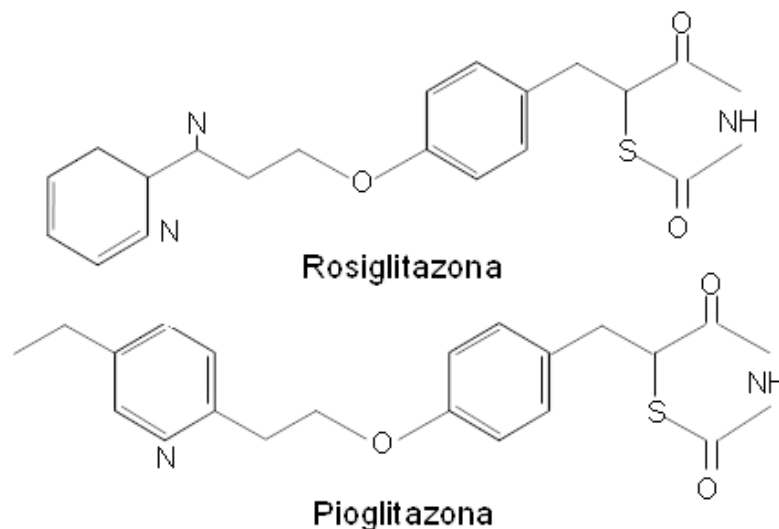


Figura 2 – Estrutura química da Rosiglitazona e da Pioglitazona.

Além dos benefícios clínicos bem estabelecidos em diabetes e dislipidemia, vários estudos relatam a utilização de ligantes de PPARs na síndrome metabólica. Os ligantes de PPAR, por atuarem na regulação de vias metabólicas envolvidas nas desordens que acompanham a síndrome metabólica, emergem com grande potencial de atuação no tratamento de pacientes com essa complexa rede de alterações fisiológicas (FIÉVET et al., 2006; KASUGA et al., 2006; GURNELL, 2007; WILKINSON et al., 2008).

4. Ligantes para PPARs de origem natural

Se por um lado o desenvolvimento de moduladores sintéticos da expressão gênica em níveis transcricionais é realizado há muito tempo, a busca por substâncias isoladas a partir de plantas que detenham atividade transcricional é mais recente. Nos últimos anos, agonistas e antagonistas dos receptores PPARs foram isolados a partir de extratos vegetais (HUANG et al., 2005b). A atividade dos extratos, de frações de extratos e de substâncias isoladas sobre a ativação transcricional dos receptores PPARs é avaliada basicamente com a realização de ensaios de gene repórter em cultura de células, ensaios de competição pela ligação e teste de diferenciação de adipócitos, sendo que alguns trabalhos recorrem aos testes em animais para correlacionar os efeitos observados *in vitro* com os efeitos *in vivo* (PEREIRA, 2008). A tabela 1 mostra o efeito de diferentes extratos e compostos bioativos na ativação dos receptores PPARs.

Tabela 1 – Efeito de diferentes extratos e compostos bioativos na ativação dos receptores PPARs.

Família / espécie	Extrato / Princípio ativo	Atividade	Referência
Anacardiaceae <i>Mangifera indica</i>	Glicosilxantona: mangiferina	Ativador de PPAR α e PPAR γ .	WILKINSON et al., 2008; KAUSHIK et al., 2010.
Araliaceae <i>Panax ginseng</i>	Extrato aquoso de raiz de ginseng branco.	Ativador de PPAR γ .	CHUNG et al., 2001.
Cannabaceae <i>Cannabis sativa</i>	Ácido julêmico (análogo sintético do THC) Cannabidiol	Ativador de PPAR γ . Ativador de PPAR γ .	LIU et al., 2003; BURSTEIN, 2005. IZZO et al., 2009; O'SULLIVAN et al., 2009; O'SULLIVAN; KENDALL, 2009.
Celastraceae <i>Salacia oblonga</i>	Extrato aquoso da raiz e mangiferina.	Ativador de PPAR α e PPAR γ .	HUANG et al., 2009; GIRÓN et al., 2009.
Cucurbitaceae <i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Gipenosídeo XLIX.	Ativador de PPAR α .	HUANG et al., 2006.
<i>Mormodica charantia</i>	Extrato em acetato de etila do fruto e compostos isolados.	Ativador de PPAR α .	CHAO; HUANG, 2003; CHUANG et al., 2006.
Leguminosae <i>Astragalus membranaceus</i>	Biocanina A, formononetina.	Ativador de PPAR α e PPAR γ .	SHEN et al., 2006.
<i>Glycine max</i>	Fitoestrógeno: genisteína.	Ativador de PPAR γ .	DANG et al., 2003.
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Prenilflavonóides: glicicumarina, glicirina, dehidroglasperina C, dehidroglasperina D.	Ativador de PPAR γ .	KURODA et al., 2003.
Meliaceae <i>Swietenia mahagony</i>	Extrato etanólico da semente.	Ativador de PPAR γ .	LI et al., 2005.
Pinaceae <i>Pseudolarix kaempferi</i>	Ácido pseudolárico B.	Ativador de PPAR α .	JARADAT et al., 2003.
Polyporaceae <i>Poria cocos</i>	Ácido dehidrotrametanólico.	Ativador de PPAR γ .	SATO et al., 2002.
Ranunculaceae <i>Clematis pickeringii</i>	Extrato etanólico do caule e	Ativador de	LI et al., 2006.

	frações.	PPAR α e PPAR γ .
Rutaceae	<i>Citrus grandis</i> Flavanona: naringenina.	Ativador de PPAR γ . HARMON; HARP, 2001.
Theaceae	<i>Camelia sinensis</i> Extrato aquoso de chá verde, chá preto e galato epigalocatequina.	Ativador de PPAR α . LEE, 2004.
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i> Terpenóides: farnesol, geraniogeraniol.	Ativador de PPAR α e PPAR γ . TAKAHASHI et al., 2002.
	Proantocianidinas derivadas de semente.	Ativador de PPAR γ . MA et al., 2007.

THC: tetrahydrocannabinol. Fonte: LEE, 2004; HUANG et al., 2005; CHUANG et al., 2006; HUANG et al., 2006; LI et al., 2006; SHEN et al., 2006; MA et al., 2007; PEREIRA, 2008; HUANG et al., 2009; KAUSHIK et al., 2010.

Frente ao conjunto de desordens fisiológicas envolvidas na síndrome metabólica faz-se necessário o aumento de pesquisas utilizando plantas medicinais como alternativa para o tratamento. No Brasil, com a diversidade da flora, há um amplo campo de atuação na área de validação das propriedades farmacológicas atribuídas empiricamente às plantas medicinais, principalmente na seleção de ligantes para receptores nucleares, onde as pesquisas ainda são insipientes. Plantas medicinais que comprovadamente reduzam as alterações ocorridas nesse estado patológico têm grande potencial de bioatividade no tratamento da síndrome metabólica. Por essa razão, plantas usadas popularmente pela ação antidiabética, hipolipemiante, antiinflamatória, antiobesidade, dentre outras propriedades farmacológicas, vêm sendo utilizadas por grupos de pesquisa no rastreamento de compostos que atuem no metabolismo do adipócito com o objetivo de identificação de novos agonistas para receptores PPARs.

5. Considerações Finais

O aumento da incidência da síndrome metabólica nos países desenvolvidos e em desenvolvimento é um dos fatores contribuintes para a expansão de estudos utilizando compostos naturais no tratamento e prevenção de desordens metabólicas desencadeadas no processo inflamatório. Nesse contexto, são necessárias pesquisas que abordem o processo inflamatório decorrente das alterações fisiológicas envolvidas nas diferentes

patologias que compõem a síndrome metabólica, e associem os principais marcadores envolvidos nesse conjunto de desordens metabólicas, bem como compostos bioativos agonistas dos receptores PPARs como coadjuvantes na modulação da inflamação.

Agradecimentos

À Fapemig, CNPq e Capes.

6. Referências bibliográficas

AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 8, p. 327-332, 2000.

BAHIA, L.; AGUIAR, L.G.K.; VILLELA, N.R.; BOTTINO, D.; BOUSKELA, E. O endotélio na Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n.2, p. 291-303, 2006.

BERBEROGLU, Z.; GURSOY, A.; BAYRAKTAR, N.; YAZICI, A.C.; TUTUNCU, N.B.; DEMIRAG, N.G. Rosiglitazone decreases serum bone-specific alkaline phosphatase activity in postmenopausal diabetic women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 9, p. 3523-3530, 2007.

BROWN, J.F.; PLUTZKY, J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. **Circulation**, v. 115, n. 4, p. 518-533, 2007.

BURSTEIN, S. PPAR γ : A nuclear receptor with affinity for cannabinoids. **Life Sciences**, v. 77, n. 14, p. 1674-1684, 2005.

CHAO, C.Y.; HUANG, C.J. Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extract Activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Upregulates the Expression of the Acyl CoA Oxidase Gene in H4IIEC3 Hepatoma Cells. **Journal of Biomedical Science**, v.10, n. 2, p. 782-791, 2003.

CHUANG, C.Y.; HSU, C.; CHAO, C.Y.; WEIN, Y.S.; KUO, Y.H.; HUANG, C.J. Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator

of PPAR α in bitter melon (*Momordica charantia* L.). **Journal of Biomedical Science**, v. 13, n. 6, p. 763-772, 2006.

CHUNG, S. H.; CHOI, C. G.; PARK, S. Comparisons between White Ginseng Radix and Rootlet for Antidiabetic Activity and Mechanism in KKAY Mice. **Archives of Pharmacol Research**, v. 24, n.3, p.214-218, 2001.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1 p. 4-7, 2004.

DANG, Z. C.; AUDINOT, V.; PAPAPOULOS, S. E.; BOUTIN, J. A.; LOWIK, C. W. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 962–967, 2003.

FIEVET, C.; FRUCHART, J.C.; STAELS, B. PPAR α and PPAR γ dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 606–614, 2006.

FILHO, F.F.R.; MARIOSIA, L.S.; FERREIRA, S.R.G.; ZANELLA, M.T. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais que uma simples associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n.2, p. 230-238, 2006.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. 192-203, 2007.

FORNARI, J.V. **Efeito da inibição de TNF- α sobre as alterações hepáticas associadas à obesidade experimental**. 2009. 49p. Dissertação de Mestrado. Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2009.

GHANIM, H.; DHINDSA, S.; ALJADA, A.; CHAUDHURI, A.; VISWANATHAN, P.; DANDONA, P. Low dose rosiglitazone exerts an anti-inflammatory effect with an increase in adiponectin independently of free fatty acid (FFA) fall and insulin

sensitization in obese type 2 diabetics. **The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 9, p. 3553-3558, 2006.

GIRÓN, M.D.; SEVILLANO, N.; SALTO, R.; HAIDOUR, A.; MANZANO, M.; JIMÉNEZ, M.L.; RUEDA, R.; PEDROSA, J.M.L. Salacia oblonga extract increases glucose transporter 4-mediated glucose uptake in L6 rats myotubes: Role of mangiferin. **Clinical Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 565-574, 2009.

GUO, L.; TABRIZCHI, R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as drug target in the pathogenesis of insulin resistance. **Pharmacology Therapeutics**, v. 111, n. 1, p. 145-173, 2006.

GURNELL, M. 'Striking the right balance' in targeting PPAR γ in the metabolic syndrome: novel Insights from human genetic studies. **PPAR Research**, v. 2007, n. 83593, p. 1-14, 2007.

HAMMARSTEDT, A.; SOPASAKIS, V.R.; GOGG, S.; JANSSON, P.A.; SMITH, U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin resistant subjects. **Diabetologia**, v. 48, n. 1, p. 96-104, 2005.

HARMON, A. W.; HARP, J. B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 280, n. 4, p. C807-C813, 2001.

HERMSDORFF, H.H.M.; MONTEIRO, J.B.R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 803-811, 2004.

HUANG, T. H. W.; TEOH, A.W.; LIN, B. L.; LIN, D.S.H.; ROUFOGALIS, B. The role of herbal PPAR modulators in the treatment of cardiometabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 3, p. 195-206, 2009.

HUANG, T. H-W.; PENG, G.; KOTA, B.P; LI, G.Q.; YAMAHARA, J.; ROUFOGALIS, B.D.; LI, Y. Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract:

Activation of PPAR γ and identification of an active component. **Toxicology and Applied pharmacology**, v. 207, n. 2, p. 160-169, 2005b.

HUANG, T.H.W.; LI, Y.; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V.; TRAN, V.H.; LI, G.Q.; DUKE, C.C.; ROUFOGALIS, B.D. Gypenoside XLIX isolated from *Gynostemma pentaphyllum* inhibits nuclear factor-kappaB activation via PPAR-alpha-dependent pathway. **Journal of Biomedical Science**, v. 13, n. 4, p. 535-548, 2006.

HUANG, T.H-W.; KOTA, B. P.; RAZMOVSKI, V.; ROUFOGALIS, B.D. Herbal or natural medicines as modulators of peroxisome proliferator-activated receptors and related nuclear receptors for therapy of metabolic syndrome. **Basic & Clinical Pharmacology Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 3–14, 2005a.

ISHIKI, M.; KLIP, A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5071–5078, 2005.

IZZO, A.A.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; DI MARZO, V.; MECHOULAM, R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 10, p. 515-527, 2009.

JARADAT, M. S.; NOONAN, D. J.; WU, B.; AVERY, M. A.; FELLER, D. R. Pseudolaric acid analogs as a new class of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. **Planta Medica**, v. 68, n. 8, p. 667–671, 2003.

JUURLINK N.D., Rosiglitazona e o caso da segurança sobre a certeza. **JAMA**, v. 304, p. 469-471, 2010.

KASUGA, J.; YAMASAKI, D.; ARAYA, Y.; NAKAGAWA, A.; MAKISHIMA, M.; DOI, T.; HASHIMOTO, Y.; MIYACHI, H. design, synthesis, and evaluation of a novel series of substituted phenylpropanoic acid derivatives as human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α/δ dual agonists for the treatment of metabolic syndrome. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8405-8414, 2006.

KAUSHIK, G.; SATYA, S.; KHANDELWAL, R.K.; NAIK, S.N. Commonly consumed Indian plant food materials in the management of diabetes mellitus. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 4, n. 1, p. 21-40, 2010.

KLOTING, N.; BLUHER, M.; KLOTING, I. The polygenetically inherited metabolic syndrome of WOKW rats is associated with insulin resistance and altered gene expression in adipose tissue. **Diabetes Metabolism Research Review**, v. 22, n. 2, p. 146-154, 2006.

KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, T.; MOROI, M.; MATSUI, J.; ETO, K.; YAMASHITA, T.; KAMON, J.; SATOH, H.; YANO, W.; FROQUEL, P.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; KADOWAKI, T.; NODA, T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. **Journal Biology Chemistry**, v. 277, n. 29, p. 25863-25866, 2002.

KURODA, M.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; MAE, T.; KISHIDA, H.; NISHIYAMA, T.; TSUKAGAWA, M.; KONISHI, E.; TAKAHASHI, K.; KAWADA, T.; NAKAGAWA, K. K.; KITAHARA, M. Phenolics with PPAR-gamma ligand-binding activity obtained from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-A(y) mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 24, p. 4267-4272, 2003.

LA CAVA, A.; ALVIGGI, C.; MATARESE, G. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, n. 1, p. 4-11, 2004.

LEE, K. Transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor α by Green tea extracts. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n. 4, p. 325-330, 2004.

LI, D. D; CHEN, J.; CHEN, Q.; LI, G.; CHEN, J.; YUE, J.; CHEN, M.; WANG, X.; SHEN, J.; SHEN, X.; JIANG, H. Swietenia mahagony extract shows agonistic activity to PPAR γ and gives ameliorative effects on diabetic db/db mice. You have full text access to this content. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.26, n.2, p. 220-222, 2005.

LI, R.W.; LIN, G.D.; LEACH, D.N.; WATERMAN, P.G.; MYERS, S.P. Inhibition of COXs and 5-LOX and activation of PPARs by Australian Clematis species (Ranunculaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 138-143, 2006.

LIU, J.; LI, H.; BURSTEIN, S.H.; ZURIER, R. B.; CHEN, J. D. Activation and Binding of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ by Synthetic Cannabinoid Ajulemic Acid. **Molecular Pharmacology**, v. 63 n. 5, p. 983-992, 2003.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

LOTTENBERG, S.A.; GLEZER, A.; TURATTI, L.A. Metabolic syndrome: identifying the risk factors. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. 204-208, 2007.

MA, L.; GAO, H.G.; LI, B.Y.; MA, Y.B.; YOU, B.A.; ZHANG, F.L. Grape seed Proanthocyanidin extracts inhibit vascular cell adhesion molecule expression induced of by advanced glycation endproducts through activation of peroxisome proliferators-activated receptor γ . **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.49, n. 5, p. 293-298, 2007.

MACHADO, U.F.; SCHAAN, B.D.; SERAFHIM, P.M. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 177-189, 2006.

MAYNADIER, M.; BASILE, I.; GARY-BOBO, M. Adiponectin normalization: a clue to the anti-metabolic syndrome action of rimonabant. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 3-4, p. 192-197, 2009.

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J.P.; CHATTERJEE, V.K.; GLASS, C.K.; GONZALEZ F.J.; GRIMALDI, P.A.; KADOWAKI, T.; LAZAR, M.A.; O'RAHILLY, S.; PALMER, C.N.; PLUTZKY, J.; REDDY, J.K.; SPIEGELMAN, B.M.; STAELS, B.; WAHLI, W. International Union of pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Pharmacological Reviews**. v. 58, n. 4, p. 726-741, 2006.

MORIUCHI, A.; YAMASAKI, H.; SHIMAMURA, M.; KITA, A.; KUWAHARA, H.; FUJISHIMA, K.; SATOH, T.; FUKUSHIMA, K.; HAYAKAWA, T.; MIZUQUCHI, H.; NAGAYAMA, Y.; ABIRU, N.; KAWASAKI, E.; EQUCHI, K. Induction of human adiponectin gene transcription by telmisartan, angiotensin receptor blocker, independently on PPAR γ activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.356, p. 1024-1030, 2007.

NAKATA, M.; YADA, T.; SOEJIMA, N.; MARUYAMA, I. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. **Diabetes**, v. 48, n. 2, p. 426-429, 1999.

NISSEN, S.E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. The New England. **Journal of Medicine**, v. 356, n. 24, p. 2457-2471, 2007.

O'SULLIVAN, S.E.; KENDALL, D.A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. **Immunobiology**, v. 215, n. 8, p. 611-616, 2009.

O'SULLIVAN, S.E.; SUN, T.; BENNETT, A.J.; RANDALL, M.D.; KENDALL, D.A. Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 612, n. 1-3, p. 61-68, 2009.

PACKER, L.; SIES, H. **Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome**. 1^o Edição. Londres: CRC Press, 2008. 332p.

PAPA, P.C.; VARGAS, A.M.; SILVA, J.L.; NUNES, M.T.; MACHADO, U.F. GLUT-4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Science**, v. 71, n. 16, p. 1917-1928, 2002.

PEREIRA, V.C. **Atividade agonista do extrato de *Tabebuia heptaphylla* sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa (PPAR γ), beta/delta (PPAR β/δ) e gama (PPAR γ)**. 2008. 109p. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Ciência da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

PISCHON, T.; GIRMAN, C.J.; HOTAMISLIGIL, G.S.; RIFAI, N.; HU, F.B.; RIMM, E.B. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. **JAMA**, v. 291, n. 14, p. 1730-1737, 2004.

RABE, K.; LEHRKE, M.; PARHOFER, K.G.; BROEDL, U.C. Adipokines and insulin resistance. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 11-12, p. 741-751, 2008.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-1607, 1988.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, F.; GARCÍA-MACEDO, R.; ALARCÓN-AGUILAR, F.; CRUZA, M. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células Del sistema inmune. **Gaceta Médica de México**, v. 141, n. 6, p. 505-512, 2005.

SATO, M.; TAI, T.; NUNOURA, Y.; YAJIMA, Y.; KAWASHIMA, S.; TANAKA, K. Dehydrotrametenolic acid induces preadipocyte differentiation and sensitizes animal models of noninsulin-dependent diabetes mellitus to insulin. **Biology and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 81–86, 2002.

SHEARER, B.G.; BILLIN, A.N. The next generation of PPAR drugs: Do we have the tools to find them? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 1082-1093, 2007.

SHEN, P.; LIU, M.H.; NG, T.Y.; CHAN, Y.H.; YONG, E.L. Differential effects os isoflavones, from Astragalus Membranaceus and Pueraria Thomsonii, on the activation of PPAR α , PPAR γ and adipocyte differentiation in vitro. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 4, p. 899-905, 2006.

TAKAHASHI, N.; KAWADA, T.; GOTO, T.; YAMAMOTO, T.; TAIMATSU, A.; MATSUI, N.; KIMURA, K.; SAITO, M.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; FUSHIKI, T. Dual action of isoprenols from herbal medicines on both PPAR γ and PPAR α in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. **FEBS Letters**, v. 514, n. 2-3, p. 315–322, 2002.

UKKOLA, O.; SANTANIEMIM, M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidity? **Journal Molecular Medicine**, v. 80, n. 11, p. 696-702, 2002.

WILKINSON, A. S.; MONTEITH, G.R.; SHAW, P. N.; LIN, C-N.; GIDLEY, M. J., ROBERTS-THOMSON, S. J. Effects of the mango components mangiferin and quercetin and the putative mangiferin metabolite norathyriol on the transactivation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3037–3042, 2008.

**ARTIGO 2: SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E RECEPTORES
PPARS NAS DESORDENS FISIOLÓGICAS RELACIONADAS À
SÍNDROME METABÓLICA**

Sistema Endocanabinóide e Receptores PPARs nas desordens fisiológicas relacionadas à síndrome metabólica

BRITO, LF^{1*}; QUEIROZ, JH¹; TOLEDO, RCL¹; CARVALHO, IMM¹; FIETTO, LG¹; RIBEIRO, SMR²; PELUZIO, MCG²

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular; ²Departamento de Nutrição e Saúde; Universidade Federal de Viçosa, Av, PH Rolfs, s/n, Cep: 36571-001, Viçosa-Brasil. *larissafroede@yahoo.com.br

Resumo

A Síndrome Metabólica (SM) é vista atualmente como uma epidemia mundial, com números alarmantes, associada à alta morbimortalidade e elevado custo sócio-econômico. O sistema endocanabinóide e os receptores ativadores de proliferação peroxissomal (PPARs) atuam fisiologicamente na manutenção da homeostase energética e na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios. A hiperatividade do sistema endocanabinóide não só causa o aumento de peso como pode induzir fenótipos dislipidêmicos e disglicêmicos fundamentais para o desenvolvimento e instalação do processo inflamatório envolvido na SM. Os PPARs atuam de modo integrado e são considerados alvos importantes para o tratamento das desordens fisiológicas, como obesidade e inflamação, característicos da síndrome metabólica. Essa revisão aborda a relação entre esses receptores, bem como os mecanismos de desenvolvimento e tratamento das diferentes patologias que compõem a síndrome metabólica.

Palavras chaves: Resistência à insulina, diabetes, dislipidemia, receptores CB₁ e CB₂, canabinóides.

Abstract

Metabolic syndrome (MS) is now viewed as a global epidemic, with alarming numbers, associated with high cardiovascular morbidity and mortality and high socioeconomic cost. The endocannabinoid system and the receptors PPARs act physiologically in the maintenance of energy homeostasis and metabolism regulation of carbohydrates and lipids. The hyperactivity of the endocannabinoid system not only causes weight gain as dyslipidemic phenotypes and can induce dysglycemic fundamental in the development and installation of the inflammatory process involved

in MS. The PPARs act in an integrated manner and are considered important targets for the treatment of physiological disorders such as obesity and inflammation, characteristic of the metabolic syndrome. This paper aims to review recent research linking these mechanisms involved in the metabolic disorder resulting from the combination of factors involved in metabolic syndrome.

Keywords: Insulin resistance, diabetes, dyslipidemia, CB1 and CB2 receptors, cannabinoids.

1. Introdução

A Síndrome Metabólica (SM) é vista atualmente como uma epidemia mundial, com números alarmantes, associada à alta morbimortalidade e elevado custo sócio-econômico (FILHO et al., 2006). A ocorrência comum da combinação de obesidade, resistência à insulina, diabetes, hipertensão, hipertrigliceridemia, diminuição do HDL-c (lipoproteína de alta densidade) e hiperinsulinemia caracterizam a síndrome metabólica, sendo esta, fator de risco das doenças cardiovasculares (PACKER; SIES, 2008). Essas alterações metabólicas ocorrem devido à associação de diferentes fatores, tais como, predisposições genéticas (mutações em receptores e enzimas que causam alterações no metabolismo) e ambientais (hábitos alimentares inadequados, tabagismo e sedentarismo) acarretando um conjunto de desordens fisiológicas e desenvolvimento da patologia.

O sistema endocanabinóide é um importante sistema de sinalização que atua na manutenção da homeostase energética e na regulação do metabolismo lipídico (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006), onde regula a lipogênese e aumenta a expressão de genes envolvidos no metabolismo dos lipídios e carboidratos (MATOS et al., 2006).

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs), pertencentes à superfamília de receptores nucleares, tem sido estudados nos últimos anos pelo número crescente de evidências demonstrando papel importante na diferenciação dos adipócitos, metabolismos glicídico e lipídico, além do controle vascular. São conhecidos três tipos de PPAR: alfa, gama e beta, sendo que o PPAR γ principal regulador da diferenciação dos adipócitos. Os efeitos benéficos de agonistas dos PPARs já foram demonstrados em estudos clínicos em portadores de doença coronariana, melhorando o perfil metabólico e inflamatório dos pacientes (OLUKMAN et al., 2010; QUINTELA et al., 2012).

Os receptores endocanabinóides (CBs) têm um efeito inibitório acentuado na função das células imunes e são capazes de ativar o processo inflamatório de doenças crônicas. Já os receptores PPARs são capazes de inibir o processo inflamatório. A ativação de PPAR pode iniciar indiretamente a cascata de sinalização dos receptores de superfície CBs. Essa revisão tem como objetivo abordar essas duas vias de sinalização, bem como a relação delas com os processos fisiológicos envolvidos na síndrome metabólica.

2. Síndrome Metabólica

O aumento da incidência da obesidade é um problema sério de saúde pública em todo o mundo. De acordo com Organização Mundial de Saúde, são mais de um bilhão de pessoas com o índice de massa corporal ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) e aproximadamente 300 milhões de pessoas com $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ (WHO, 2012). A obesidade é definida como manifestação fenotípica de acúmulo excessiva de gordura que altera a saúde e aumenta a mortalidade (GONZÁLES-CASTEJÓN; RODRIGUEZ-CASADO, 2011). A etiologia da obesidade é extremamente complexa por estar associada a fatores genéticos, ambientais e a alterações no sistema neurológico, endócrino e imunológico. Ela está relacionada a doenças cardiovasculares, diabetes, resistência a insulina, hipertensão e síndrome metabólica (SCOARIS *et al.*, 2010).

A Síndrome Metabólica (SM) consiste em um conjunto de desordens metabólicas complexas caracterizadas por obesidade central, dislipidemia, intolerância a glicose e aumento da pressão arterial. Está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (RUEDA-CLAUSEN *et al.*, 2012).

Estes fatores de risco característicos da SM incluem diabetes tipo 2, hiperinsulinemia e resistência à insulina, dislipidemia, aterosclerose, hipertensão, esteatose hepática, inflamação e obesidade (HUANG *et al.*, 2009). O acúmulo excessivo de gordura nos principais órgãos e tecidos envolvidos na regulação do metabolismo energético, tais como tecido adiposo, fígado e músculo, prejudica a integridade dos tecidos e leva ao desenvolvimento da inflamação caracterizada pelo aumento de citocinas próinflamatórias. A resistência à insulina reduz a oxidação de ácidos graxos, aumentando o armazenamento de gordura, definindo a natureza crônica e progressiva no processo patológico (MAYNADIE *et al.*, 2009).

A obesidade também é caracterizada por um estado inflamatório e consequentemente aumento nas concentrações plasmáticas do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6), fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) e outras citocinas inflamatórias, como leptina e resistina, ao mesmo tempo em que ocorre uma diminuição significativa nas concentrações de adiponectina e do transportador de glicose GLUT-4 (NISOLI, 2010). A associação entre obesidade, adiposidade e inflamação desempenha um papel importante na progressão da síndrome metabólica (PACKER; SIES, 2008). A disfunção metabólica dos principais órgãos envolvidos no metabolismo de lipídios e glicose é correlacionada ainda com a dislipidemia, caracterizada pelo aumento na circulação dos níveis de colesterol total, triacilgliceróis e ácidos graxos livres, e pela redução do nível circulante de HDL-c (ADIELS et al., 2008). A dislipidemia está intimamente relacionada com um risco aumentado de doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, hipertensão arterial e infarto do miocárdio (MAYNADIE et al., 2009). A figura 1 mostra a relação entre as principais desordens envolvidas na SM, onde obesidade, diabetes tipo 2, dislipidemia, inflamação e esteatose hepática compõem a síndrome e são os principais fatores que levam ao aumento do risco de doenças cardiovasculares.

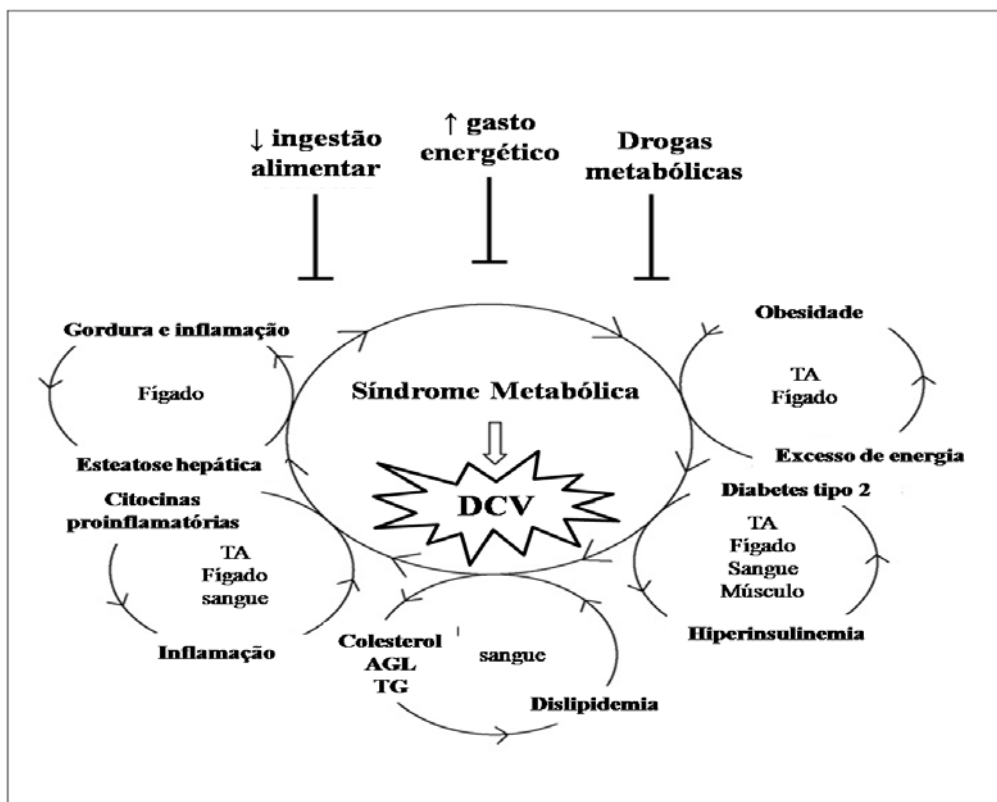


Figura 1 – Componentes da Síndrome Metabólica. DCV: doenças cardiovasculares; TA: tecido adiposo; TG: triacilgliceróis; AGL: ácidos graxos livres. O símbolo^L representa os inibidores. Fonte: adaptado de MAYNADIE et al., 2009.

Neste esquema simplificado, obesidade, diabetes tipo 2, dislipidemia, inflamação e esteatose hepática são representados como ciclos envolvidos na SM, levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Cada ciclo representa uma desordem fisiológica induzida por desequilíbrios metabólicos, tais como, excesso de energia, hiperinsulinemia, aumento do colesterol, ácidos graxos livres (AGL) e triacilgliceróis (TG), citocinas próinflamatórias, gordura e inflamação. Dentro dos ciclos são enunciados os principais órgãos ou tecidos envolvidos nestas patologias que fazem parte da SM: sangue, tecido adiposo (TA), fígado e músculos. Além disso, a diminuição da ingestão alimentar, o aumento do gasto de energia e drogas que atuam no metabolismo energético são representados como inibidores da progressão da SM.

3. Função fisiopatológica do tecido adiposo

O tecido adiposo tem uma função altamente especializada de acumular gordura em situações de excesso de ingestão energética que pode ser utilizada durante períodos de alto consumo de energia ou durante períodos de privação alimentar. Este tecido é principalmente constituído por células adiposas (adipócitos) em diferentes estados de diferenciação que incluem adipoblastos, preadipócitos e adipócitos imaturos e maduros (AVRAM, 2005). Alguns mecanismos podem contribuir para a expansão do tecido adiposo, como a hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos, que ocorrem comumente em indivíduos obesos, onde o primeiro é predominante em crianças e o segundo em adultos (GONZÁLES-CASTEJÓN; RODRIGUEZ-CASADO, 2011).

Além da capacidade de armazenar lipídios, o tecido adiposo é responsável por expressar e secretar muitas moléculas biologicamente ativas chamadas adipocitocinas ou adipocinas, tornando-se, portanto, um órgão endócrino (NISOLI, 2010). Essas adipocinas têm estruturas e funções fisiológicas variadas, compreendendo proteínas que desempenham ações importantes na homeostase energética global, na sensibilidade à insulina (adiponectina, leptina, resistina, visfatina, proteína estimulante de acilação), em respostas imunológicas (fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina-6 (IL-6), na regulação da pressão sanguínea (angiotensinogênio) e na homeostase vascular (inibidor

do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), fator tecidual), entre outras ações (PEREIRA, 2008).

Os níveis de adipocinas estão relacionados com os estados de equilíbrio e desequilíbrio do tecido adiposo. Na condição de aumento da massa desse tecido, a síntese das adipocinas encontra-se desregulada, com predomínio da expressão de proteínas próinflamatórias, que por sua vez desencadeiam diversas complicações associadas à obesidade, como por exemplo, a resistência à insulina, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento e na progressão da SM. Assim, estudos sugerem que a integridade do tecido adiposo é a chave para prevenir o desenvolvimento e a progressão da síndrome metabólica (MAYNADIE et al., 2009).

4. Sistema Endocanabinóide

O sistema endocanabinóide é um importante sistema de sinalização que atua na manutenção da homeostase energética e na regulação do metabolismo (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006; VALENZUELA et al., 2010). Sua expressão é maior no tecido adiposo, onde regula a lipogênese e aumenta a expressão de genes influentes no metabolismo dos lipídios e carboidratos (MATOS et al., 2006).

Os endocanabinóides são mediadores lipídicos endógenos que interagem com alguns receptores acoplados à proteína G, denominados CB₁ e CB₂ (NISOLI, 2010). O primeiro receptor canabinóide, CB₁ foi identificado a partir do Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), o qual é o constituinte psicoativo da planta do gênero *cannabis* originando o nome receptor canabinóide (CONSOLE-BRAM et al., 2012).

Os receptores canabinóides CB₁ e CB₂ são proteínas simples com um grupo N-terminal extracelular e um grupo C-terminal intracelular e sete hélices transmembrana. Ambos ativam a proteína G, inibem a adenilato ciclase (AC), diminuindo a produção de AMP cíclico (AMPc) (TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010).

Seguido da descoberta de CB₁ e CB₂, dois agonistas endógenos dos receptores canabinóides foram descobertos, o N-aracdonoil etanolamina (anandamida) e o 2-aracdonoil glicerol (2-AG), sendo designados como endocanabinóides (ECB) (CONSOLE-BRAM et al., 2012). As enzimas lipase fosfolipase sn-1-diacilglicerol-seletiva (DAG Lipase) e N-acilfosfatidiletalona-seletiva (FAAH) são as enzimas que hidrolisam o 2-AG e a anandamida, respectivamente (LI et al., 2011). Os receptores canabinóides, os endocanabinóides e as enzimas que catalisam sua biossíntese e degradação constituem o Sistema Endocanabinóide (SECB) (Figura 2)

(SVÍZENSKÁ, et al., 2008). O SECB é modulado por agonistas sintéticos ou naturais, agindo no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico (TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010; BOOZ, 2011; DAMIANI; DAMIANI, 2011; GAMAGE; LICHTMAN, 2012).

A maioria dos endocanabinóides identificados até o momento é derivada de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), especificamente o ácido araquidônico. As enzimas responsáveis pela síntese são a N-acilfosfatidiletalona- fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) e a lipase sn-1-diacilglicerol-seletiva fosfolipase (DAG Lipase) conforme mostrado na Figura 2 (LI et al., 2011; GAMAGE; LICHTMAN, 2012).

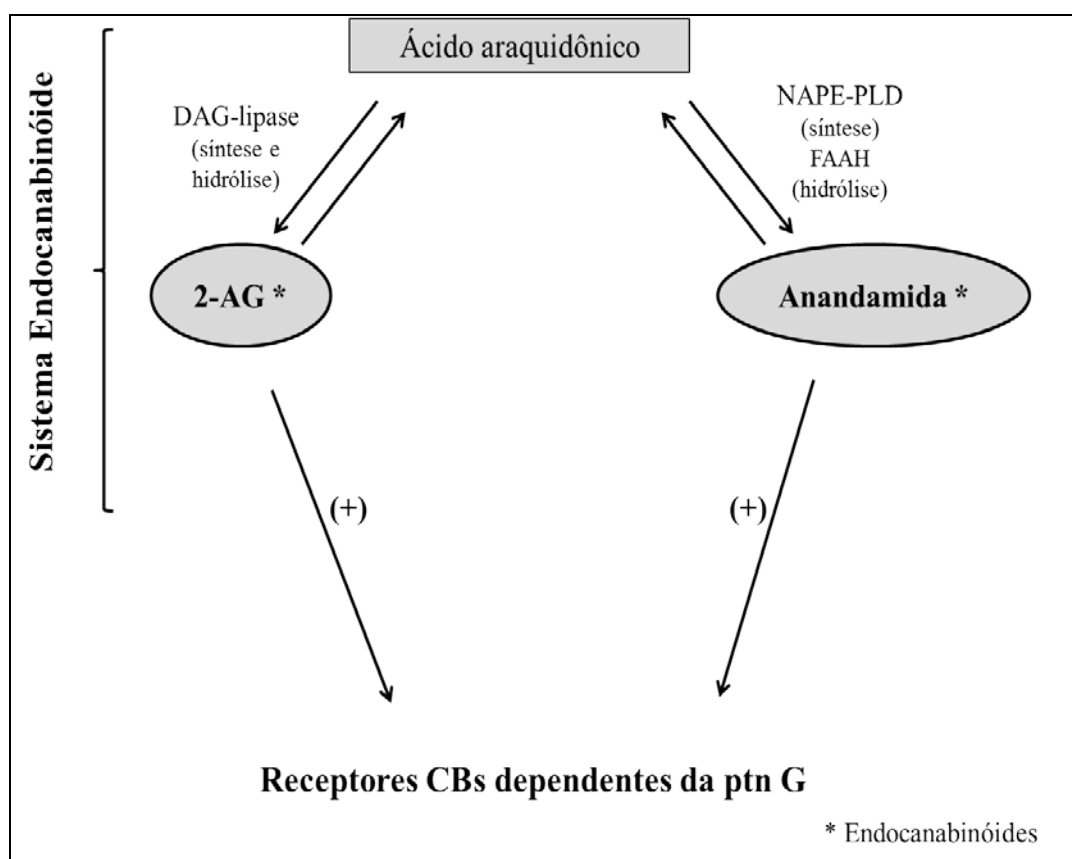


Figura 2 - Sistema Endocanabinóide. DAG Lipase: lipase sn-1-diacilglicerol-seletiva fosfolipase; NAPE-PLD: N-acilfosfatidiletalona- fosfolipase D seletiva; FAAH: N-acilfosfatidiletalona- seletiva; 2-AG: 2-aracondoil glicerol.

A ativação da proteína G é o primeiro passo do processo de transdução de sinais, levando a mudanças em vários componentes intercelulares, como por exemplo, a

abertura ou o bloqueio dos canais de cálcio e potássio ocasionando mudanças nas funções celulares (HONÓRIO et al., 2006). Os receptores canabinóides estão inseridos na membrana celular, onde estão acoplados às proteínas G e à enzima adenilato ciclase (AC). Quando interagem com ligantes, tais como anandamida ou Δ^9 -THC, os receptores são ativados, e a partir desta interação, uma série de reações ocorre, incluindo inibição da AC, o que diminui a produção de AMPc; abertura dos canais de K^+ , diminuindo a transmissão de sinais e fechamento dos canais de Ca^{+2} (Figura 3), levando a um decréscimo na liberação de neurotransmissores (RUEDA-CLAUSEN; DAVIDGE, 2012).

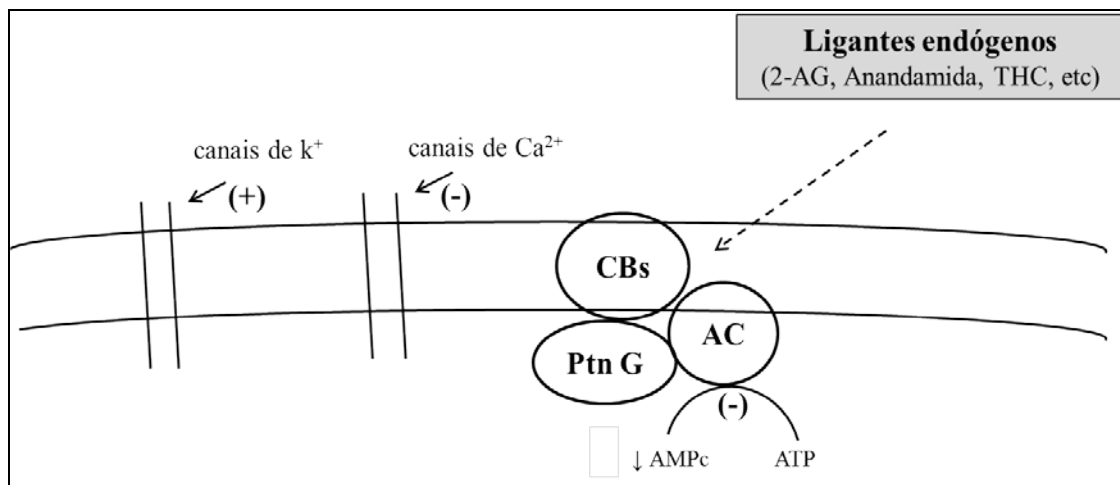


Figura 3 - Via dos receptores CBs acoplados a proteína G. Os ligantes endógenos ligam-se aos receptores CBs, inibindo a AC bloqueando os canais de Ca^{+2} e abrindo os canais de K^+ . Bloqueio da sinalização por meio de ligantes (---➔)

Os endocanabinóides agem como mediadores locais e são rapidamente hidrolisados pelas enzimas fosfolipase N-acilfosfatidiletalona-seletiva (FAAH) e lipase sn-1-diacilglicerol seletiva (DAG Lipase) (LI et al., 2011; GAMAGE; LICHTMAN, 2012). É importante ressaltar que os ECB não ficam armazenados nas vesículas lisossômicas, mas são prontamente sintetizados e liberados para as células, onde e quando forem necessários. Portanto, a disponibilidade dos ECB é regulada por captação e degradação (MATOS et al., 2006). A enzima de degradação da anandamida (FAAH), quando inativada, determina maior atividade do sistema. Nesse sentido,

estudos demonstraram uma associação entre o polimorfismo no gene da FAAH e obesidade em humanos (SIPE et al., 2005).

A ativação patológica do sistema endocanabinóide contribui para o ganho de peso, redução da sensibilidade à insulina e intolerância à glicose, sendo esses efeitos reduzidos pelo uso de bloqueadores dos receptores CB₁ (LI et al., 2011). A ativação do receptor CB₁ estimula o núcleo hipotalâmico e o sistema límbico desencadeando respectivamente um efeito orexígeno e maior motivação para a alimentação. Nos tecidos periféricos, os receptores CB₁ estão relacionados ao aumento da lipogênese (tecido adiposo, fígado, trato gastrointestinal e músculo esquelético) alterando assim o metabolismo da glicose. Especula-se que na obesidade o sistema endocanabinóide permaneça ativado (DAMIANI; DAMIANI, 2011).

Segundo Engeli et al. (2005), os endocanabinóides estão aumentados no plasma de humanos obesos, e seus níveis estão inversamente relacionados com a atividade da FAAH, apontando para uma hiperatividade do SECB em estados de obesidade (MATOS et al., 2006) levando a síndrome metabólica (Figura 4).

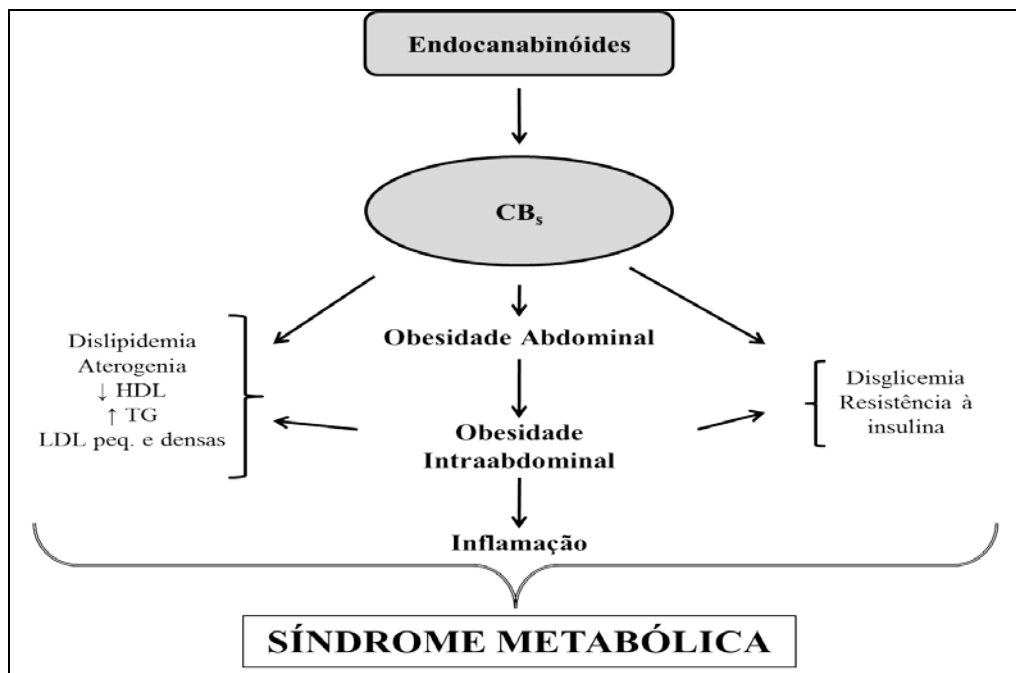


Figura 4 - Hiperatividade do Sistema Endocanabinóide e desenvolvimento da síndrome metabólica.

A localização dos receptores CBs é altamente relevante para suas funções. Eles estão localizados principalmente no hipocampo e gânglios basais e altamente expressos na região cerebral, onde é esperado o efeito psicoativo do Δ^9 -THC (TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010). Nos tecidos periféricos são encontrados em adipócitos, fígado, pâncreas e músculo esquelético, possivelmente onde os efeitos metabólicos dos canabinóides são exercidos (NISOLI, 2010; GAMAGE; LICHTMAN, 2012; NAM et al., 2012).

Os receptores CB₁ foram clonados de tecidos de ratos, camundongos e humanos e apresentam uma similaridade entre espécies. Os receptores CB₂ possuem cerca de 50% de similaridade com os receptores CB₁ e são geralmente expressos em níveis mais baixos (CONSOLE-BRAM et al., 2012). Os receptores CB₂ são expressos nas células imunes (especialmente derivados de macrófagos e neurônios) (PACHER; MACKIE, 2012) e também são encontrados em outras estruturas periféricas (TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010).

São muitas as evidências que demonstram a ação anti-inflamatória dos canabinóides, e supostamente esses efeitos são mediados pelos receptores CB₂ (CABRAL et al., 2009), inibindo a produção de citocinas (EHRHART et al., 2005) e diminuindo a apresentação de antígenos e modulação da migração celular. Recentemente, foi relatado que os canabinóides podem reduzir a inflamação por promover apoptose celular (RIEDER et al., 2009). Em geral, o SEDC tem sido proposto como um sistema endógeno protetor contra resposta inflamatória/imune em múltiplas patologias que acomete o sistema nervoso central (ZOPPI et al., 2011). Além do efeito antiinflamatório, os canabinóides, como por exemplo, o canabidiol, exerce efeito antioxidante e neuroprotetor (MECHA et al., 2012).

Diversas funções são atribuídas ao sistema endocanabinóide. Entre elas, existem relatos da eficácia dos canabinóides no controle da dor, da êmese, no alívio dos sintomas da esclerose múltipla, na regulação do apetite, obesidade, dentre outras desordens fisiológicas (MAKRIYANNIS et al., 2005).

A presença dos receptores canabinóides nos adipócitos, bem como o aumento do nível dos endocanabinóides na obesidade sugere o envolvimento do sistema endocanabinóide na síndrome metabólica.

5. Receptores proliferadores peroxissomais (PPARs)

Os PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) foram identificados inicialmente em roedores e desde então suas propriedades fisiológicas são exploradas (CHRISTOULIDES et al., 2010). Dentro dessa subfamília, três subtipos com similaridade significativa de sequência de aminoácidos e codificados por genes diferentes já foram caracterizados, sendo estes PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) e PPAR γ (NR1C3) (POULSEN et al., 2012). Os três subtipos de receptores estão presentes na maioria dos tecidos, embora apresentem padrões de expressão tecidual diferenciado (PEREIRA, 2008).

A designação do nome PPAR se deve ao fato da ativação do PPAR α primeiro receptor descoberto, mas não de PPAR β/δ , promover a proliferação de peroxissomos em hepatócitos de roedores (CHRISTOULIDES et al., 2010). Os peroxissomos são organelas responsáveis por reações de oxidação ligadas ao metabolismo energético e sua propagação resulta em hepatomegalia e carcinogênese em roedores, porém esses efeitos não foram observados em humanos (EVANS et al, 2004).

Os PPARs são considerados sensores metabólicos, que, de acordo com os sinais lipídicos, atuam na expressão gênica de modo a promover ações adaptativas relacionadas à homeostase lipídica e energética, atuando especialmente na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina (HUANG et al., 2009). Além das ações metabólicas, são demonstrados efeitos importantes em diversos processos fisiológicos, tais como no desenvolvimento e diferenciação celular, em processos inflamatórios, dentre outros (CHRISTOULIDES et al., 2010; POULSEN, 2012).

A ativação dos PPARs desencadeia atividades anti-inflamatórias em vários tipos de células pela redução da expressão de genes próinflamatórios, incluindo a produção de citocinas, metaloproteases e proteínas inflamatórias de fase aguda. PPARs regulam negativamente a transcrição de genes da resposta inflamatória inibindo a via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B). A ativação de PPAR pode diminuir a ativação de vias apoptóticas na isquemia induzidas por meio do aumento da expressão e atividade de várias enzimas antioxidantes (FUNG et al., 2012).

A variedade de ações que os PPARs exercem reflete a diversidade de ligantes que podem ser acomodados dentro de suas bolsas de ligação. Os ligantes naturais de PPARs incluem ácidos graxos saturados e insaturados, que podem servir ainda de substratos enzimáticos para geração de seus derivados com atividade agonista sobre

esses receptores, tais como prostaglandinas e leucotrienos. A produção dos ligantes pode ser influenciada tanto por condições fisiológicas (alimentação, privação de alimentos e exercício) quanto por condições fisiopatológicas (inflamação crônica, diabetes, aterosclerose, dentre outras) envolvidas na síndrome metabólica (MICHALIK et al., 2006).

O PPAR γ é um importante regulador da sensibilidade à insulina. A principal hipótese para o efeito sensibilizador dos agonistas de PPAR γ , a de que, quando ativado, ele regula a transcrição de genes que expressam proteínas que participam da captação e armazenamento de ácidos graxos, e redirecionamento dos lipídios depositados no músculo e no fígado para os adipócitos. Além disso, o PPAR γ promove a diferenciação celular, originando novos adipócitos, os quais são mais sensíveis à insulina e representam, também, um aumento na capacidade de armazenamento de ácidos graxos, reduzindo o acúmulo em tecidos periféricos (PEREIRA, 2008).

Dessa forma, os PPARs atuam de modo integrado e são considerados alvos importantes para o tratamento das desordens fisiológicas, como obesidade e inflamação, característicos da síndrome metabólica.

6. Canabinóides e PPAR γ

Estudos mostram que os compostos análogos aos canabinóides podem interagir com os receptores PPAR γ . Segundo Liu et al. (2003), o ácido julêmico (análogo sintético do THC) liga-se ao receptor PPAR γ ativando-o, e conseqüentemente estimula a diferenciação de fibroblastos em adipócitos. O efeito antiinflamatório desse composto foi sugerido por meio da ativação desse receptor seguido da inibição da atividade da citocina próinflamatória interleucina-8 (IL-8). Foi atribuído ao ácido julêmico propriedades antidiabéticas através da ligação com PPAR γ (BURSTEIN, 2005).

Os fitocanabinóides bioativos Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e o cannabidiol ativam o receptor PPAR γ , estimulam a adipogênese e causam a dilatação de vasos e artérias isoladas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (O'SULLIVAN et al., 2009), ocorrendo um aumento da síntese da superóxido dismutase (SOD) promovendo a vasodilatação (O'SULLIVAN et al., 2009a).

Os endocanabinóides anandamida e o 2-AG ativam o PPAR γ estimulando a diferenciação de fibroblastos em adipócitos (GASPERI et al., 2007) e apresentam ainda efeito antiinflamatório através da inibição da secreção da citocina próinflamatória interleucina-2 (IL-2) (ROCKWELL; KAMINSKI, 2004).

A estimulação da adipogênese é uma propriedade dos ligantes de PPAR (MULLER et al., 2002) e, curiosamente, os níveis dos endocanabinóides encontram-se elevados durante a diferenciação dos adipócitos (MATIAS et al., 2006). Segundo Karaliota et al. (2009), a anandamida aumenta a diferenciação dos adipócitos e causa *upregulation* dos receptores PPAR γ e CB $_1$.

Outros canabinóides que estimulam a atividade de PPAR γ incluem os agonistas sintéticos WIN 55212-2 e CP 55940 (O'SULLIVAN et al., 2006a). O WIN 55212-2 diminui a expressão de moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1) no endotélio cerebral em modelo experimental de esclerose múltipla (MESTRE et al., 2009). O agonista dos receptores CBs, o HU 210, induz a adipogênese e aumenta a expressão de mRNA de PPAR γ intracelular (MATIAS et al., 2006), sugerindo assim, a ativação do PPAR γ . É importante ressaltar que antagonistas dos receptores CB $_1$, como por exemplo, o rimonabant, pode ativar o PPAR γ , mostrando que nem todos os efeitos das drogas utilizadas no tratamento da obesidade são devido às interações dos endocanabinóides e os receptores CB $_1$ (Figura 5) (O'SULLIVAN et al., 2009c).

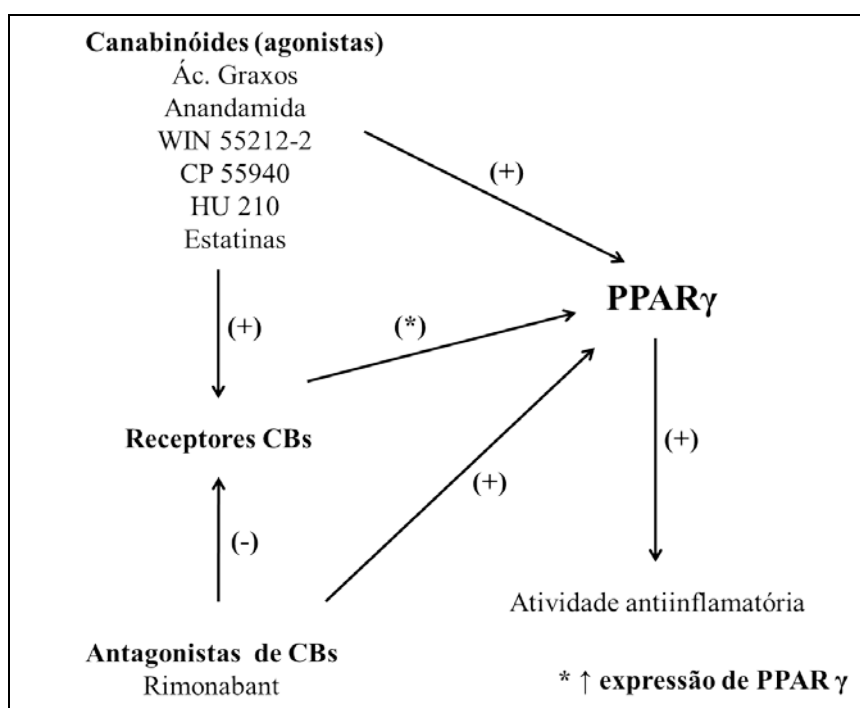


Figura 5 - Possíveis interações entre os canabinóides, receptores CBs e PPAR.

7. Mecanismos de interação entre os canabinóides e PPARs

O'sullivan e colaboradores (2009) mostraram que os canabinóides ativam os PPARs, apresentando atividade antiinflamatória e ativando receptores nucleares, podendo assim, representar um novo mecanismo pelo qual os canabinóides modulam as condições inflamatórias.

Estudos demonstram que os PPARs têm suas atividades mediadas pela ligação direta dos endocanabinoides, anadamida e 2-AG. Além disso, sugere-se que a ativação do receptor CB1 pelo 2-AG desencadeia uma sinalização envolvendo o PPAR e NF κ B (DU et al., 2011; CONSOLE-BRAM et al., 2011). Entretanto, os canabinóides são agentes lipofílicos e o mecanismo pelo qual eles podem ultrapassar a barreira difusional no citosol intracelular não está claro. Recentemente, Kaczocha et al. (2009), demonstraram que proteínas com alta afinidade por ácidos graxos podem atuar como transportadores intracelulares de anandamida e que estas proteínas podem direcionar os endocanabinóides para o complexo enzimático intracelular.

Outro possível mecanismo é que a ativação dos receptores de superfície celular CBs inicia uma cascata de sinalização intracelular que pode ser estimulada indiretamente pela ativação de PPAR. Por exemplo, as estatinas aumentam a função de PPAR em macrófagos através da ativação da via MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (YANO et al., 2007) e podem também ser ativados pela estimulação dos receptores canabinóides (DEMUTH; MOLLEMAN, 2006). Isso mostra que existe uma similaridade estrutural entre os canabinóides e ligantes PPAR utilizados clinicamente (O'SULLIVAN et al., 2009).

Está claro que os canabinóides apresentam efeito inibitório na função das células imunes (KLEIN; CABRAL, 2006). Dessa forma, acredita-se que drogas derivadas dos canabinóides são capazes de atenuar o processo inflamatório de doenças crônicas. Assim, sugere-se que os canabinóides inibem os receptores CBs e ativam os receptores PPARs, atenuando o processo inflamatório envolvido em diversas desordens metabólicas, como é o caso de algumas drogas terapêuticas, como o rimonabant, que apresenta efeito benéfico sob a inflamação (RANDALL et al., 2007).

A figura 5 mostra a relação entre as vias de sinalização dos receptores CB $_s$ e PPAR γ .

Assim, são crescentes as evidências dos efeitos positivos da ativação dos receptores PPARs e canabinóides nas patologias envolvendo a síndrome metabólica. Alguns compostos canabinóides endógenos e sintéticos mostram efeitos na modulação de ambas as vias de sinalização, tendo um grande potencial para o desenvolvimento de drogas com atividade sinérgica, nas quais podem apresentar um efeito terapêutico.

8. Considerações Finais

O aumento da incidência da síndrome metabólica no mundo é um fator que justifica os estudos visando a descoberta de produtos ativos para o tratamento e prevenção das desordens fisiológicas envolvidas nesse processo. O desenvolvimento das patologias que compõem a síndrome metabólica está relacionado ao sistema endocanabinóide e aos receptores PPARs. Neste contexto, são necessárias novas pesquisas que abordem a interação entre esses receptores, bem como a relação desses mecanismos no desenvolvimento e tratamento dessa alteração metabólica.

Agradecimentos

As agências de fomento, FAPEMIG, CNPq e CAPES.

9. Referências Bibliográficas

- ADIELS, M.; TASKINEM, M-R.; BORÉN, J. Fatty Liver, Insulin Resistance, and Dyslipidemia. *Curr. Diab. Rep.* v.8, 60–64, 2008.
- AVRAM, A.S. Subcutaneous fat in normal and diseased states. 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53, 671– 683, 2005.
- BOOZ, G.W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1054-1061, 2011.
- BURSTEIN, S. PPAR γ : A nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci.* 77, 1674-1684, 2005.
- CABRAL, G.A.; GRIFFIN-THOMAS, L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB₂ in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert. Rev. Mol. Med.* 11, 3-10, 2009.

- CHRISTODOULIDES, C.; VIDAL-PUIG, A. PPARs and adipocyte function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 318, 61-68, 2010.
- CONSOLE-BRAM, L.; MARCU, J.; ABOOD, M.E. Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog. Neuropsychopharmacology Biol. Psych.* 38, 4-15, 2012.
- DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. *Rev. Bras.Clin. Med.* 9(2):138-45, 2011.
- DEMUTH, D.G., MOLLEMAN, A. Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 78, 549–563, 2006.
- DU, H.; CHEN, X.; ZHANG, J.; CHEN, C. Inhibition of COX-2 expression by endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol es mediated via PPAR-gamma. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1533-1549, 2011.
- EHRHART, J.; OBREGON, D.; MORI, T.; HOU, H.; SUN, N.; BAI, Y., et al. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J. Neuroinflammation CB2.* 29, 2005.
- ENGELI, S.; BÖHNKE, J.; FELDPAUSCH, M.; GORZELNIAK, K.; JANKE, J.; BÁTKAI, S. et al. Activation of the peripheral Endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes.* 2838-2843, 2005.
- EVANS, R.M.; BARISH, G.D.; WANG, Y. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Med.* 10, 1-7, 2004.
- FILHO, F.F.R.; MARIOSA, L.S.; FERREIRA, S.R.G.; ZANELLA, M.T. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais que uma simples associação. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 50, 230-238, 2006.
- FRANCISCHETTI, E. M.; ABREU, V. G. O sistema endocanabinóide: Novas perspectivas no controle de fatores de risco cardiometabólico. *Arq. Bras. Cardiol.* 87, 548-558, 2006.

- FUNG, A.; VIZCAYCHIPI, M.; LLOYD, D.; WAN, Y.; MA, D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: Mechanistic prospects. *Brain Res.* 1446:144-55, 2012.
- GAMAGE, T.F.; LICHTMAN, A.F. The Endocannabinoid System: Role in energy regulation. *Pediatr. Blood Cancer.* 58, 144-148, 2012.
- GASPERI, V.; FEZZA, F.; PASQUARIELLO, N.; BARI, M.; ODDI, S.; AGRO, A.F. Endocannabinoids in adipocytes during differentiation and their role in glucose uptake. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 219–229, 2007.
- GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRIGUEZ-CASADO, A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacol. Res.* 64, 438-455, 2011.
- HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. *Química Nova.* 29, 318-325, 2006.
- HUANG, T.H-W.; TEOH, A.W.; LIN, B.L.; LIN, D.S-H.; ROUFOGSLIS, B. The role of herbal PPAR modulators in the tratament of cardiometabolic syndrome. *Pharmacol. Res.* 60, 195-206, 2009.
- KACZOCHA, M.; GLASER, S.T.; DEUTSCH, D.G. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 6375–6380, 2009.
- KARALIOTA S.; SIAFAKA-KAPADAI A.; GONTINOU C.; PSARRA K.; MAVRI-VAVAYANNI M. Anandamide Increases the Differentiation of Rat Adipocytes and Causes PPARgamma and CB1 Receptor Upregulation. *Obesity.* 2009.
- KLEIN, T.W.; CABRAL, G.A. Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 50–64, 2006.
- LI, C.; JONES, P.M.; PERSAUD, S.J. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacol. Ther.* 129, 307-320, 2011.

LIU, J.; LI, H.; BURSTEIN, S.H.; ZURIER, R.B.; CHEN, J.D. Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol. Pharmacol.* 63, 983–992, 2003.

MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 299–325, 2008.

MAKRIYANNIS, A., MECHOULAM, R., PIOMELLI, D. Therapeutic opportunities through modulation of the endocannabinoid system. *Neuropharmacology.* 48, 1068-1071, 2005.

MATIAS, I.; GONTHIER, M.P.; ORLANDO, P.; MARTIADIS, V.; DE PETROCELLIS, L.; CERVINO, C. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 3171–3180, 2006.

MATOS, A. F. G.; GUEDES, E. P.; SOUZA, L. L.; VALÉRIO, C. M. O sistema endocanabinóide: Novo paradigma no tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 50, 390-399, 2006.

MAYNADIER, M.; BASILE, I.; GARY-BOBO, M. Adiponectin normalization: a clue to the anti-metabolic syndrome action of rimonabant. *Drug Discov. Today.* 14, 192-197, 2009.

MECHA, M.; TORRAO, A.S.; MESTRE, L.; CARRILLO-SALINAS, F.J.; MECHOULAM, R.; GUAZA, C. Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulun stress. *Cell Death and Disease.* 331, 1-8, 2012.

MESTRE, L.; DOCAGNE,F.; CORREA,F.; LORÍA, F.; HERNANGÓ MEZ, M.; BORRELL, J.; GUAZA,C. A cannabinoid agonist interferes with the progression of achronic model of multiple sclerosis by down regulating adhesion molecules. *Mol.Cell Neurosci.* 40, 258–266, 2009.

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J.P.; CHATTERJEE, V.K.; GLASS, C.K.; GONZALES, F.J.; GRIMALDI, P.A.; KADOWAKI, T.; LAZAR, M.A.; O'RAHILLY,

S.; PALMER, C.N.A. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 726-741, 2006.

MUELLER, E.; DRORI, S.; AIYER, A.; YIE, J.; SARRAF, P.; CHEN, H. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 41925–44193, 2002.

NAM, D.H.; LEE, M.H.; KIM, J.E.; SONG, H.K.; KANG, Y.S.; LEE, J.E.; KIM, H.W.; CHA, J.J.; HYUN, Y.Y.; KIM, S.H.; HAN, S.Y.; HAN, K.H.; HAN, J.Y.; CHA, D.R. Blocade of cannabinoid receptor 1 improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in db/db mice. *Renal Cardiac. Vascular.* 153, 1387-1396, 2012.

NISOLI, E. Endocannabinoids and obesity development-the adipose tissue. *Drug discov. Today: Disease Mechanisms.* 7, 199-204, 2010.

OLUKMAN, M.; SEZER, E.D.; ULKER, S.; SÖZMEN, E.Y.; CINAR, G.M. Fenofibrate treatment enhances antioxidant status and attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp. Diabetes Res.* 2010, 1-10, 2010.

O’SULLIVAN, S. E.; KENDALL, D.A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology.* 2009c.

O’SULLIVAN, S.E.; BENNETT,A.J.; KENDALL,D.A.; RANDALL,M.D. Cannabinoids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *Proc. Int. Cannabinoid Res.Soc.* 2006a.

O’SULLIVAN, S.E.; SUN, T.; BENNETT, A.J.; RANDALL, M.D.; KENDALL, D.A. Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 612, 61-68, 2009.

O’SULLIVAN, S.E.; SUN, Y.; BENNETT, A.J.; RANDALL, M.D.; KENDALL, D.A. Time- dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 612, 61–68, 2009.

O'SULLIVAN, S.E.; SUN, Y.; BENNETT, A.J.; RANDALL, M.D.; KENDALL, D.A. Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *J. Pharmacol.* 612, 61–68, 2009a.

PACHER, P.; MACKIE, K. Interplay of cannabinoid 2 (CB₂) receptors with nitric oxide synthases, oxidative and nitrative stress, and cell death during remote.

PACKER, L.; SIES, H. *Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome*. 332p, 2008.

PEREIRA, V.C. *Atividade agonista do extrato de Tabebuia heptaphylla sobre os receptores proliferadores peroxissomais alfa (PPAR γ), beta/delta (PPAR β/δ) e gama (PPAR γ)*, 2008. Dissertação (Mestrado), Pós-Graduação em Ciência da Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

POULSEN, L.L.C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Sem. Cell Dev. Biol.* 1-9, 2012.

QUINTELA, A.M.; JIMÉNEZ, R.; GÓMEZ-GUZMÁN, M.; ZARZUELO, M.J.; GALINDO, P.; SÁNCHEZ, M.; VARGAS, F.; COGOLLUDO, A.; TAMARGO, J.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F.; DUARTE, R. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ) prevents endothelial dysfunction in type 1 diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 730-741, 2012.

RANDALL, M.D.; KENDALL, D.A.; BENNETT, A.J.; O'SULLIVAN, S.E. Rimonabant in obese patients with type 2 diabetes. *Lancet.* 369, 555, 2007.

RIEDER, S.A.; CHAUHAN, A.; SINGH, U.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI P. Cannabinoid- induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology.* 2009.

ROCKWELL, C.E.; KAMINSKI, N.E. A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 683–690, 2004.

RUEDA-CLAUSEN, C.F.; DAVIDGE, S.T. Potential role of GPCRs as signal transducers in early programming of metabolic syndrome. *Drug Discov. Today: Disease Models*. 341, 1-6, 2012.

SCOARIS, C.R.; RIZO, G.V.; ROLDI, L.P.; MORAES, S.M.F.; PROENÇA, A.R.G.; PERALTA, R.M.; NATALI, M.R.M. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition*. 26:312-320, 2010.

SIPE, J. C.; WAALLEN, J.; GERBER, A.; BEUTLER, E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Int. J. Obes*. 29, 755-759, 2005.

SVÍZENSKÁ, I.; DUBOVÝ, P.; SULCOVÁ, A. Cannabinoids receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures – A short review. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 90, 501-511, 2008.

TANASESCU, R.; CONSTANTINESCU, C.R. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology*. 1-10, 2010.

VALENZUELA, C.; AGUIRRE, C.; CASTILLO, V.; RONCO, A. M.; LLANOS, M. Participación del sistema endocanabinoide en el desarrollo de obesidad. *Rev. Med. Chile*. 138, 621-629, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact sheet: obesity and overweight. Available at: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>. Accessed March 21, 2012.

YANO, M.; MATSUMURA, T.; SENOKUCHI, T.; ISHII, N.; MURATA, Y.; TAKETA, K. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ. Res*. 100, 1442-1451, 2007.

ZOPPI, S.; NIEVAS, B. G. P.; MADRIGAL, J. L. M.; MANZANARES, J.; LEZA, J. C.; GARCÍA-BUENO, B. Regulatory role of cannabinoid receptor I in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*. 36, 805-818, 2011.

**ARTIGO 3: EXTRATO DE *MANGIFERA INDICA* E
MANGIFERINA MODULAM RECEPTORES E MARCADORES DE
RISCO METABÓLICO NO TECIDO ADIPOSEO DE ANIMAIS**

Extrato de *Mangifera indica* e mangiferina modulam receptores e marcadores de risco metabólico no tecido adiposo de animais

BRITO, LF^{1*}; QUEIROZ, JH¹; TOLEDO, RCL¹; CARVALHO, IMM¹; MAZIOLI, R¹; LEITE, JPVL¹; FIETTO, LG¹; RIBEIRO, SMR²; PELUZIO, MCG²; MAFRA, CL¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular; ²Departamento de Nutrição e Saúde; Universidade Federal de Viçosa, Av, PH Rolfs, s/n, Cep: 36571-001, Viçosa-Brasil. *jqueiroz@ufv.br

Resumo

Objetivo: Avaliar o efeito da mangiferina e do extrato de folhas de manga na expressão de genes associados à adipogênese e marcadores de risco metabólico, no tecido adiposo de ratos alimentados com dieta de cafeteria.

Material e Métodos: Ratos *wistar* foram tratados por gavagem com mangiferina (40mg/kg) e extrato da folha de manga (250mg/kg) durante oito dias. A ingestão alimentar e o peso corporal foram medidos diariamente. Após eutanásia, o tecido adiposo foi removido para quantificar a expressão dos receptores CB₁, PPAR γ e dos marcadores leptina, resistina e adiponectina por RT-PCR.

Resultados: O ganho de peso não apresentou diferença estatística entre os grupos, entretanto, o consumo alimentar foi menor no grupo que recebeu o extrato. Ambos os grupos de tratamento, mangiferina e extrato, diminuíram a massa do tecido adiposo. No grupo que recebeu o extrato a expressão do receptor CB₁ e da resistina diminuíram enquanto a expressão da adiponectina aumentou. O extrato não apresentou efeito na expressão da leptina. O grupo que foi tratado com a mangiferina apresentou dados inversos, ou seja, diminuiu a expressão da adiponectina e da leptina e aumentou a expressão do receptor CB₁. Todos os dados apresentaram significância de 95%.

Conclusão: O extrato da folha de manga atenuou o efeito da adipogênese através da modulação dos marcadores de risco metabólico enquanto a mangiferina exacerbou o processo adipogênico de acordo com os marcadores analisados.

Palavras chave: Mangiferina, extrato de folha de manga, CB₁, PPAR γ , adiponectina, resistina, leptina.

Abstract

Objective: To evaluate the effect of mangiferin and mango leaf extract on the expression of genes associated with adipogenesis and metabolic risk markers in adipose tissue of rats fed a cafeteria diet.

Material and Methods: Wistar rats were treated by gavage with mangiferin and extract for eight days. Food intake and body weight were measured daily. After euthanasia, the adipose tissue was removed to check the expression of CB₁ receptors, PPAR γ and markers leptin, resistin and adiponectin by RT-PCR.

Results: Weight gain presented no alteration; however, food consumption was lower in the group given the extract. Both treatment groups (mangiferin and extract) decreased adipose tissue mass. In the group receiving the extract, CB₁ receptor expression and resistin decreased while the expression of adiponectin has increased. The group treated with mangiferin presented reverse data, ie, has decreased the expression of leptin and adiponectin and increased the expression of CB₁ receptor. All data showed significance of 95%.

Conclusion: The leaf extract sleeve attenuated the effect of adipogenesis by modulating the metabolic risk markers while mangiferin exacerbated adipogenic process according to the markers analyzed.

Keywords: Mangiferin, mango leaf extract, CB₁, PPAR γ , adiponectin, resistin, leptin.

1. Introdução

A síndrome metabólica (SM) consiste em um conjunto de desordens metabólicas complexas caracterizadas por obesidade central, dislipidemia, intolerância a glicose, aterosclerose, esteatose hepática, diabetes tipo 2, aumento da pressão arterial e inflamação. Está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares^{1,2}.

O acúmulo excessivo de gordura nos principais órgãos e tecidos envolvidos na regulação do metabolismo energético prejudica a sua integridade e leva ao desenvolvimento da inflamação caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias³.

O aumento do tecido adiposo, consequência da adipogênese, é caracterizado por um estado inflamatório. Além da capacidade de armazenar lipídios, o tecido adiposo é responsável por expressar e secretar muitas moléculas biologicamente ativas denominadas adipocinas, tornando-se, portanto, um órgão endócrino. Essas adipocinas

têm estruturas e funções fisiológicas variadas, compreendendo proteínas que desempenham ações importantes na homeostase energética global, nas concentrações plasmáticas do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-6 (IL-6), e outras citocinas inflamatórias, como leptina e resistina, ao mesmo tempo em que ocorre uma diminuição significativa nas concentrações de adiponectina ^{4,5}.

Além dessas citocinas, o tecido adiposo atua na expressão de genes do sistema endocanabinóide agindo na manutenção da homeostase energética e na regulação do metabolismo ⁶, principalmente a lipogênese e aumenta a expressão de genes envolvidos no metabolismo dos lipídios e carboidratos ⁷.

A ativação patológica do sistema endocanabinóide contribui para o ganho de peso, redução da sensibilidade à insulina e intolerância à glicose, sendo esses efeitos reduzidos pelo uso de bloqueadores dos receptores CB₁ ⁸. A ativação do receptor CB₁ estimula o núcleo hipotalâmico e o sistema límbico desencadeando respectivamente um efeito orexígeno e maior motivação para a alimentação. Nos tecidos periféricos, os receptores CB₁ estão relacionados ao aumento da lipogênese (tecido adiposo, fígado, trato gastrointestinal e músculo esquelético) alterando assim o metabolismo da glicose ⁹.

Assim como os receptores CB₁, os PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) são considerados sensores metabólicos, que, de acordo com os sinais lipídicos, atuam na expressão gênica de modo a promover ações adaptativas relacionadas à homeostase lipídica e energética, atuando especialmente na oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos e sensibilidade à insulina¹. Além das ações metabólicas, são demonstrados efeitos importantes em diversos processos fisiológicos, tais como no desenvolvimento e diferenciação celular, inflamação, dentre outros ^{10,11}.

A ativação dos PPARs desencadeia atividades anti-inflamatórias em vários tipos de células pela modulação da expressão de genes pró-inflamatórios, por meio da redução da produção de citocinas, metaloproteases e proteínas inflamatórias de fase aguda ¹².

Estudos farmacológicos apontam produtos naturais que são capazes de modular a expressão de diferentes marcadores. Dentre outros, o extrato aquoso da casca de *Mangifera indica* (*M. indica*) tem sido utilizado como analgésico, antiadipogênico, anti-inflamatório, no tratamento de desordens imunológicas, incluindo bronquite asmática, dermatite atópica e outras condições alérgicas, redução do estresse oxidativo, controle da dor ¹³. A mangiferina é apontada como um dos compostos bioativos presentes no

extrato sendo a principal responsável por esses efeitos ^{14,15}. Além das propriedades farmacológicas citadas, a mangiferina ainda apresenta atividade antiviral, antitumoral, antidiabética, antiobesidade e hipolipimiente ¹⁶. Pesquisas têm evidenciado que a mangiferina reproduz várias das atividades farmacológicas, no entanto, não com a mesma intensidade que os diferentes tipos de extratos, indicando um sinergismo entre os diversos componentes existentes no extrato: compostos fenólicos, terpenóides, sesquiterpenos e microelementos ¹⁷.

O conjunto destas propriedades farmacológicas sugere que a mangiferina e o extrato da folha de *M. indica* tenha potencial valor no tratamento da adipogênese e consequentemente na prevenção da síndrome metabólica e das doenças cardiovasculares.

No Brasil e no estado de Minas Gerais as variedades de *Mangifera indica* mais comercializadas e consumidas são Tommy Atkins, Haden e Palmer ¹⁸. A variedade Ubá, por sua vez, é utilizada na agroindústria da Zona da Mata Mineira para fabricação de sucos e polpas, sendo proveniente de plantações domésticas e de plantios planejados ¹⁹.

Ainda não foram realizados estudos investigando o efeito da mangiferina e do extrato de *Mangifera indica* sobre a expressão de marcadores da adipogênese. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da mangiferina e do extrato das folhas de manga Ubá (*Mangifera indica* L), anarcadiaceae, na modulação da expressão gênica dos receptores CB₁ e PPAR γ e das adipocinas adiponectina, leptina e resistina, em ratos alimentados com dieta de cafeteria.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção do extrato e da Mangiferina

As folhas de *Mangifera indica* L., variedade Ubá, foram coletadas em pomar localizado na Zona da Mata Mineira, no município de Viçosa - MG. As folhas foram secas em temperatura ambiente, trituradas e o pulverizado obtido utilizado para obtenção do extrato. Exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC n^o 37.611).

O extrato das folhas de *M. indica* (Ubá) foi obtido a partir de 1.472,2g da droga vegetal seca por percolação empregando etanol 95%. O extrato obtido foi concentrado a vácuo em evaporador rotativo, em temperatura máxima de 60°C e o solvente residual removido por liofilização, com rendimento de 400g de extrato seco de *M. indica*.

Para o isolamento da mangiferina foram utilizados 582,55g da folha seca e triturada. A amostra foi desengordurada em soxhlet, utilizando como solvente o éter de petróleo, durante 12 horas. A amostra desengordurada foi submetida em seguida a percolação exaustiva com etanol 95%. Ao final, o extrato etanólico obtido foi concentrado em evaporador rotativo, em temperatura máxima de 60°C, obtendo-se 360g de extrato. Após esse processo, o extrato foi submetido a sucessivas recristalizações com acetato de etila obtendo-se 21g de mangiferina. Todo o procedimento de purificação foi monitorado por cromatografia de camada delgada. A pureza do composto foi avaliada por HPLC comparando-se com o cromatograma ao padrão de mangiferina (sigma). A metodologia utilizada nesses processos foi adaptada de Muruganandan et.al., 2002²⁰.

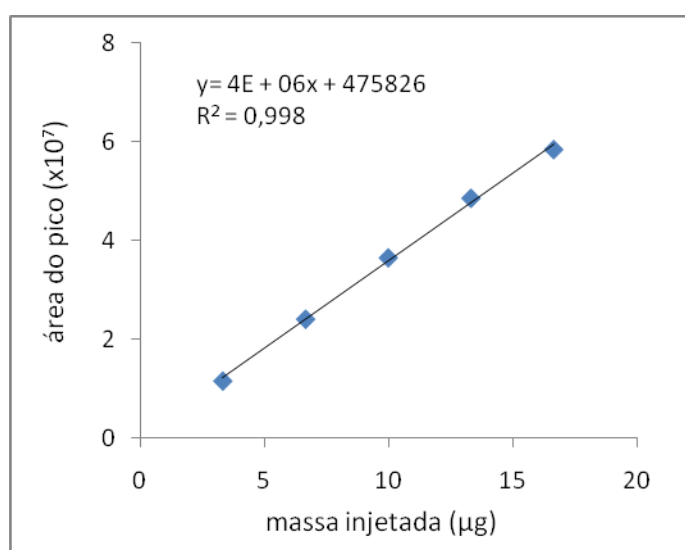
2.1.1. Análise da mangiferina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação de mangiferina no extrato da folha de manga foi realizada de acordo com Ling et al. (2009)²¹, em aparelho HPLC Shimadzu LC-2AD (Shimadzu®, Japão), equipado com detector de arranjo diodo SPD-M20A, coluna C₁₈ (150 x 4,6mm, 4,6µm), com pé -coluna C₁₈. A fase móvel consistiu de solvente A: água acidificada com 0,3% de ácido acético P.A. e solvente B: acetonitrila (grau HPLC). O gradiente iniciou-se com 10% do solvente B e 90% do solvente A por 5 minutos, seguido de 20% do solvente B e 80% do solvente A por 15 minutos, 100% do solvente B por 15 minutos e finalização com 10% do solvente B e 90% do solvente A por 10 minutos para lavagem e restabelecimento das condições iniciais da coluna. O comprimento de onda usado para detecção foi de 254 nm e a temperatura da coluna foi de 40 °C. O fluxo foi de 1 ml/min e o volume injetado foi de 50 µl. Realizou-se a quantificação pelo método de padrão externo com mangiferina, sendo injetados cinco diferentes volumes de solução do padrão a 1mg/ml. Os volumes e massas injetados do padrão e as áreas dos picos obtidos estão descritos na Tabela abaixo. A curva padrão da mangiferina está representada na Figura 1. Dissolveu-se 1mg do extrato em 1,5 ml em solução metanol grau HPLC/água destilada (2:1), filtrando-o em seguida.

Tabela 1 –Volumes e massas do padrão mangiferina injetados no HPLC e áreas de picos obtidas

Volume injetado (µl)	Massa injetada (µg)	Área do pico
5	3,33	11661089
10	6,66	24156048
15	9,99	36572766
20	13,32	48616870
25	16,65	58459838

Figura 1 - Curva padrão da mangiferina e equação obtida a partir da injeção no HPLC de diferentes massas de mangiferina



2.2. Ensaio Biológico

2.2.1. Animais e tratamentos

Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em gaiolas coletivas, apropriadas, com ventilação adequada e em ciclos de luminosidade (claro/escuro) de 12 horas e uma temperatura média de 22°C. O peso corporal individual dos animais e a ingestão alimentar foram acompanhados diariamente a fim de verificar a evolução ponderal dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

Para a indução da adipogênese utilizou-se uma dieta do tipo cafeteria manipulada no próprio laboratório. A distribuição calórica da dieta continha 9,8% de proteínas, 31,3% de carboidratos e 58,8% de lipídios, sendo constituída dos seguintes alimentos: patê de presunto, batata palha, bacon, mortadela, biscoito maisena, achocolatado, leite em pó integral e ração comercial nas proporções de 2:1:1:1:1:1:1.

Durante todo o experimento, os animais foram alimentados com a dieta de cafeteria e água *ad libitum*.

O extrato das folhas de *M. indica*, bem como a mangiferina isolada do mesmo, foram administrados por gavagem concomitantemente as dietas de ratos *Wistar*, na concentração de 250 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente.

2.2.2. Desenho experimental

Foram utilizados no estudo 24 ratos *wistar*, machos, com idade de 4 semanas. O estudo durou 16 dias. Os animais foram divididos em 3 grupos, constituído de 8 animais (n=8), conforme descrito no Quadro 1. Os animais foram alimentados antes do início do experimento, por 8 dias, com dieta comercial e água *ad libitum* para adaptação. Após esse período, os animais receberam dieta de cafeteria. O estudo foi realizado a fim de avaliar o efeito do extrato de *M. indica* e da mangiferina na adipogênese e nos fatores de risco metabólico durante a ingestão da dieta de cafeteria, ou seja, ao mesmo tempo em que foi introduzida a dieta de cafeteria foi também, administrado por gavagem, o extrato das folhas *M. indica* e a mangiferina isolada na concentração proposta. Como veículo, foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO).

O peso e o consumo alimentar dos animais foram verificados diariamente para ajuste da dose da mangiferina e do extrato para avaliação da evolução ponderal.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos

Grupos	Tratamentos
G1	DC + DMSO
G2	DC + 250 mg/kg Extrato
G3	DC + 40 mg/kg Mangiferina

DC – Dieta cafeteria; DMSO - Dimetilsulfóxido

No final do experimento, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas e em seguida eutanasiados sob anestesia com tiopental sódico administrado intra venoso (i.v.) em dose inicial de 30mg/Kg ou em concentração suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal. Após a ausência do reflexo corneal, foi administrado i.v. uma solução saturada de cloreto de potássio para garantir a não consciência do animal. Foi coletado e pesado o tecido adiposo total (visceral e subcutâneo) para as análises da expressão de mRNA por RT-PCR e cálculo do peso relativo.

Todos os procedimentos e análises foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e no Departamento Nutrição e Saúde da UFV, após aprovação do Comitê de Ética da UFV (processo n°. 86/2011 – ANEXO 1).

2.3. Análises da expressão gênica dos receptores CB₁ e PPAR γ , adiponectina, leptina e resistina no tecido adiposo por RT- PCR

O tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos foi utilizado para análise da expressão dos genes. Os 8 animais que compunham os grupos, foram agrupados de 2 em 2 para a extração do mRNA, tendo assim um subgrupo com n=4.

O mRNA do tecido adiposo foi extraído utilizando kit SV total RNA isolation system (Promega), conforme instrução do fabricante. O RNA total foi usado para síntese de cDNA usando o Kit MMLV- Reverse Transcriptase (Invitrogen). A quantificação da expressão gênica foi realizada por RT-PCR utilizando o equipamento AB Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems). Foi utilizado o reagente 2X SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystem) obtendo um volume final para cada reação de 12,5 μ L. Os parâmetros utilizados na corrida foram 15 min a 95° C e em seguida 40 ciclos de 95° C (15s), 60° C (30s) e 72° C (30s), seguido pela análise da curva de melting. Os iniciadores foram: Adiponectina (Fw- AATCCTGCCAGTCATGAAG, Rv- CATCTCCTGGGTCACCCTTA), resistina (Fw- CTACATTGCTGGTCAGTCTCC, Rv- GCTGTCCAGTCTATGCTTCC), Leptina (Fw- CCAGGATGACACCAAACCCTC, Rv- ATCCAGGCTCTCTGGCTTCTGC), PPAR γ (Fw- CATTCTGCTCCACACTATGAA, Rv- CGGGAAGGACTTTATGTATGAG) e CB₁ (Fw- GGGTAGTCCCTTCCAAGAAAAG, Rv- GTCCATAAAGTTCTCCCCACAC).

A quantificação da expressão gênica foi calculada em relação ao controle endógeno β -actina (Fw-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCCACGC, Rv-CCTCTGAACCCTAAGGCCAACCG).

2.4. Análises estatísticas

Foi utilizado o software Sigma Plot para análise descritiva dos dados e para os testes de comparação de grupos independentes. Para avaliação da distribuição das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv. Como as variáveis

apresentaram distribuição normal foi realizada análise paramétrica seguida do teste Tuckey. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Isolamento da mangiferina e confirmação estrutural

O processo de purificação do extrato etanólico obtido das folhas de *Mangifera indica* forneceu 21g de mangiferina, sendo o rendimento de 3,60% a partir da droga seca e 5,83% a partir do extrato. O composto apresentou cromatograma no HPLC com pico único (TR 8.2 min) e espectro UV obtido por arranjo fotodiodo compatível com padrão (Figura 2).

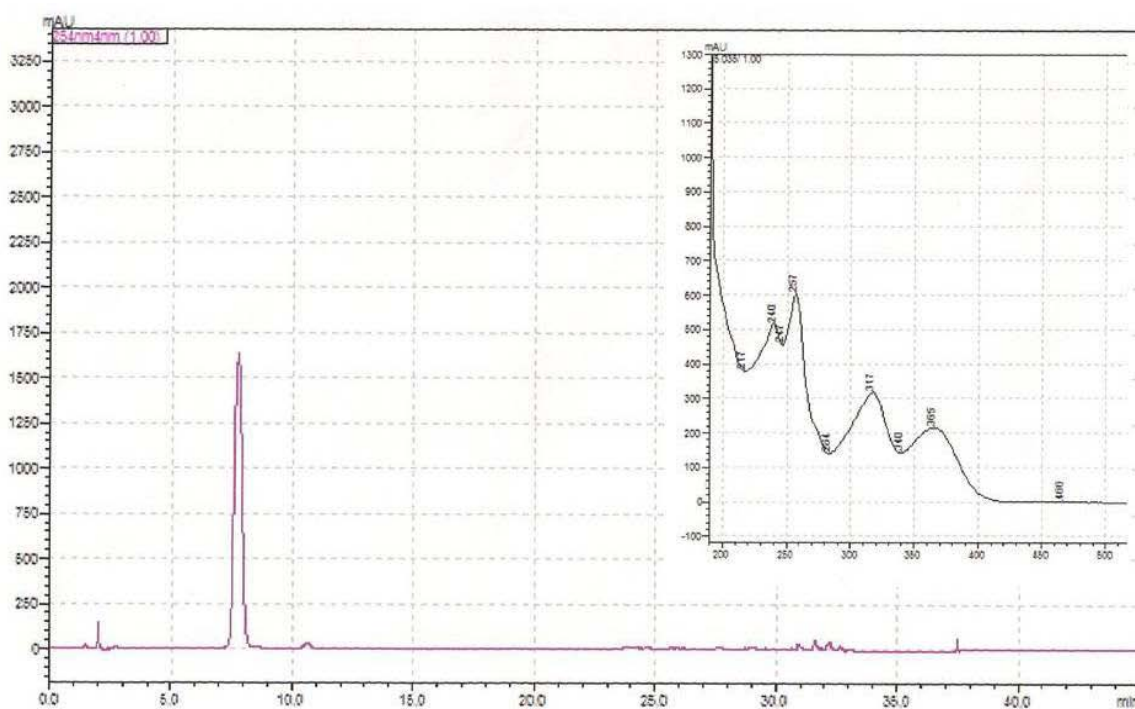


Figura 2 - Cromatograma e espectro UV da mangiferina purificada a partir de folhas de *M. indica*. Condições: detector de arranjo diodo; coluna C18; fase móvel: solvente A 0,3 % ácido acético P.A. e solvente B acetonitrila grau HPLC; gradiente: 10% de B por 5 min, 20% de B por 15, 100% de B por 15 min, 10% de B por 10 min; fluxo: 1ml/min, volume injetado: 50 μ l

3.2. Ganho de Peso e evolução ponderal

Não houve diferença significativa no ganho de peso corporal, porém o consumo alimentar do grupo G2 apresentou valores estatisticamente menores comparados ao grupo G1. O peso do tecido adiposo total foi estatisticamente diferente, sendo, os grupos tratados inferiores ao controle.

Tabela 1 – Consumo, ganho de peso e acúmulo de tecido adiposo (TA) em ratos alimentados com dieta de cafeteria e submetidos a diferentes tratamentos por 8 dias

Grupo	Consumo (g)	Peso (g)	T.A. (g)
G1	117,88±17,26 ^a	49,25±4,51	0,68±0,17 ^a
G2	76,94±9,93 ^b	40,90±5,26	0,33±0,18 ^b
G3	117,82±29,89 ^a	45,75±5,13	0,41±0,09 ^b

Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente significativas pelo teste de tuckey ($p < 0,05$).

TA: tecido adiposo; g: gramas; G1 – Dieta de cafeteria (DC) + DMSO; G2 – DC + Extrato da folha de manga; G3 – DC + mangiferina.

3.3. Análises da expressão gênica dos receptores CB_1 e $PPAR\gamma$, adiponectina, leptina e resistina no tecido adiposo por RT-PCR

Houve diferença significativa na expressão do mRNA da adiponectina nos diferentes grupos (Figura 3).

Em comparação com o grupo controle ($2,22 \pm 0,51$), a expressão da adiponectina reduziu significativamente no grupo que recebeu a mangiferina ($0,48 \pm 0,06$). No grupo que recebeu o extrato da *M. indica* ($6,05 \pm 1,10$) a expressão da adiponectina foi estatisticamente superior, quando comparada ao grupo controle e a mangiferina.

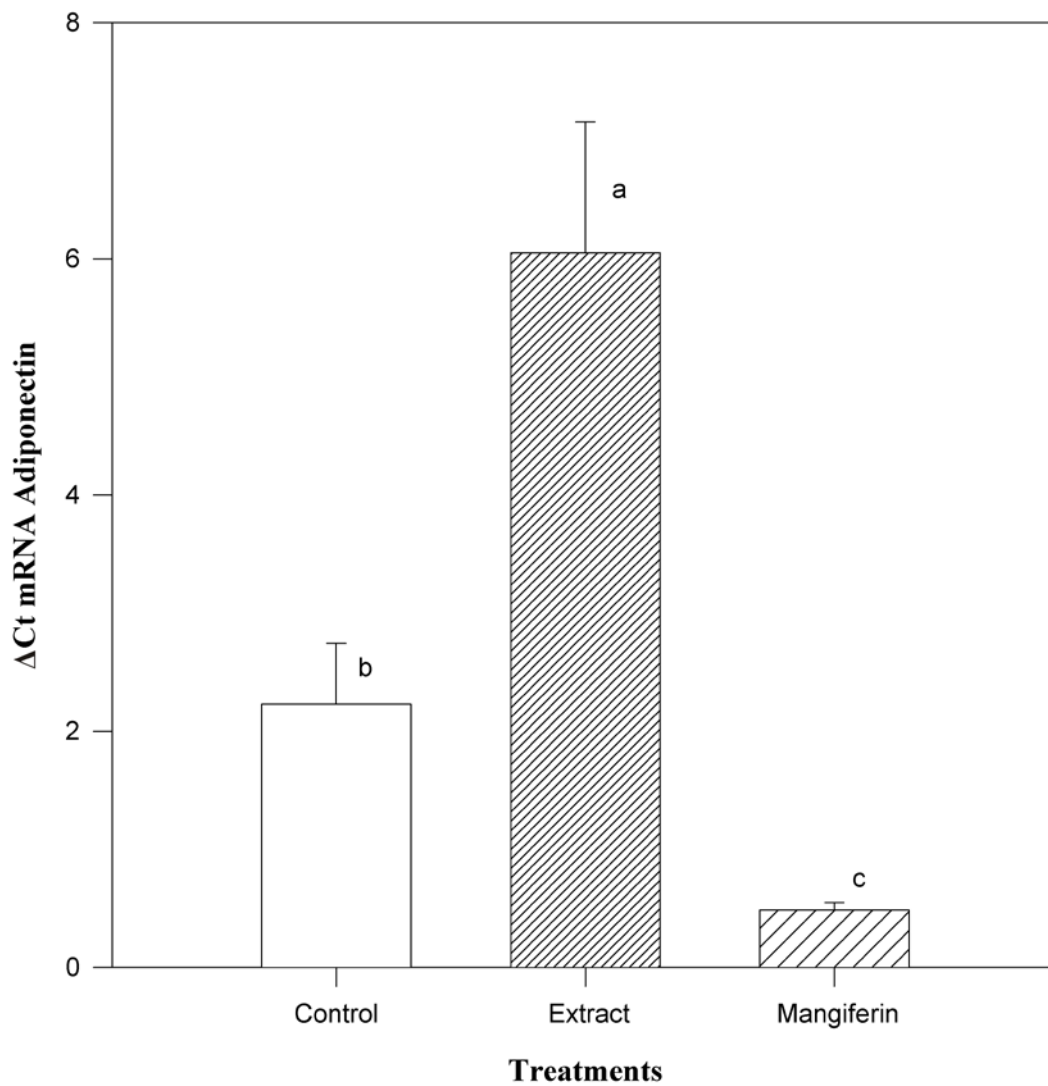


Figura 3 – Expressão do mRNA da adiponectina no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos, durante 8 dias. Control - (Dieta de cafeteria (DC) + DMSO); Extract - DC+extrato da folha de manga; Mangiferin - DC+mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A Figura 4 mostra a diferença da expressão do mRNA da leptina entre os diferentes grupos de tratamento.

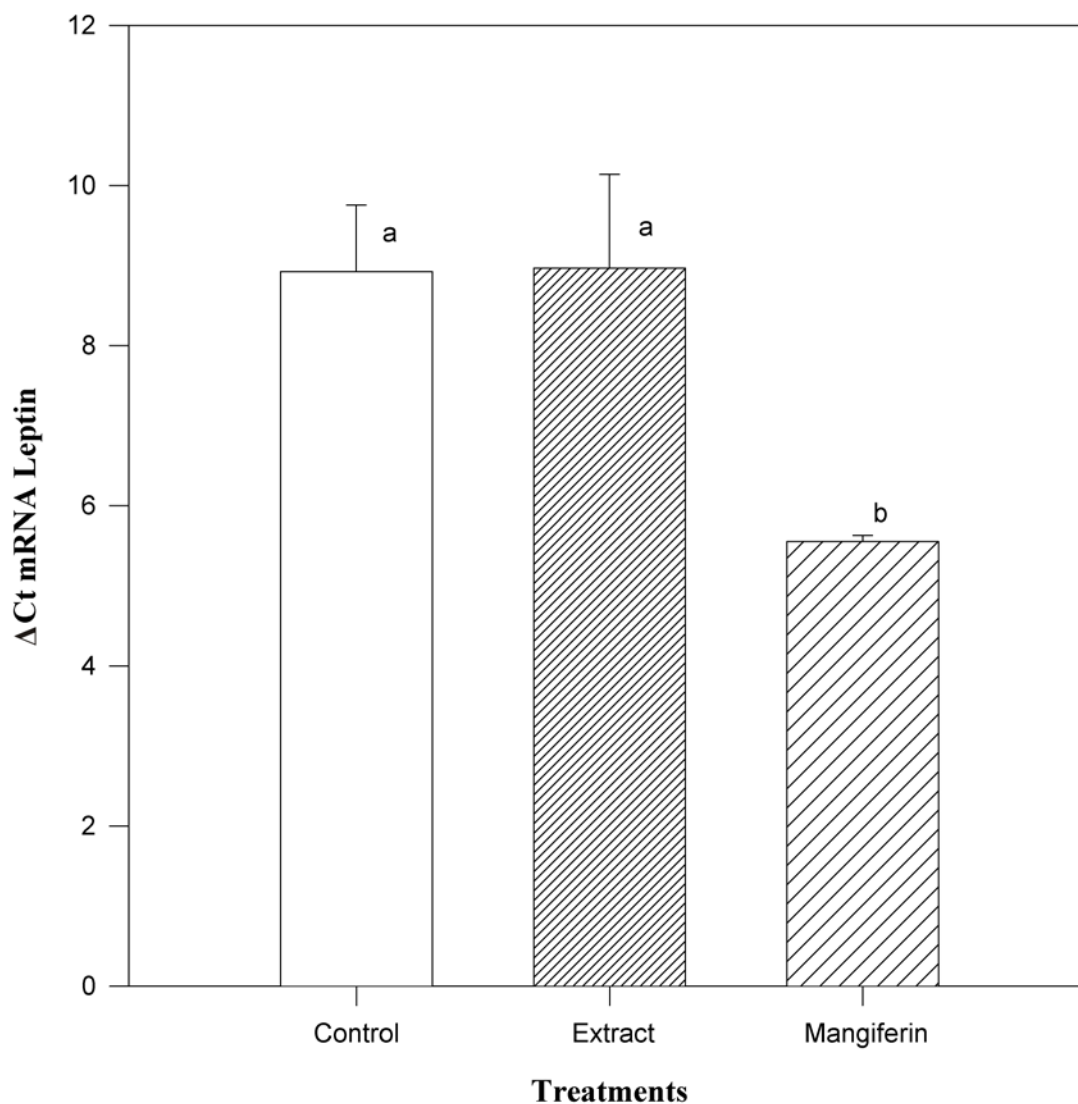


Figura 4 – Expressão do mRNA da leptina no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos, durante 8 dias. Control - (Dieta de cafeteria (DC) + DMSO); Extract - DC+extrato da folha de manga; Mangiferin - DC+mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que os animais que receberam a mangiferina ($5,55 \pm 0,07$) apresentaram uma redução significativa na expressão da leptina quando comparada com os grupos controle ($8,92 \pm 0,83$) e extrato de *M. indica* ($8,96 \pm 1,17$).

A Figura 5 mostra que o extrato de *M. indica* reduziu significativamente a expressão do mRNA da resistina ($4,49 \pm 0,40$) comparado ao grupo controle ($6,89 \pm 1,22$) e ao grupo em que foi administrado a mangiferina ($6,53 \pm 0,45$).

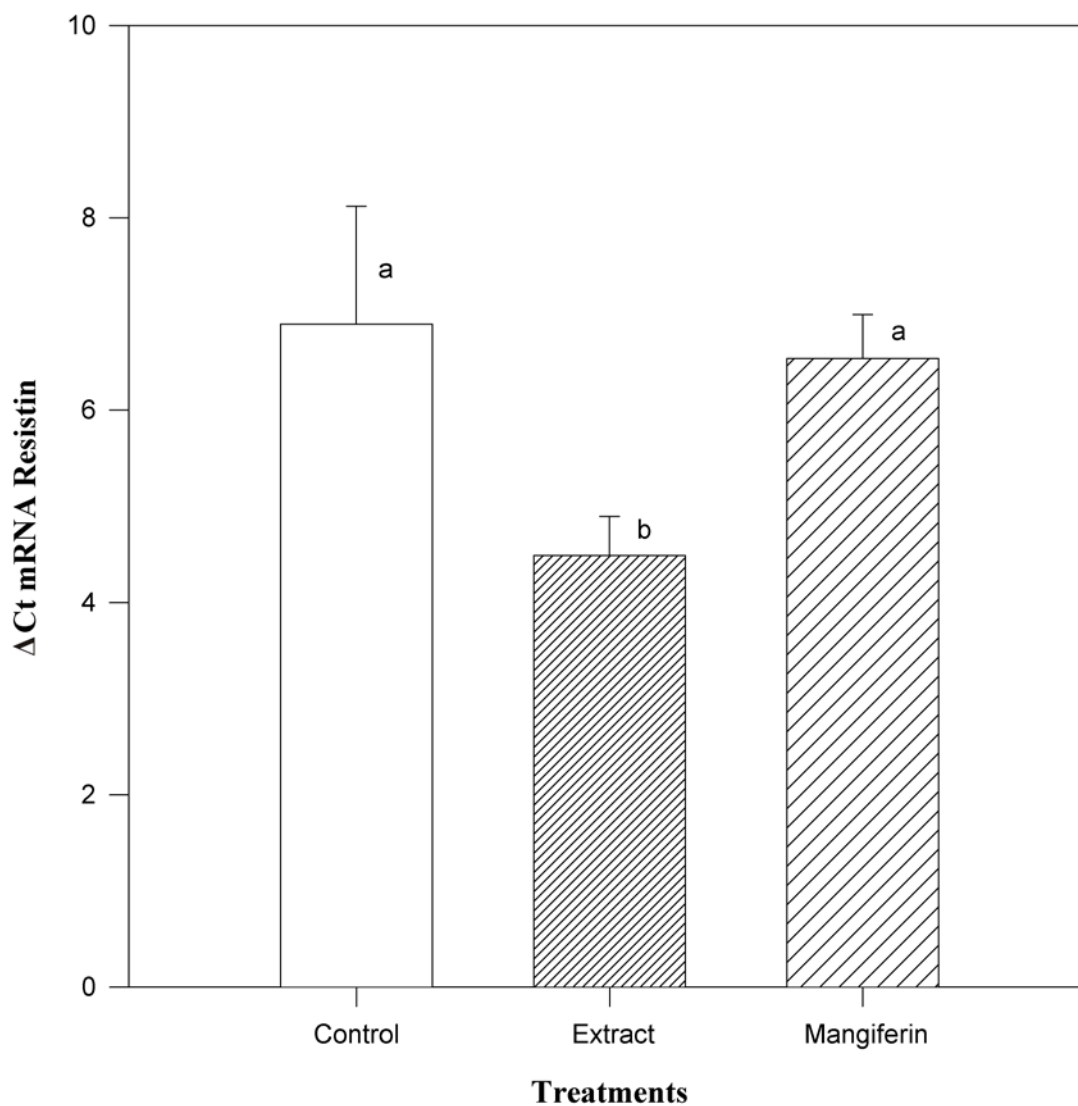


Figura 5 – Expressão do mRNA da resistina no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos, durante 8 dias. Control - (Dieta de cafeteria (DC) + DMSO); Extract - DC+extrato da folha de manga; Mangiferin - DC+mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A expressão do mRNA dos receptores CB₁, conforme Figura 6, foi estatisticamente significativa entre os diferentes grupos.

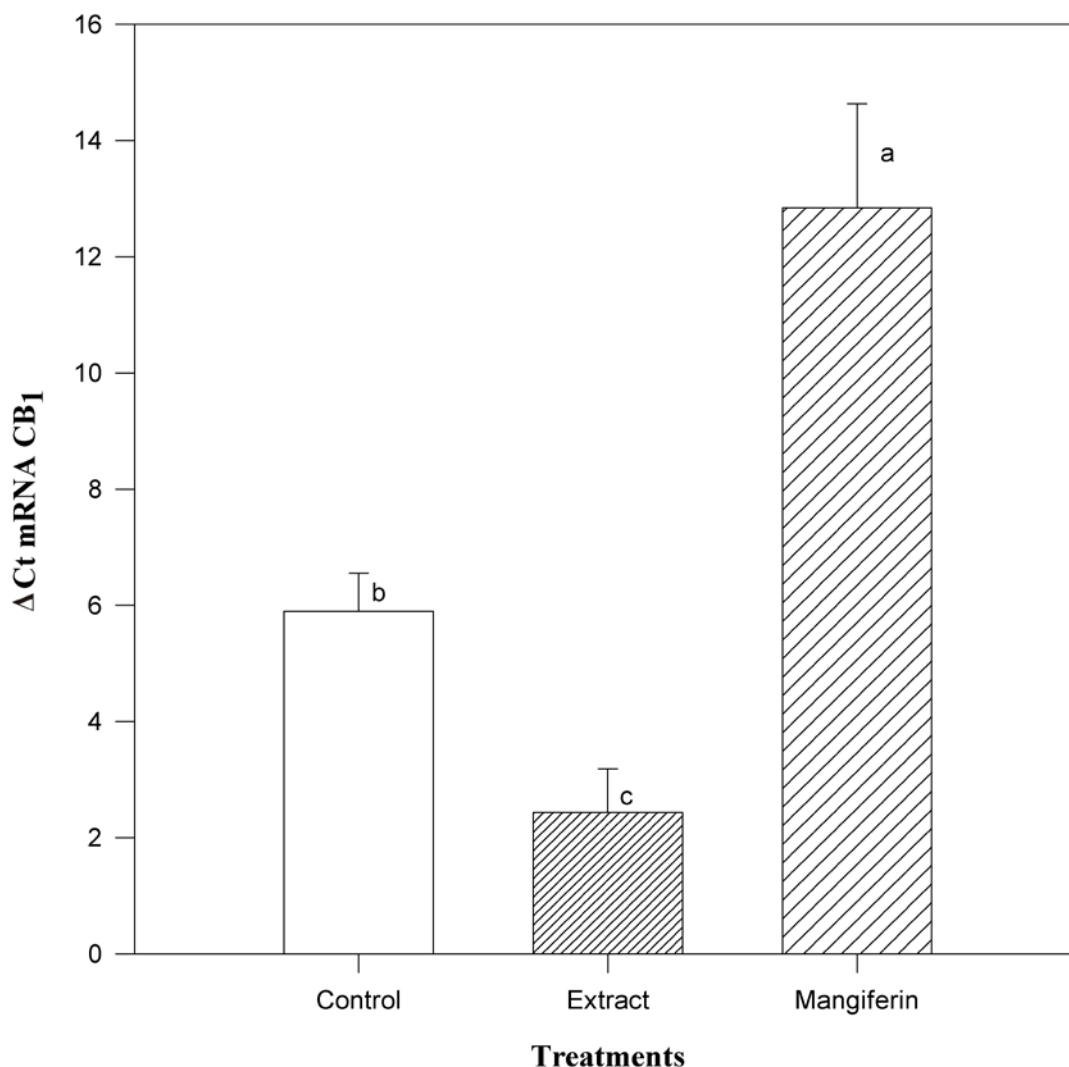


Figura 6 – Expressão do mRNA do receptor CB₁ no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos, durante 8 dias. Control - (Dieta de cafeteria (DC) + DMSO); Extract -DC+extrato da folha de manga; Mangiferin - DC+mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Como demonstrado, o grupo que recebeu o extrato de *M. indica* ($2,43 \pm 0,74$) apresentou a menor expressão do receptor CB₁ quando comparado ao grupo que recebeu a mangiferina ($12,83 \pm 1,78$) e ao grupo controle ($5,89 \pm 0,65$). Os animais em que foram administrados a mangiferina apresentaram uma elevação significativa da expressão do receptor CB₁ comparada aos demais grupos.

Não houve diferença na expressão do mRNA do receptor PPAR γ comparados com o grupo controle ($7,10\pm 1,25$) (Figura 7). Porém, entre os grupos de tratamento, extrato ($8,55\pm 0,70$) e mangiferina ($6,08\pm 0,35$), a diferença na expressão de PPAR foi significativa.

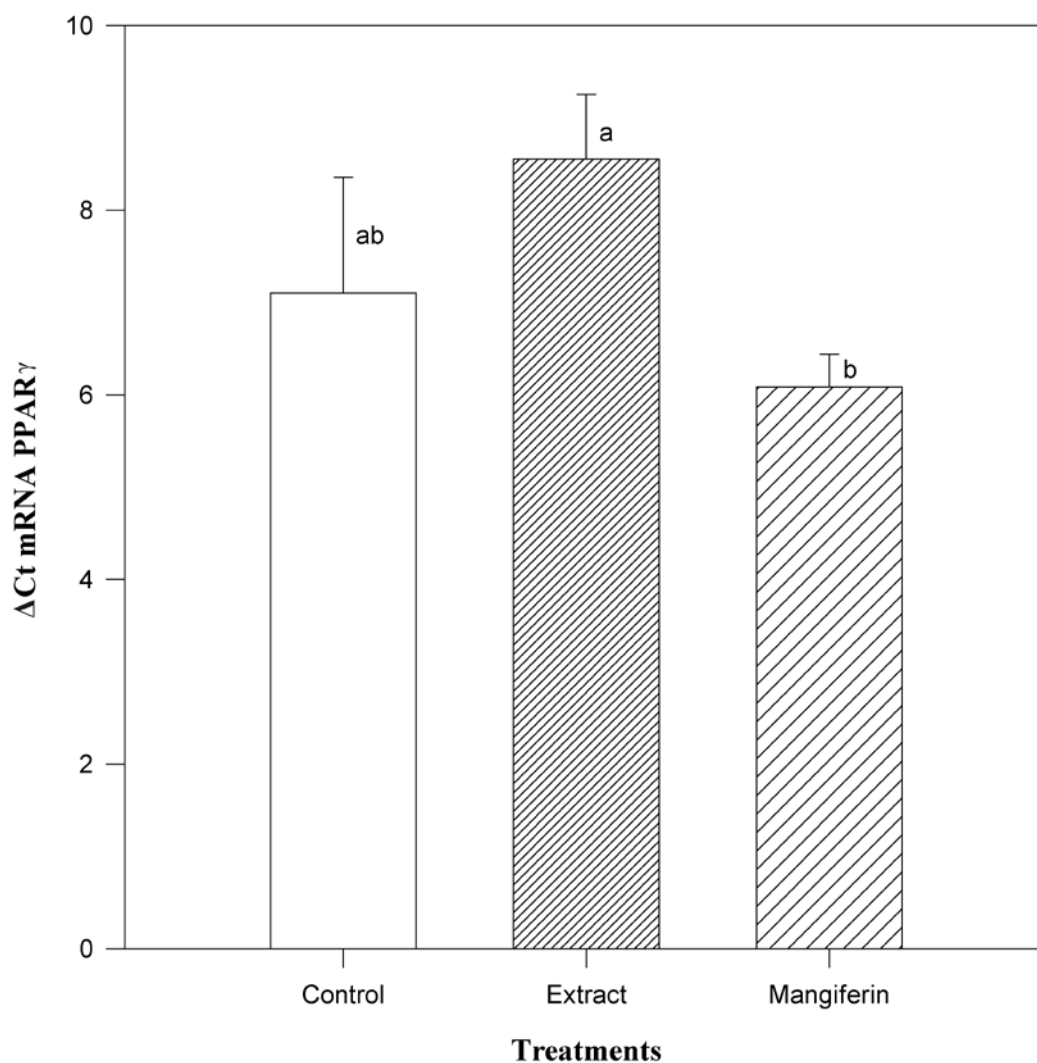


Figura 7 – Expressão do mRNA do receptor PPAR γ no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos, durante 8 dias. Control - (Dieta de cafeteria (DC) + DMSO); Extract -DC+extrato da folha de manga; Mangiferin - DC+mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

4. Discussão

O presente estudo investiga o uso profilático do extrato de *M. indica* e da mangiferina no ganho de peso corporal, ingestão alimentar, peso do tecido adiposo e na diferença de expressão do mRNA de diferentes receptores e marcadores de risco metabólico envolvidos na adipogênese.

O ganho de peso dos animais dos diferentes grupos não foi alterado durante os 8 dias de tratamento, porém, o consumo alimentar do grupo que recebeu o extrato foi significativamente menor comparado aos grupos controle e mangiferina. Ratos wistar alimentados com dieta rica em ácidos graxos por 12 semanas também não apresentaram diferença no ganho de peso, contudo, a ingestão alimentar foi estatisticamente superior comparado ao grupo controle ²². Segundo ²³, ratos que receberam injeção de adiponectina (1 e 7µg/dia) e que foram alimentados com dieta com teor de lipídios elevada, durante 8 semanas, não apresentaram diferença significativa no ganho de peso. Nos animais em que foi administrada a adiponectina (7µg/dia) a ingestão alimentar foi significativamente inferior quando comparado ao grupo controle. Ratos saudáveis e diabéticos induzidos, submetidos ao tratamento com 10mg/Kg de rimonabant ou a mesma dose de AM 4113 (antagonistas do receptor CB₁) apresentaram uma redução significativa na ingestão alimentar ^{24,25}. Estudo utilizando extrato aquoso de *Salacia reticulata* (planta usada na terapia para o diabetes mellitus e que tem como principal composto bioativo a mangiferina) mostrou que o grupo de animais que receberam esse extrato apresentou uma redução significativa do ganho de peso, ingestão alimentar e peso do tecido adiposo ²⁶. No presente estudo, a utilização do extrato da folha de manga e da mangiferina diminuíram significativamente o peso do tecido adiposo. Segundo ²⁷ ratos alimentados com dieta com elevado teor de gorduras (45% de gordura na dieta), por 12 semanas, aumentaram a massa de tecido adiposo significativamente. Outro estudo onde ratos foram alimentados com dieta rica em ácidos graxos, durante 8 dias, demonstrou um aumento significativo do ganho de peso e do tecido adiposo ²⁸. Ratos e camundongos alimentados com dieta indutora de obesidade e tratados com antagonistas do receptor CB₁ apresentaram uma redução significativa no peso do tecido adiposo ²⁹.

Os dados da expressão gênica evidenciam o efeito antiadipogênico do extrato e o efeito próadipogênico da mangiferina.

O extrato da folha de manga atenuou a adipogênese comparado ao grupo controle com diminuição da expressão do receptor CB₁, aumento da expressão da adiponectina e diminuição da expressão da resistina, além da redução do consumo

alimentar e peso do tecido adiposo, relatado anteriormente. Mesmo não sendo significativa a 5%, a expressão do receptor PPAR demonstrou uma tendência em elevar-se ($p > 0,05$).

Estudo onde foi administrado rosiglitazone (3mg/Kg) em ratos mostrou que a expressão da adiponectina foi elevada significativamente no tecido adiposo quando comparado ao grupo que recebeu placebo³⁰, assim como ratos submetidos a restrição calórica apresentou um aumento significativo na expressão do mRNA da adiponectina no tecido³¹. Ratos alimentados com dieta rica em gordura aumentaram a expressão de adiponectina e diminuíram a de resistina³². Estudo realizado por³³, mostraram que ratos obesos-induzidos apresentaram um nível circulante de adiponectina estatisticamente superior comparado ao grupo controle. Segundo²⁷, células 3T3 L1 tratadas com T0070907, um antagonista de PPAR γ , aumentaram a expressão da adiponectina e do receptor PPAR γ , sugerindo que sua ativação é uma importante etapa que pode alterar a expressão dos marcadores inflamatórios abordados.

Neste trabalho, o efeito da mangiferina na adipogênese, comparado ao grupo controle, foi demonstrado no aumento da expressão do receptor CB₁, diminuição da expressão da adiponectina e da leptina. A expressão do receptor PPAR γ apresentou uma tendência de redução apesar desta não ser significativa a 5% ($p > 0,05$).

Dieta rica em gordura saturada, monoinsaturada e poliinsaturada diminuiu a expressão da adiponectina em ratos²². A utilização de *Salacia reticulata* e do seu marcador bioativo, a mangiferina, no tratamento de células 3T3 L1 diminuiu a expressão da adiponectina e do receptor PPAR γ ³⁴. Ratos diabéticos apresentaram níveis séricos de leptina estatisticamente inferiores comparados a ratos não diabéticos^{35,36}. Em estudo realizado por³⁷, ratos diabéticos tratados com agonista de PPAR γ , rosiglitazone, diminuiu significativamente a expressão da adiponectina no tecido adiposo comparado ao grupo que não recebeu tratamento. Segundo³⁸ ratos wistar alimentados com dieta rica em ácidos graxos e tratados com 10mg/Kg de sibutramina, reduziram os níveis séricos de adiponectina e de resistina. Em contrapartida, ratos alimentados com dieta contendo 60% de gordura, por 10 semanas, diminuíram a expressão da adiponectina e aumentaram a expressão da resistina e da leptina³⁹. Estudo realizado com ratos obesos, induzidos por dieta e tratados com rimonabant ou NESS038C6 (ambos antagonistas do receptor CB₁) mostrou que houve uma redução significativa na expressão da leptina no tecido adiposo^{40,41}. A utilização do segundo antagonista citado demonstrou que houve uma diminuição na expressão do receptor PPAR γ no fígado. O presente estudo

corroborar com alguns dados encontrados na literatura, e sugere que alterações dos marcadores, adiponectina, leptina e resistina, podem ser mediados pelo receptor PPAR γ .

Este estudo é o primeiro a demonstrar o efeito da mangiferina na expressão do receptor CB₁ em tecido adiposo.

5. Conclusão

O estudo demonstrou um efeito profilático do extrato de *M. indica* uma vez que ele atenuou a adipogênese e modulou a expressão dos fatores de risco metabólico. Já a mangiferina mostrou resultados inversos, estimulando a adipogênese. Isso sugere que o extrato modulou favoravelmente o sistema endocanabinóide em ratos alimentados com dieta de cafeteria, sugerindo o seu potencial terapêutico na síndrome metabólica, por meio do controle do risco metabólico.

Agradecimentos

As agências de fomento, FAPEMIG, CNPq e CAPES.

6. Referências Bibliográficas

- 1 - HUANG, T.H-W.; TEOH, A.W.; LIN, B.L.; LIN, D.S-H.; ROUFOGSLIS, B. The role of herbal PPAR modulators in the treatment of cardiometabolic syndrome. *Pharmacology Research*, v. 60, p. 195-206, 2009.
- 2 - RUEDA-CLAUSEN, C.F; DAVIDGE, S.T. Potential role of GPCRs as signal transducers in early programming of metabolic syndrome. *Drug Discovery Today: Disease Models*, v. 341, p. 1-6, 2012.
- 3 - MAYNADIER, M.; BASILE, I.; GARY-BOBO, M. Adiponectin normalization: a clue to the anti-metabolic syndrome action of rimonabant. *Drug Discovery Today*, v. 14, p. 192-197, 2009.
- 4 - NISOLI, E. Endocannabinoids and obesity development-the adipose tissue. *Drug discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 7, p. 199-204, 2010.
- 5 - KIM, H. B.; KIM, W.H.; HAN, K. L.; PARK, J. H; LEE, J.; YEO, J.; JUNG, M. H. cAMP-response element binding protein (CREB) positively regulates mouse adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 391, p. 634-639, 2010.

- 6 - VALENZUELA, C.; AGUIRRE, C.; CASTILLO, V.; RONCO, A. M.; LLANOS, M. Participación del sistema endocanabinoide en el desarrollo de obesidad. *Revista Medica de Chile*, v. 138, p. 621-629, 2010.
- 7 - MATOS, A. F. G.; GUEDES, E. P.; SOUZA, L. L.; VALÉRIO, C. M. O sistema endocanabinóide: Novo paradigma no tratamento da Síndrome Metabólica. *Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabolismo*, v. 50, p. 390-399, 2006.
- 8 - LI, C.; JONES, P.M.; PERSAUD, S.J. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 129, p. 307-320, 2011.
- 9 - DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. *Revista Brasileira de Clinica Medica*, v. 9, n. 2, p. 138-45, 2011.
- 10 - CHRISTODOULIDES, C.; VIDAL-PUIG, A. PPARs and adipocyte function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 318, p. 61-68, 2010.
- 11 - POULSEN, L.L.C.; SIERSBÆK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 23, n. 6, p. 1-9, 2012.
- 12 - FUNG, A.; VIZCAYCHIPI, M.; LLOYD, D.; WAN, Y.; MA, D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: Mechanistic prospects. *Brain Research*, v. 1446, p. 144-155, 2012.
- 13 - NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO-HERNÁNDEZ, R.; GARRIDO-GARRIDO, R.; GARCÍA-RIVERA, D.; GUEVARA-GARCÍA, M.; PARDO-ANDREU, G.L. The paradox of natural products as pharmaceuticals – Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacological Research*, v. 55, p. 351–358, 2007.
- 14 - RODEIRO, I.; HERNANDEZ, S.; MORFFI, J.; HERRERA, J.A.; GÓMEZ-LECHÓN. M. J.; DELGADO, R.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. Evaluation of genotoxicity and DNA protective effects of mangiferin, a glucosylxanthone isolated from *Mangifera indica L.* stem bark extract. *Food and Chemistry Toxicology*, v. 50, p. 3360-3366, 2012.
- 15 - CHOI, E. H.; YANG, H. P.; CHUN, H. S. Chitooligosaccharide ameliorates diet-induced obesity in mice and affects adipose gene expression involved in adipogenesis and inflammation. *Nutrition Research*, v. 32, p. 218-228, 2012.
- 16 - GARCÍA, D.; DELGADO, R.; BOUGARNE, N.; HAEGEMAN, G.; VANDEN, W. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of

immunosuppressive antitumour effects of Mango bark extract in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Lett*, v. 305, p. 21-31, 2011.

17 - MASIBO, M.; HE, Q. Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties - A Review. *Food Reviews International*, v. 25, p. 346-370, 2009.

18 - GALLI, J.A.; MICHELOTTO, M.D.; SILVEIRA, L.C.; MARTINS, A.L.M. Qualidade de mangas cultivadas no Estado de São Paulo. *Bragantia*, v. 67, p. 791-797, 2008.

19 - RAMOS, A.M.; D'ARAUJO COUTO, F.A.; REZENDE, P.M.; LELIS, F.M.V.; BENEVIDES, S.D.; PEREZ, R. *Manga Ubá. Boas práticas agrícolas para produção destinada à agroindústria*. Viçosa, MG. UFV. 64p, 2005.

20 - MURUGANANDAN, S.; GUPTA, S.; KATARINA, M.; LAL, J.; GUPTA, P.K. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology*, v. 176, p. 165-173, 2002.

21 - LING, L.T.; YAP, S.; RADHAKRISHNAN, A.K.; SUBRAMANIAM, T.; CHENG, H.M.; PALANISAMY, U.D. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. *Food Chemistry*, v. 113, p. 1154-1159, 2009.

22 - YANG, X.; ZHANG, Y.; LIN, J.; PEN, A.; YING, C.; CAO, W.; MAO, L. A lower proportion of dietary saturated/monounsaturated/polyunsaturated fatty acids reduces the expression of adiponectin in rats fed a high-fat diet. *Nutrition Research*, v. 32, p. 285-291, 2012.

23 - BASSI, M.; CARMO, J. M.; HALL, J. E.; SILVA, A. A. Chronic effects of centrally administered adiponectin on appetite, metabolism and blood pressure regulation in normotensive and hypertensive rats. *Peptides*, v. 37, p. 1-5, 2012.

24 - LIU, W. J.; JIN, H. Y.; PARK, J. H.; BAEK, H. S.; PARK, T. S. Effect of rimonabant, the cannabinoid CB₁ receptor antagonist, on peripheral nerve in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 637, p. 70-75, 2010.

25 - CLUNY, N. L.; CHAMBERS, A. P.; VEMURI, V.K.; WOOD, J. T.; ELLER, L. K.; FRENI, C.; REIMER, R. A.; MAKRIYANNIS, A.; SHARKEY, K. A. The neutral cannabinoid CB₁ receptor antagonist AM 4113 regulates body weight through changes in energy intake in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 97, p. 537-543, 2011.

26 - KISHINO, E.; ITO, T.; FUJITA, K.; KIUCHI, Y. A mixture of *Salacia reticulata* (kotala himbutu) aqueous extract and cyclodextrin reduces body weight gain, visceral

fat accumulation, and total cholesterol and insulin increases in male Wistar fatty rats. *Nutrition Research*, v. 29, p. 55-63, 2009.

27 - WANG, Z.; DOU, X.; GU, D.; SHEN, C.; YAO, T.; NGUYEN, V.; BRAUNSCHWEIG, C.; SONG, Z. 4-hydroxynonenal differentially regulates adiponectin gene expression and secretion via activating PPAR γ and accelerating ubiquitin-proteasome degradation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 349, p. 222-231, 2012.

28 - GUZMÁN-RUIZ, R.; STUCCHI, P.; RAMOS, M. P.; SEVILLANO, J.; SOMOZA, B.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.; RUIZ-GAYO, M. Leptin drives fat distribution during diet-induced obesity in mice. *Endocrinología y Nutrición*, v. 59, n. 6, p. 354-361, 2012.

29 - CHEN, W.; TANG, H.; LIU, H.; LONG, L.; GONG, Z.; ZHENG, J.; CHI, M.; XIE, Y.; ZHENG, Z.; LI, S.; WANG, L. Novel selective antagonist of the cannabinoid CB₁ receptor, Mj15, with prominent anti-obesity effect in rodent models. *European Journal of Pharmacology*, v. 637, p. 178-185, 2010.

30 - PITA, J.; PANADERO, A.; SORIANO-GUILLÉN, L.; RODRÍGUEZ, E.; ROVIRA, A. The insulin sensitizing effects of PPAR γ agonist are associated to changes in adiponectin index and adiponectin receptors in Zucker fatty rats. *Regulatory Peptides*, v. 174, p. 18-25, 2012.

31 - DING, Q.; ASH, C.; MRACEK, T.; MERRY, B.; BING, C. Caloric restriction increases adiponectin expression by adipose tissue and prevents the inhibitory effect of insulin on circulation adiponectin in rats. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 23, p. 867-874, 2012.

32 - CHOI, K. C.; LEE, S.Y.; YOO, H. J.; RYU, O. H.; LEE, K. W.; KIM, S. M.; BAIK, S. H.; CHOI, K. M. Effect of PPAR- δ agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and resistin in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 357, p. 62-67, 2007.

33 - MARECKI, J. C.; RONIS, M. J. J.; SHANKAI, K.; BADGER, T. M. Hyperinsulinemia and ectopic fat deposition can develop in the face of hyperadiponectinemia in Young obese rats. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 22, p. 142-152, 2011.

34 - SHIMADA, T.; NAGAI, E.; HARASAWA, Y.; WATANABE, M.; NEGISHI, K.; AKASE, T.; SAI, Y.; MIYAMOTO, K.; ABURADA, M. *Salacia reticulata* inhibits

- differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, p. 67-74, 2011.
- 35 - KANDEIL, M. A.; AMIN, K. A.; HASSANIN, K. A.; ALI, K. M.; MOHAMMED, E. T. Role of lipoic acid on insulin resistance and leptin in experimentally diabetic rats. *Journal of diabetes and Its Complications*, v. 25, p. 31-38, 2011.
- 36 - AHMED, O. M.; GABAR, M.A.; ALI, T. M. Impacts of the coexistence of diabetes and hypothyroidism on body weight gain, leptina and various metabolic aspects in albino rats. *Journal of Diabetes ans Its Complications*, v. 26, p. 491-500, 2012.
- 37 -LIU, S.; WU, H. J.; ZHANG, Z. Q.; CHEN, Q.; LIU, B.; WU, J. P.; ZHU, L. The ameliorating effect of rosiglitazone on experimental nonalcoholic steatohepatitis is associated with regulating adiponectin receptor expression in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 650, p. 384-389, 2011.
- 38 - STROUBINI, T.; PERELAS, A.; LIAPI, C.; PERREA, D.; DONTAS, I.; TZAVARA, C.; GALANOPOULOU, P. Serum adiponectin and resistin in rats under three isocaloric diets: The effect of sibutramine. *Cytokine*, v. 46, p. 171-175, 2009.
- 39 - CATTAPRETA, M.; MARTINS, M. A.; BRUNINI, T. M. C.; RIBEIRO, A. C. M.; LACERDA, C. A. M.; AGUILA, M. B. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by diferente high-fat diets. *Nutrition*, v. 28, p. 212-219, 2012.
- 40 - LAZZARI, P.; SANNA, A.; MASTINU, A.; CABASINO, S.; MANCA, I.; PANI, L. Weight loss induced by rimonabant is associated with na altered leptina expression and hypothalamic leptin signaling in diet-iduced obese mice. *Behavioural Brain Research*, v. 217, p. 432-438, 2011.
- 41 - MASTINU, A.; PIRA, M.; PANI, L.; PINNA, G. A.; LAZZARI, P. NESS038C6, a novel selective CB1 antagonist agente with anti-obesity activity and improved molecular profile. *Behavioural Brain Research*, v. 234, p. 192-204, 2012.

**ARTIGO 4: O EXTRATO DA FOLHA DE MANGA E A
MANGIFERINA MODULAM A EXPRESSÃO DOS RECEPTORES
CB₁, PPAR_γ E DE ADIPOCINAS NO TECIDO ADIPOSEO**

O Extrato da Folha de Manga e a Mangiferina modulam a expressão dos receptores CB₁, PPAR γ e de adipocinas no tecido adiposo

Resumo

Introdução: O extrato da folha de manga (*Mangifera indica* L) e a mangiferina possuem propriedades farmacológicas tais como antioxidante e anti-inflamatória, dentre outras. A adipogênese é caracterizada como um processo inflamatório devido ao acúmulo de tecido adiposo e um aumento significativo na secreção de citocinas. Os receptores CB₁ e o receptor PPAR γ estão envolvidos na regulação da proliferação de adipócitos e no processo inflamatório. *Objetivos:* Avaliar o efeito da mangiferina e do extrato das folhas de manga na expressão gênica de receptores (CB₁ e PPAR γ) e adipocinas (adiponectina, resistina e leptina), no tecido adiposo de ratos alimentados com dieta de cafeteria. *Material e Métodos:* Ratos wistar receberam uma dieta adipogênica por 7 dias e foram posteriormente tratados, por gavagem, com mangiferina e extrato da folha de manga durante cinco dias. Ingestão alimentar e peso corporal foram mensurados diariamente. Após eutanásia, o sangue foi retirado para obtenção do soro para realização das análises bioquímicas e o tecido adiposo foi removido para verificar a expressão dos receptores CB₁, PPAR γ e dos marcadores leptina, resistina e adiponectina por RT-PCR. *Resultados:* O extrato da folha de manga e a mangiferina diminuíram o peso corporal, a massa do tecido adiposo e os níveis de triacilgliceróis ao mesmo tempo em que aumentou significativamente o nível de HDL. Os tratamentos com o extrato e a mangiferina aumentaram a expressão dos receptores CB₁ e PPAR γ e das citocinas leptina e resistina, enquanto diminuiu a expressão da adiponectina. *Conclusão:* O extrato das folhas de manga e a mangiferina modularam a expressão de genes associados aos fatores de risco metabólico, mostrando um alto potencial bioativo na adipogênese.

Palavras-chave: *Mangifera indica* L., adiponectina, resistina, leptina, adipogênese, fatores de risco metabólico.

Abstract

Introduction: The leaf extract of mango (*Mangifera indica* L) and mangiferin have pharmacological properties such as antioxidant and anti-inflammatory, among others. Adipogenesis is characterized as an inflammatory process due to accumulation of adipose tissue and a significant increase in the secretion of cytokines. The CB1 receptor PPAR gamma and are involved in the regulation of adipocyte proliferation and inflammation. *Objectives:* To evaluate the effect of mangiferin and extract of mango leaves in gene expression of receptors (CB1 and PPAR gamma) and adipokines (adiponectin, resistin and leptin) in adipose tissue of rats fed a cafeteria diet. *Material and Methods:* Male Wistar rats received an adipogenic diet for 7 days and were subsequently treated by gavage with mangiferin and mango leaf extract for five days. Food intake and body weight were measured daily. After euthanasia, blood was withdrawn to obtain the serum for carrying out the biochemical analyzes and adipose tissue was removed to verify expression of CB1 receptors, PPAR gamma and markers leptin, adiponectin and resistin by RT-PCR. *Results:* The leaf extract sleeve mangiferin and reduced body weight, the mass of adipose tissue triglycerides levels and at the same time significantly increased the level of HDL. Treatment with the extract and mangiferin increased the expression of CB1 and PPAR gamma and cytokines leptin and resistin while decreased expression of adiponectin. *Conclusion:* The extract of mango leaves and mangiferin modulate the expression of genes associated with metabolic risk factors, showing a high potential bioactive in adipogenesis.

Keywords: *Mangifera indica* L., adiponectin, resistin, leptin, adipogenesis, metabolic risk factors.

1. Introdução

Produtos naturais tem sido o foco de diversos estudos por apresentarem efeitos benéficos à saúde humana (LINK; BALAGUER, 2010; RODEIRO et al., 2012). A mangiferina é uma glicosilxantona encontrada em grande quantidade nas folhas, frutos e casca da mangueira (*Mangifera indica* L.). O extrato da casca da mangueira e a mangiferina possuem diferentes propriedades farmacológicas como atividade antiviral, hipoglicemiante, antidiabética, analgésica, hepatoprotetora, imunomodulatória, antitumor, antioxidante, anti-HIV e antiinflamatória (NUÑEZ et al., 2009; LIU et al., 2011; HOU et al., 2012).

A adipogênese é caracterizada pelo aumento do tecido adiposo, que por sua vez, é responsável por secretar substâncias bioativas denominadas adipocinas, como adiponectina, resistina e leptina, que afetam diretamente a sensibilidade à insulina, a inflamação, a resposta imune e o metabolismo lipídico (KAWAKAMI et al., 2012; BREITFELD et al. 2012). A produção desregulada dessas adipocinas, causada pelo acúmulo de tecido adiposo, está envolvida no processo inflamatório da síndrome metabólica e das doenças cardiovasculares (OHASHI et al., 2012; CHIBA et al., 2012; ALEMANY, 2012).

O sistema endocanabinóide é uma via fundamental no desenvolvimento da obesidade e outras desordens metabólicas. A inibição do receptor CB₁ causa redução do peso corporal e ingestão alimentar, melhora a resistência a insulina e dislipidemia em indivíduos com síndrome metabólica (QUARTA et al., 2010; KIM, et al., 2011; LIU et al., 2012).

Assim como os receptores CB₁, o receptor Peroxisome proliferator-activated receptor gama (PPAR γ) está envolvido na regulação da diferenciação de adipócitos, na sensibilidade a insulina e no processo inflamatório (O'SULLIVAN; KENDALL, 2010; POULSEN et al., 2012). A ativação do PPAR γ desencadeia atividades antinflamatórias em vários tipos de células pela modulação da expressão de genes pró-inflamatórios, por meio da redução da produção de citocinas, metaloproteases e proteínas inflamatórias de fase aguda (FUNG et al., 2012; XU et al., 2012). Nesse sentido, a utilização de antagonistas do receptor CB₁ e agonistas do receptor PPAR γ apontada como coadjuvantes no tratamento dessas desordens metabólicas.

Não foi encontrado na literatura trabalhos sobre o efeito da mangiferina e do extrato de folha de manga na modulação de genes no adipócito os quais estão envolvidos no risco metabólico de obesidade e síndrome metabólica.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da mangiferina e do extrato das folhas de manga Ubá (*Mangífera Indica* L.) na adipogênese em ratos, por meio da expressão gênica dos receptores CB₁ e PPAR γ e dos marcadores inflamatórios, adiponectina, leptina e resistina.

2. Materias e Métodos

2.1. Obtenção do extrato da folha de manga e da mangiferina

As folhas de *M. indica*, variedade Ubá, foram coletadas em pomar localizado na Zona da Mata Mineira, no município de Viçosa - MG. As folhas foram secas em temperatura ambiente, trituradas e o pulverizado obtido utilizado para obtenção do extrato. A excicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC n^o 37.611).

O extrato etanólico das folhas de *M. indica* (Ubá) foi obtido a partir de 1.472,2g da droga vegetal seca por percolação. O extrato obtido foi concentrado a vácuo em evaporador rotativo, em temperatura máxima de 60°C e o solvente residual removido por liofilização, com rendimento de 400g de extrato etanólico de *Mangifera indica*.

Para o isolamento da mangiferina foram utilizados 582,55g da folha seca e triturada. A amostra foi desengordurada em soxhlet, utilizando como solvente o éter de petróleo, durante 12 horas, sendo em seguida submetida à extração exaustiva por percolação com etanol 95%. O extrato etanólico obtido foi concentrado em evaporador rotativo, em temperatura máxima de 60°C e liofilizado, obtendo-se 360g de extrato. Em seguida, o mesmo foi submetido a sucessivos processos de recristalização com acetato de etila obtendo-se 21g de mangiferina. Todo o procedimento de purificação foi acompanhado por cromatografia de camada delgada empregando mangiferina padrão (Sigma) como referência. A pureza do composto foi avaliada por HPLC comparando-se com o cromatograma ao padrão de mangiferina (sigma) (ANEXO 2). A metodologia utilizada nesses processos foi adaptada de MURUNGANANDAN et al. (2002).

2.2. Ensaio Biológico

2.2.1. Animais e tratamentos

Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em gaiolas coletivas, apropriadas, com ventilação adequada e em ciclos de luminosidade (claro/escuro) de 12 horas e uma temperatura média de 22°C. O peso corporal individual

dos animais e a ingestão alimentar foram acompanhados diariamente a fim de verificar a evolução ponderal dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

Para a indução da adipogênese utilizou-se uma dieta do tipo cafeteria manipulada no próprio laboratório. A distribuição calórica da dieta foi de 9,8% de proteínas, 31,3% de carboidratos e 58,8% de lipídios, sendo constituída dos seguintes alimentos: patê de presunto, batata palha, bacon, mortadela, biscoito maisena, achocolatado, leite em pó integral e ração comercial nas proporções de 2:1:1:1:1:1:1. Durante todo o experimento, os animais foram alimentados com a dieta de cafeteria e água *ad libitum*.

O extrato obtido das folhas de manga da variedade Ubá, bem como a mangiferina isolada do mesmo, foram administrados durante 5 dias aos ratos Wistar, por gavagem, nas concentrações de 250 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente.

Todos os procedimentos e análises foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e no Departamento Nutrição e Saúde da UFV, após aprovação do Comitê de Ética da UFV (processo n°. 86/2011 - ANEXO 1).

2.2.2. Desenho experimental

Foram utilizados no estudo 64 ratos wistar, machos, com idade de 4 semanas. O estudo durou 21 dias. Os animais foram divididos em 8 grupos, constituído de 8 animais (n=8), conforme descrito no Quadro 1. Os animais foram alimentados antes do início do experimento, por 8 dias, com dieta comercial e água *ad libitum* para adaptação. Após esse período, os animais receberam dieta de cafeteria, por 7 dias, para o desenvolvimento da adipogênese. Após esse período, juntamente com a dieta de cafeteria, foram introduzidos os tratamentos propostos por 5 dias.

No 16^o dia, os animais dos grupos G4 e G5, nos quais o processo inflamatório já foi instalado receberam o extrato das folhas de manga (250mg/kg) e a mangiferina (40mg/kg). Os demais grupos (G6, G7 e G8) também receberam a mangiferina. Foram administrados em um grupo (G6) um antagonista do receptor PPAR γ , o GW9662 (3 mg/kg) e em outro grupo (G7) um antagonista irreversível do receptor CB₁, o rimonabant (10 mg/kg), e por fim, em outro grupo (G8) foi administrado ambos os antagonistas, nas mesmas concentrações, a fim de verificar se o mecanismo de bioatividade da mangiferina envolve os dois receptores. Três grupos foram mantidos para controle (G1, G2 e G3), no qual os animais foram alimentados com ração

comercial (G1), dieta de cafeteria (G2) e dieta de cafeteria com DMSO (G3), e, em substituição à mangiferina, os animais dos grupos controles, G1 e G2, receberam água por gavagem e o grupo G3 recebeu DMSO.

O peso e o consumo alimentar dos animais foram verificados diariamente para ajuste da dose da mangiferina e do extrato e para avaliação da evolução ponderal.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais e tratamentos.

Período	Grupos	Tratamentos
Controle	G1	Ração comercial
	G2	Dieta de Cafeteria (DC)
	G3	DC + DMSO
Tratamento	G4	DC + 250 mg/kg Extrato
	G5	DC + 40 mg/kg Mangiferina
	G6	DC + 40 mg/kg Mang. + GW9662
	G7	DC + 40 mg/kg Mang. + Rimonabant
	G8	DC + 40 mg/kg Mang. + GW9662 + Rimonabant

DC: Dieta de cafeteria; Mang: mangiferina; DMSO: dimetilsulfóxido; GW 9662: antagonista do receptor PPAR γ ; Rimonabant: antagonista do receptor CB₁.

2.2.3. Análises bioquímicas séricas

No final do experimento (21^o dia), os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e em seguida eutanasiados sob anestesia com tiopental sódico administrado intravenoso (i.v.) em dose inicial de 30mg/Kg ou em concentração suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal. Após a ausência do reflexo corneal, foi administrado i.v. uma solução saturada de cloreto de potássio para garantir a não consciência do animal. O sangue foi coletado diretamente da aorta abdominal e as amostras foram centrifugadas a 1000g, durante 10 minutos, para a obtenção do soro e realização das análises. As dosagens séricas de glicose, triacilgliceróis e colesterol total e frações foram realizadas utilizando Kits específicos da marca Bioclin® no equipamento específico para esse tipo de análise, o BS200. Foi também coletado e pesado o tecido adiposo total (visceral e subcutâneo) dos animais submetidos aos diferentes tratamentos para análises da expressão gênica.

2.3. Análises da expressão gênica dos receptores CB₁ e PPAR_γ, adiponectina, leptina e resistina no tecido adiposo por RT-PCR

O tecido adiposo total dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos foi utilizado para análise da expressão dos genes. Os animais foram agrupados de 2 em 2 para a extração do mRNA, tendo assim um subgrupo com n=4.

O mRNA do tecido adiposo foi extraído utilizando kit SV total RNA isolation system (Promega), conforme instrução do fabricante. O RNA total foi usado para síntese de cDNA usando o Kit MMLV- Reverse Transcriptase (Invitrogen). A quantificação da expressão gênica foi realizada por RT-PCR utilizando o equipamento AB Step One Real Time PCR System (Applied Biosystems). Foi utilizado o reagente 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) obtendo um volume final para cada reação de 12,5µL. Os parâmetros utilizados na corrida foram 15 min a 95° C e em seguida 40 ciclos de 95° C (15s), 60° C (30s) e 72° C (30s), seguido pela análise da curva de melting. Os iniciadores foram: Adiponectina (Fw- AATCCTGCCAGTCATGAAG, Rv- CATCTCCTGGGTCACCCTTA), resistina (Fw- CTACATTGCTGGTCAGTCTCC, Rv- GCTGTCCAGTCTATGCTTCC), Leptina (Fw- CCAGGATGACACCAAACCCCTC, Rv- ATCCAGGCTCTCTGGCTTCTGC), PPAR_γ (Fw- CATTCTGCTCCACACTATGAA, Rv- CGGGAAGGACTTTATGTATGAG) e CB₁ (Fw- GGGTAGTCCCTTCCAAGAAAAG, Rv- GTCCATAAAGTTCTCCCCACAC).

A quantificação da expressão gênica foi calculada em relação ao controle endógeno β -actina (Fw-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCCACGC, Rv- CCTCTGAACCCTAAGGCCAACCG).

2.4. Análises estatísticas

Foi utilizado o software Sigma Plot para análise descritiva dos dados e para os testes de comparação de grupos independentes. Para avaliação da distribuição das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv. Como as variáveis apresentaram distribuição normal foi realizada análise paramétrica seguida do teste Tuckey. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de p < 0,05.

3. Resultados

3.1. Ganho de peso e evolução ponderal

Os resultados mostraram que houve diferença significativa no peso do tecido adiposo dos grupos tratados com o extrato da folha de manga e da mangiferina, bem como no consumo alimentar dos grupos que foram tratados com o rimonabant e rimonabant com GW 9662, quando comparados aos animais que foram alimentados com a dieta de cafeteria (TABELA 1).

Tabela 1 – Consumo alimentar e ganho de peso durante os 5 dias de tratamento e massa de tecido adiposo total (TA) final dos ratos alimentados com dieta de cafeteria submetidos aos diferentes tratamentos.

Grupo	Consumo (g/dia)	Peso (g)	TA (g)
G1	22,63±8,87 ^a	15,48±0,47 ^b	0,26±0,05 ^e
G2	30,87±6,72 ^a	17,32±1,24 ^a	1,82±0,55 ^{ab}
G3	22,05±7,39 ^a	14,12±1,41 ^{bc}	1,13±0,14 ^b
G4	19,20±7,14 ^a	12,40±1,85 ^{cd}	1,03±0,40 ^{bc}
G5	18,63±7,84 ^a	13,88±1,16 ^c	1,07±0,21 ^{bc}
G6	16,51±5,13 ^a	14,37±1,76 ^{bc}	1,12±0,17 ^b
G7	8,90±2,98 ^b	9,77±0,64 ^e	0,49±0,11 ^d
G8	6,99±2,22 ^b	10,81±1,15 ^e	0,76±0,29 ^{cd}

TA: Tecido adiposo total (visceral e subcutâneo); G1: ração comercial, G2: dieta de cafeteria (DC), G3: DMSO + DC, G4-DC + extrato de folha de manga, G5: DC + mangiferina, G6-DC + mangiferina + GW9662, G7: DC + mangiferina + rimonabant, G8: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabant. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente significativas pelo teste de tuckey ($p < 0,05$).

Comparando-se o grupo em que os animais receberam somente dieta comercial com o grupo em que os animais foram tratados com a dieta de cafeteria nota-se que houve um aumento significativo do acúmulo de tecido adiposo. O grupo que foi tratado com a dieta de cafeteria apresentou o maior ganho de peso comparado ao grupo controle G1, onde, esse ganho de peso foi relativo ao tecido adiposo, o qual foi mais elevado no grupo G3 em quase seis vezes. Os dados encontrados demonstram a eficácia da dieta utilizada na indução da adipogênese. Os grupos que receberam o rimonabant, G7 e G8 mostraram um ganho de peso inferior comparado aos grupos que receberam dieta de cafeteria. Conseqüentemente, o peso do tecido adiposo foi estatisticamente inferior nos grupos G7 e G8 comparado aos grupos que receberam dieta de cafeteria G2 e G3,

mostrando que a dose do antagonista do receptor CB₁, o rimonabant, utilizado no estudo foi adequada.

3.2. Parâmetros Bioquímicos

A Tabela 2 mostra que o colesterol total não variou significativamente entre os grupos, no entanto, a fração HDL apresentou valores significativamente maiores nos grupos que receberam o extrato e a mangiferina comparados com os grupos controles dieta de cafeteria (G2) e dieta de cafeteria com DMSO (G3). Os níveis séricos de triacilgliceróis foram significativamente menores nos grupos que receberam o extrato da folha de manga e a mangiferina comparados ao grupo que recebeu dieta de cafeteria, enquanto somente o grupo que recebeu a mangiferina apresentou diferença comparada ao grupo que também recebeu a dieta de cafeteria e DMSO. Já os níveis de glicose do grupo G2 foram estatisticamente superiores aos demais grupos controle e de tratamentos. Os grupos em que os animais foram tratados com o rimonabant G7 e G8 apresentaram uma redução significativa na concentração de triacilgliceróis e glicose, enquanto os níveis de HDL foram estatisticamente superiores comparados que recebeu dieta de cafeteria e DMSO. Em contrapartida, o grupo em que os ratos receberam o GW 9662 (G6) houve um aumento significativo da glicose sanguínea e dos triacilgliceróis.

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos dos ratos alimentados com dieta de cafeteria submetidos aos diferentes tratamentos por 21 dias.

Grupo	CT	HDL	TG	Glicose
G1	101,33±6,34	28,00±1,70 ^f	71,20±6,76 ^b	119,00±14,31 ^{bcd}
G2	100,16±10,45	28,50±3,31 ^f	81,20±4,91 ^a	134,80±2,57 ^a
G3	107,50±9,70	30,30±1,77 ^{def}	59,00±3,36 ^c	115,30±8,29 ^c
G4	106,16±11,82	35,25±1,16 ^b	61,40±5,70 ^c	115,80±4,24 ^c
G5	115,83±11,66	33,20±1,81 ^c	68,40±6,00 ^b	115,50±1,84 ^c
G6	106,91±11,88	29,20±1,31 ^e	70,00±6,89 ^b	128,20±5,24 ^b
G7	113,50±13,06	38,00±2,62 ^a	44,30±7,94 ^e	81,80±6,44 ^e
G8	109,50±8,12	32,60±3,02 ^{cd}	53,20±2,54 ^d	111,20±5,67 ^d

G1: ração comercial, G2: dieta de cafeteria (DC), G3: DMSO + DC, G4-DC + extrato de folha de manga, G5: DC + mangiferina, G6-DC + mangiferina + GW9662, G7: DC + mangiferina + rimonabant, G8: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabant. CT: colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; TG: triacilgliceróis. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de tuckey (p<0,05).

3.3. Análises da expressão gênica dos receptores CB₁ e PPAR_γ, adiponectina, leptina e resistina no tecido adiposo por RT-PCR

Houve diferença significativa na expressão do mRNA da adiponectina nos diferentes grupos (Figura 1).

Os grupos em que os animais foram tratados com o extrato de folha de manga ($0,46 \pm 0,17$) e a mangiferina ($0,78 \pm 0,08$) reduziram significativamente a expressão da adiponectina quando comparado ao grupo que recebeu dieta de cafeteria e DMSO (G3).

Quando comparamos os grupos controle ração comercial ($1,16 \pm 0,26$), dieta de cafeteria ($1,34 \pm 0,36$) e dieta de cafeteria e DMSO ($1,52 \pm 0,26$) verifica-se que não existe diferença significativa entre eles, mostrando que o DMSO e a dieta de cafeteria utilizada no período experimental, não interferiram nesses parâmetros. A expressão gênica dos grupos que receberam o rimonabant G7 ($5,07 \pm 0,46$) e G8 ($4,70 \pm 0,43$) foram estatisticamente superiores comparados aos controles. Em contrapartida, o grupo em que os animais foram tratados com o antagonista PPAR_γ apresentou diferença significativa comparado aos grupos controle, sugerindo que a mangiferina anula o efeito do GW 9662 e/ou compete pelo mesmo sítio de ligação.

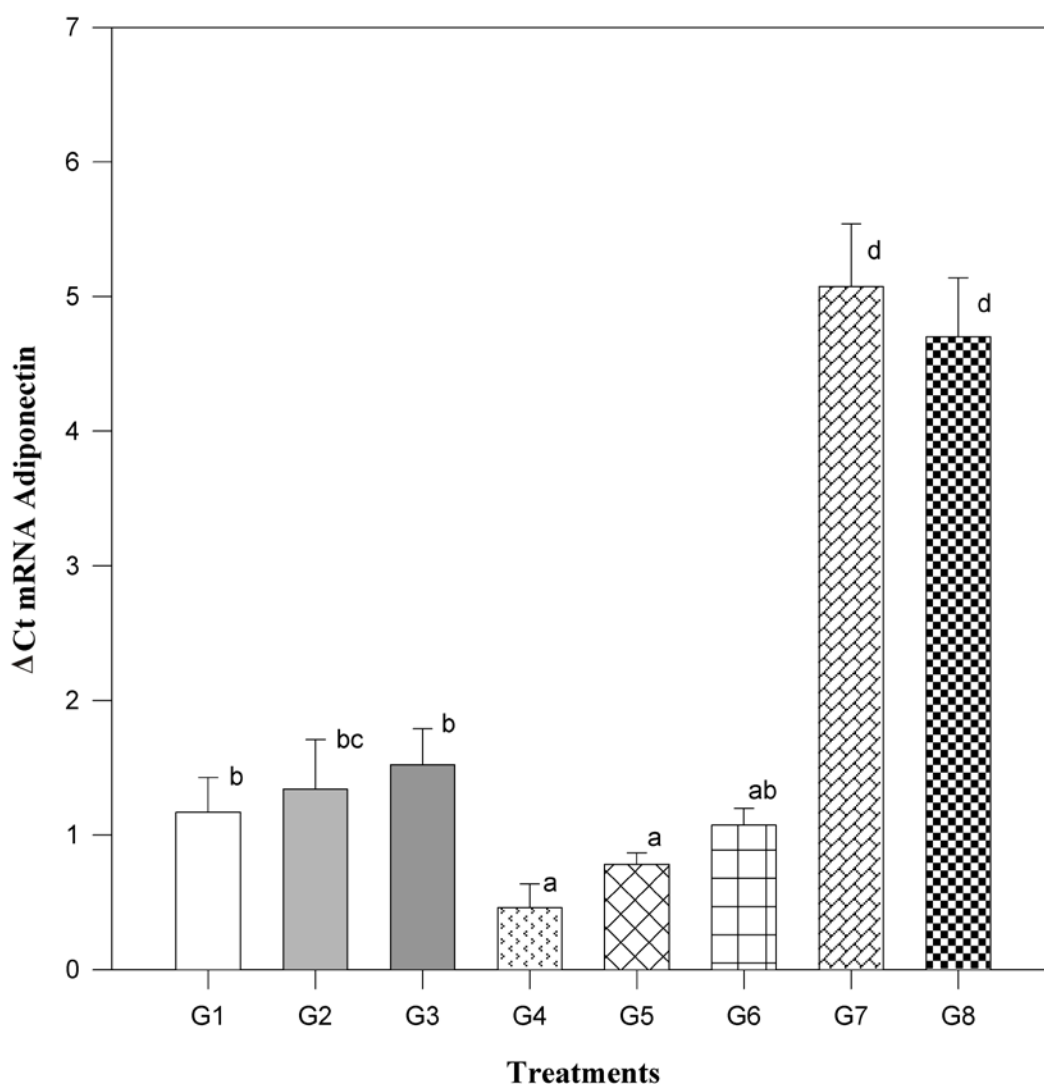


Figura 1 – Expressão gênica do mRNA da adiponectina no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. G1: ração comercial, G2: dieta de cafeteria (DC), G3: DMSO + DC, G4-DC + extrato de folha de manga, G5: DC + mangiferina, G6-DC + mangiferina + GW9662, G7: DC + mangiferina + rimonabant, G8: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabant. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Como mostrado na Figura 2, os grupos que receberam o extrato de folha de manga ($6,46 \pm 0,50$) e a mangiferina ($6,89 \pm 0,58$) apresentaram valores de expressão de mRNA de leptina estatisticamente mais elevados comparado aos grupos que receberam dieta de cafeteria ($5,21 \pm 1,01$) e dieta de cafeteria com DMSO ($4,85 \pm 0,71$).

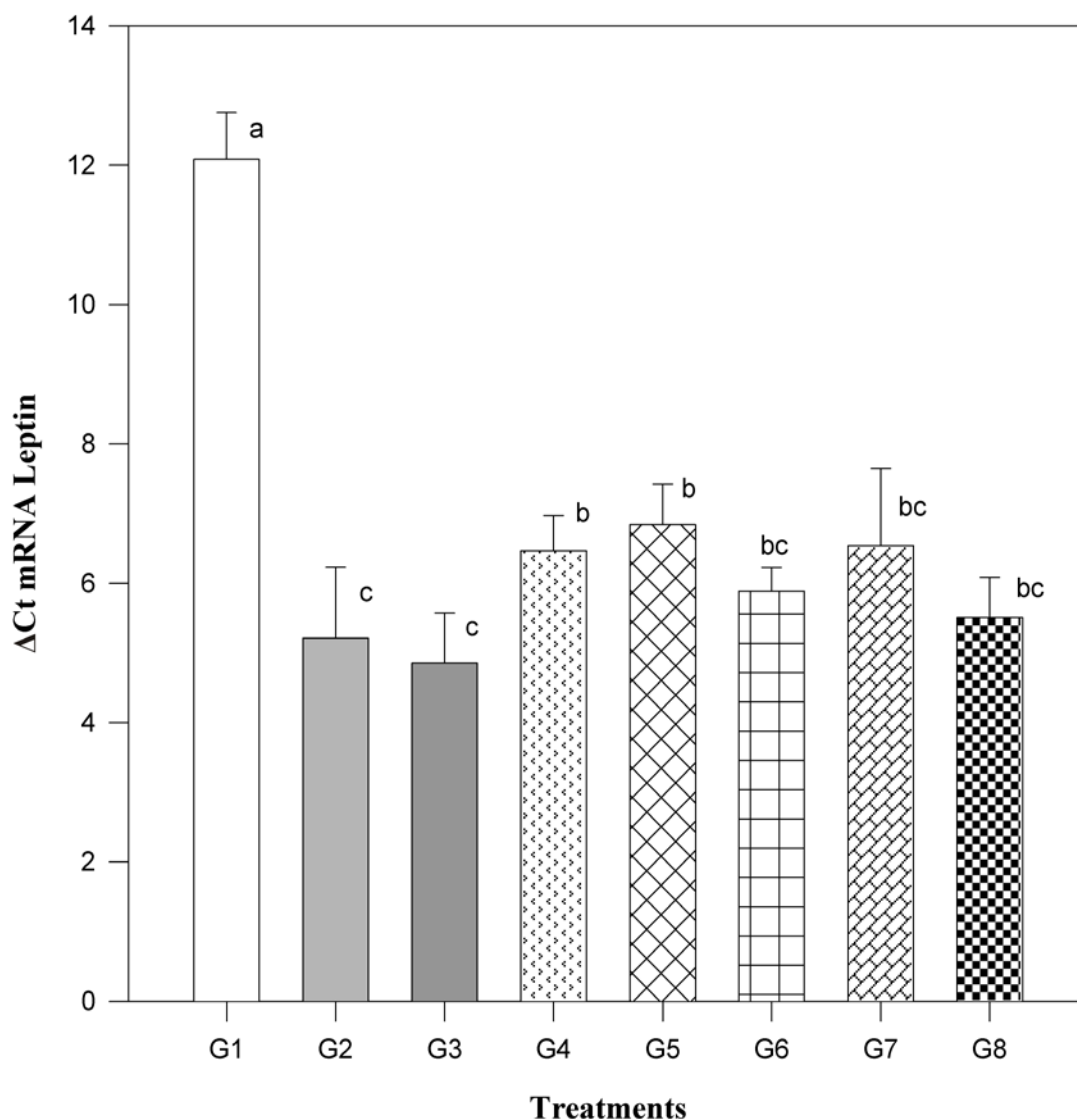


Figura 2 – Expressão gênica do mRNA da leptina no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. G1: ração comercial, G2: dieta de cafeteria (DC), G3: DMSO + DC, G4-DC + extrato de folha de manga, G5: DC + mangiferina, G6-DC + mangiferina + GW9662, G7: DC + mangiferina + rimonabant, G8: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabant. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Comparando o grupo que recebeu ração comercial (G1) com os grupos dieta de cafeteria (G2) e dieta de cafeteria e DMSO (G3) percebe-se houve uma redução significativa da expressão da leptina, enquanto os grupos G2 e não apresentaram diferença significativa, mostrando que a dieta utilizada no período do estudo afetou a expressão da leptina e que o veículo DMSO não interfere nesse parâmetro. A presença dos antagonistas dos receptores CB_1 e $PPAR\gamma$, isolados ou combinados, não afetou o

efeito dos tratamentos com o extrato de folha de manga e a mangiferina, sugerindo que CB_1 e $PPAR\gamma$ não estão relacionados à expressão da leptina.

A expressão de mRNA da resistina (Figura 3), foi significativamente mais elevado no grupo que foi tratado com mangiferina ($6,63\pm 0,46$) quando comparado aos grupos controle. Já o extrato da folha de manga não apresentou nenhuma alteração. Os grupos controle, em que os animais receberam ração comercial ($3,75\pm 0,89$), dieta de cafeteria ($3,22\pm 0,44$) e dieta de cafeteria com DMSO ($4,13\pm 0,47$) não apresentaram diferença significativa entre eles, mostrando que a dieta de cafeteria, no tempo estudado, e a utilização do DMSO não interferiram nesse parâmetro. No grupo em que os animais foram tratados com os antagonistas do $PPAR\gamma$ G6 ($6,19\pm 0,63$) e do CB_1 G7 ($5,99\pm 0,33$) a expressão da resistina foi estatisticamente superior comparado aos grupos controles. Em contrapartida, no grupo em que foram administrados ambos os receptores ($3,97\pm 0,90$) não houve diferença significativa comparado com o controle. Isso sugere que o efeito da mangiferina em aumentar a expressão da resistina foi anulado na presença dos dois antagonistas.

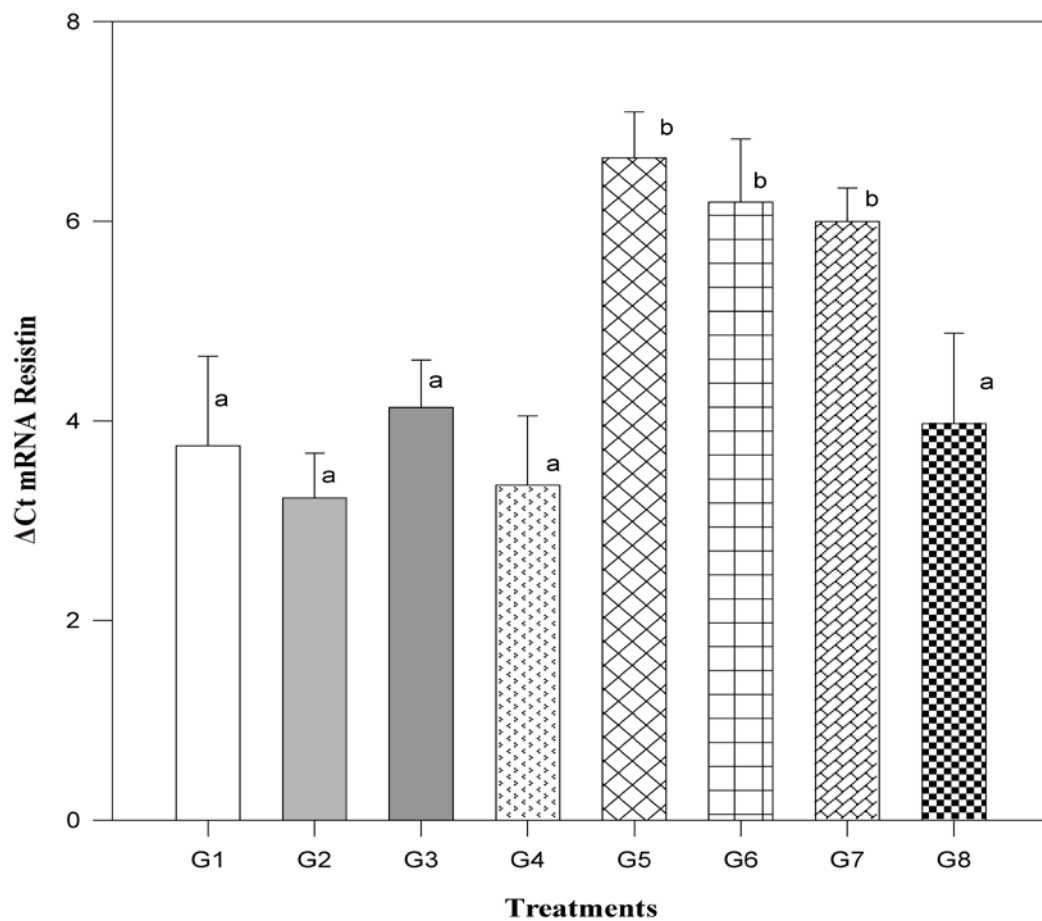


Figura 3 – Expressão gênica do mRNA da resistina no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. G1: ração comercial, G2: dieta de cafeteria (DC), G3: DMSO + DC, G4-DC + extrato de folha de manga, G5: DC + mangiferina, G6-DC + mangiferina + GW9662, G7: DC + mangiferina + rimonabant, G8: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabant. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A Figura 4 mostra que o grupo que recebeu a mangiferina ($13,32 \pm 1,72$) aumentou significativamente a expressão do mRNA do receptor $PPAR\gamma$ comparado aos demais grupos e que o grupo que recebeu o extrato da folha de manga não apresentou efeito. Não houve diferença significativa entre os grupos que foram tratados com ração comercial (G1), dieta e cafeteria (G2) e dieta de cafeteria com DMSO (G3) mostrando que a dieta de cafeteria e o DMSO durante os 8 dias de estudo não alteraram a expressão do $PPAR\gamma$. O grupo que recebeu o antagonista GW 9662 ($6,63 \pm 0,13$) concomitante com a mangiferina apresentou uma redução significativa na expressão do receptor comparado aos grupos controle G2 ($8,38 \pm 0,73$) e G3 ($7,15 \pm 1,09$), sugerindo

que a mangiferina atua nas vias de sinalização de expressão do receptor CB_1 e do receptor $PPAR\gamma$. A utilização dos respectivos antagonistas rimonabant e GW 9662, isolados ou em conjunto, indica que o desenho e o modelo experimental utilizados no estudo funcionaram e que a dosagem do antagonista utilizado no estudo foi eficaz na inibição do $PPAR\gamma$.

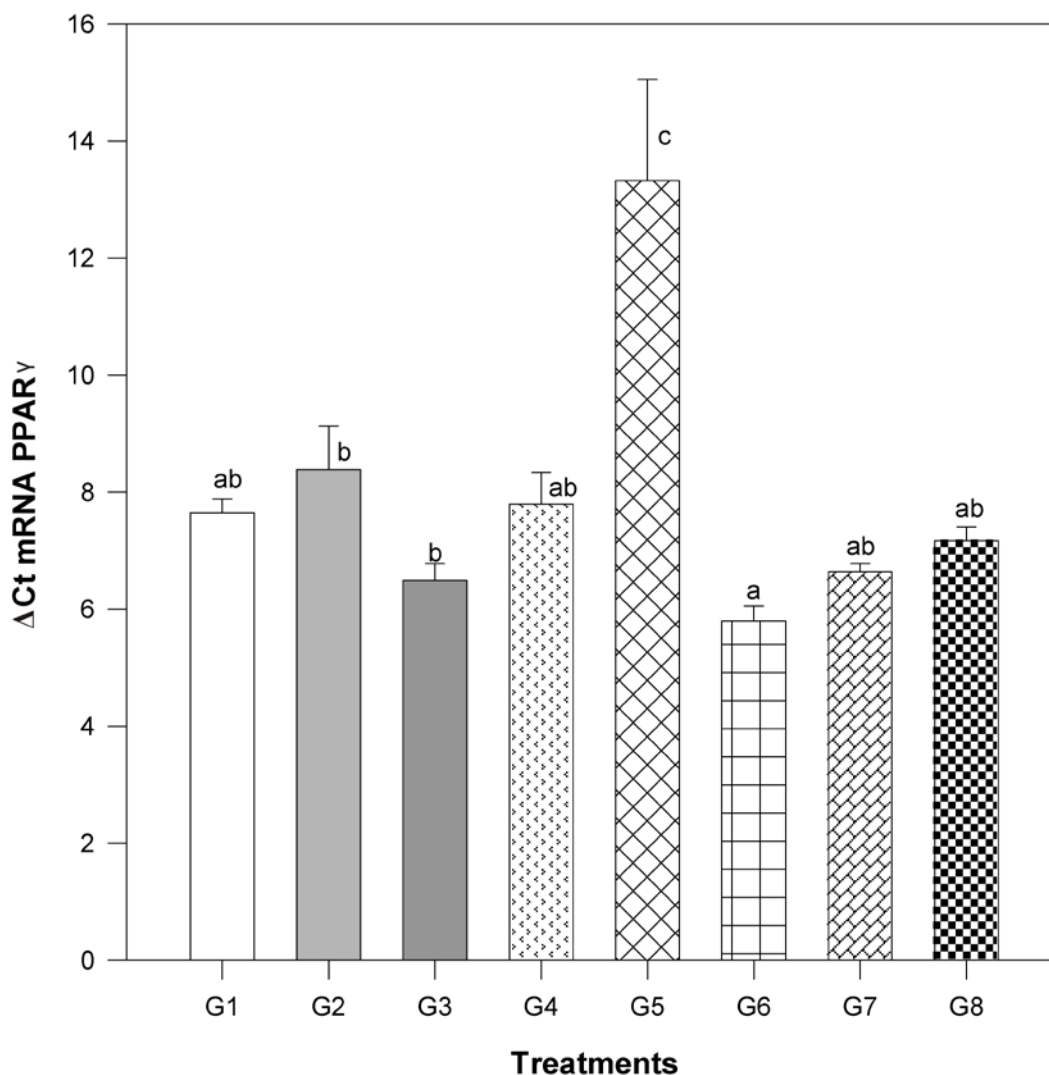


Figura 4 – Expressão gênica do mRNA do receptor $PPAR\gamma$ no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. G1: ração comercial, G2: dieta de cafeteria (DC), G3: DMSO + DC, G4-DC + extrato de folha de manga, G5: DC + mangiferina, G6-DC + mangiferina + GW9662, G7: DC + mangiferina + rimonabant, G8: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabant. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A expressão do mRNA do receptor do sistema endocanabinóide, o CB₁, (Figura 5) foi estatisticamente diferente entre os grupos.

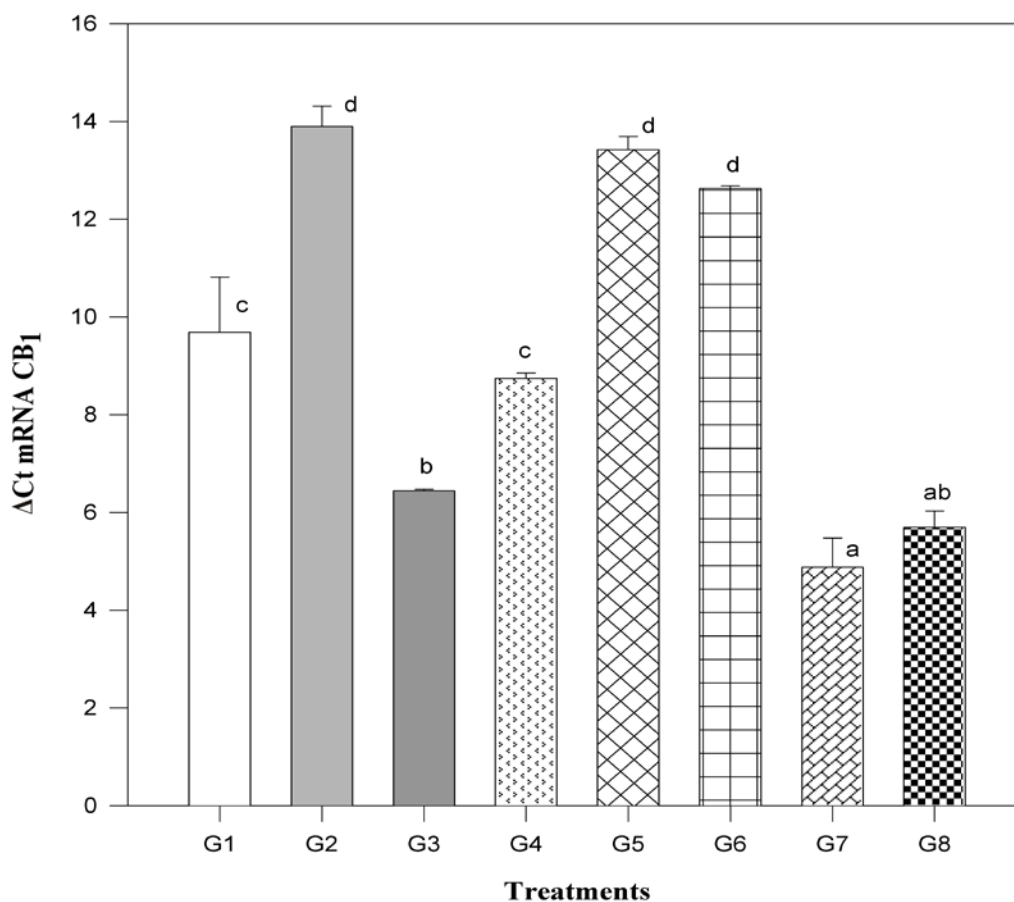


Figura 5 - Expressão gênica do mRNA do receptor endocanabinóide CB₁ no tecido adiposo dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. G1: ração comercial, G2: dieta de cafeteria (DC), G3: DMSO + DC, G4: DC + extrato de folha de manga, G5: DC + mangiferina, G6: DC + mangiferina + GW9662, G7: DC + mangiferina + rimonabant, G8: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabant. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A dieta de cafeteria aumentou a expressão do mRNA de CB₁, mostrando um efeito inflamatório, sendo este aumento abolido com o uso do extrato mas não com o uso da mangiferina. A utilização do veículo DMSO diminuiu a expressão de CB₁, mas mesmo assim, os efeitos da mangiferina ($13,42 \pm 0,27$) e do extrato de folha de manga ($8,74 \pm 0,11$) foram estatisticamente superiores. Dessa forma, as comparações foram feitas entre os grupos de tratamento e o grupo que recebeu dieta de cafeteria e DMSO. O grupo que recebeu o antagonista do receptor PPAR γ ($12,62 \pm 0,05$) apresentou uma maior expressão do receptor CB₁ comparado ao grupo que recebeu dieta de cafeteria e DMSO, sugerindo que o efeito da mangiferina em aumentar a expressão de CB₁ não foi

anulado pela presença do antagonista de PPAR α que para a mangiferina atuar no aumento da expressão de CB $_1$ ela utiliza vias independentes da ação de PPAR α . O uso do inibidor de CB $_1$ nos grupos G7 (4,87 \pm 0,60) e G8 (5,69 \pm 0,33), na dose utilizada, diminuiu significativamente a expressão do mRNA do receptor comparado com os grupos que receberam dieta de cafeteria (13,89 \pm 0,41) e dieta de cafeteria e DMSO (6,44 \pm 0,03) indicando que o efeito da mangiferina foi anulado na presença do antagonista de CB $_1$.

O veículo DMSO alterou alguns a concentração sérica de triacilgliceróis e a expressão do receptor CB $_1$.

4. Discussão

Os dados descritos demonstram o efeito do tratamento com extrato da folha de manga e da mangiferina no ganho de peso, na ingestão alimentar, na redução do tecido adiposo, nos parâmetros bioquímicos e na expressão de mRNA de diferentes receptores e marcadores envolvidos na adipogênese.

O consumo alimentar, o ganho de peso e o peso do tecido adiposo foram significativamente superiores comparando o grupo que recebeu dieta comercial (G1) com o grupo que recebeu dieta de cafeteria (G2), mostrando que a administração da dieta de cafeteria, mesmo em um curto período de tempo, aumenta os parâmetros analisados, estimulando assim a adipogênese. Ratos tratados com dieta rica em gordura, a fim de estimular a adipogênese e induzir a obesidade, apresentaram um aumento significativo no ganho de peso, ingestão alimentar e acúmulo de tecido adiposo (LIU et al., 2011; LUO et al., 2011; YANG et al., 2012; MACEDO et al., 2012; GUZMÁN-RUIZ et al., 2012). Esses dados são semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde confirma que a ingestão de dieta com alto teor de lipídios (45% a 60% de gordura) altera os parâmetros ganho de peso, ingestão alimentar e acúmulo do tecido adiposo. Contudo, deve-se ressaltar que o presente estudo foi realizado durante 21 dias, incluindo nesse tempo a adaptação, a indução e o tratamento, e os resultados encontrados foram semelhantes aos estudos realizados em períodos experimentais que variaram de 5 semanas a 3 meses.

Comparando os grupos em que os animais receberam dieta de cafeteria (G2) e dieta de cafeteria com DMSO (G3), verifica-se que houve uma diminuição no consumo alimentar, ganho de peso e peso do tecido adiposo, indicando que o DMSO interfere

nesses parâmetros. Dessa forma, as comparações serão feitas entre os grupos de tratamento e o grupo controle G3, uma vez que o mesmo recebeu o veículo DMSO.

Os grupos em que os animais receberam o extrato da folha de manga (G4) e a mangiferina (G5) apresentaram redução significativa no consumo alimentar comparado ao grupo controle G3. Estudo utilizando extrato aquoso de *Salacia reticulata*, planta popularmente conhecida e usada na terapia para o diabetes mellitus e que tem como principal composto bioativo a mangiferina, mostrou que o grupo que recebeu esse extrato apresentou uma redução significativa do ganho de peso, ingestão alimentar e peso do tecido adiposo (KISHIMO et al., 2009). Os grupos (G7 e G8) em que os animais foram tratados com o antagonista de CB₁, o rimonabant, o consumo alimentar, o peso corporal e o peso do tecido adiposo foram significativamente inferiores comparados ao grupo que receberam a dieta de cafeteria com DMSO. Ratos obesos induzidos com dieta rica em gordura (55%) tratados com 10 mg/kg/dia de rimonabant, mesma dose utilizada no presente estudo, diminuíram significativamente o peso, a ingestão alimentar e a massa de tecido adiposo (LIU et al., 2010; MΦLHΦJ et al., 2010; BOUSTANY-KARI et al., 2011; AHMED et al., 2012), mostrando que essa dose utilizada é suficiente para alterar esses parâmetros. Segundo Duvivier et al. (2009), ratos tratados com rimonabant na mesma dose utilizada no presente estudo, por 3 meses, diminuíram o consumo e o ganho de peso nos primeiros dias, contudo, ao passar do tempo, esses parâmetros se estabilizam ou até mesmo voltam ao normal. Estudos realizados em ratos tratados com antagonistas do receptor endocanabinóide CB₁ como NESS038C6, CP-945,598, AM4113, MJ15 mostraram que assim como o rimonabant, houve uma diminuição significativa do ganho de peso, ingestão alimentar e acúmulo de tecido adiposo (CHEN et al., 2010; LIN et al., 2010; HADCOCK et al., 2010; CLUNY et al., 2011; MASTINU et al., 2012). Os dados encontrados no estudo, assim como os dados descritos na literatura, demonstram que a utilização do antagonista do receptor CB₁, o rimonabant, diminui o consumo alimentar, o ganho de peso e a gordura corporal atenuando o processo adipogênico e conseqüentemente contribuindo para uma melhora do quadro inflamatório característico da obesidade.

Assim como o consumo alimentar, o parâmetro bioquímico HDL colesterol, também demonstrou o efeito benéfico do extrato da folha de manga e do composto bioativo mangiferina.

Comparando o grupo que recebeu ração comercial (G1) e o grupo que recebeu dieta de cafeteria (G2) percebe-se um aumento significativo nos triacilgliceróis e na

glicose, indicando que a dieta de cafeteria ofertada durante o período experimental alterou esses parâmetros. Estudos em que ratos foram alimentados com dieta rica em gordura demonstraram que houve um aumento significativo do colesterol total, dos triacilgliceróis e da glicose (LIU et al., 2011; YANG et al., 2012; LUO et al., 2012; MACEDO et al., 2012). Em contrapartida, comparando o grupo G2 com o grupo que recebeu dieta de cafeteria e DMSO (G3) nota-se uma diminuição significativa nesses mesmos parâmetros, mostrando que assim como no ganho de peso, o DMSO também interfere em alguns parâmetros bioquímicos. Dessa forma, a discussão é baseada no grupo G3 para comparação dos resultados dos tratamentos.

O HDL foi significativamente superior nos grupos de tratamento extrato da folha de manga (G4) e mangiferina (G5), comparado ao controle que foi tratado com dieta de cafeteria e DMSO (G3). Comparando os grupos de tratamento extrato de folha de manga (G4) e mangiferina (G5) com o grupo controle G3, que também recebeu o DMSO, nota-se que houve um aumento significativo dos triacilgliceróis circulantes em ambos os grupos. Os parâmetros colesterol total e glicose não foram alterados comparando os grupos G4 e G5 ao controle G3. Estudo utilizando a *Salacia reticulata*, planta utilizada no tratamento do diabetes mellitus, tendo como principal composto bioativo a mangiferina, mostrou que o grupo de animais que recebeu extrato aquoso dessa planta não apresentou nenhuma diferença entre os parâmetros analisados, colesterol total, triacilgliceróis e glicose (KISHIMO et al., 2009; SHIMADA et al., 2011). Os grupos de tratamento que receberam o antagonista do receptor CB₁ (G7 e G8) comparados ao grupo que recebeu a dieta de cafeteria e DMSO apresentaram um aumento significativo dos níveis de HDL comparado ao grupo que recebeu dieta de cafeteria e DMSO. Pode-se associar tal efeito devido ao tratamento com rimonabant que reduziu o consumo alimentar e conseqüentemente diminuiu o acúmulo do tecido adiposo. Estudo denominado “Rimonabant na Obesidade” realizado com voluntários de diferentes lugares dos Estados Unidos mostrou que o tratamento de pessoas obesas com o rimonabant aumenta significativamente os níveis da fração HDL comparado ao grupo de pessoas que não receberam o tratamento (JENSEN, 2007), demonstrando que, assim como no presente estudo, a utilização desse antagonista apresenta efeito hipolipemiante. Já no grupo em que os animais receberam o antagonista do receptor PPAR_α houve um aumento significativo da concentração de triacilgliceróis e glicose comparada ao grupo G3. Estudos onde são utilizados agonistas do receptor PPAR_γ no tratamento de ratos que receberam dieta rica em gordura mostraram que houve uma redução significativa do

colesterol total e dos triacilgliceróis e que a fração HDL foi estatisticamente superior no grupo de tratamento (CHOI et al., 2007; BHATTARAI et al., 2010; PITA et al., 2012). Esses estudos demonstram que os resultados encontrados no presente estudo corroboram com a literatura.

Os resultados da expressão gênica demonstram que em alguns parâmetros estudados, a mangiferina e o extrato da folha de manga apresentam um efeito benéfico sobre a adipogênese.

A expressão do mRNA da adiponectina no tecido adiposo foi significativamente inferior nos grupos em que os animais foram tratados com o extrato da folha de manga (G4) e a mangiferina (G5) comparados ao grupo controle que recebeu dieta de cafeteria e DMSO (G3). Não houve diferença na expressão da adiponectina entre os grupos controle. Células de adipócitos 3T3-L1 tratadas com extrato aquoso de *Salacia reticulata*, onde o composto bioativo mais abundante é a mangiferina, mostraram que houve uma redução significativa na expressão da adiponectina (SHIMADA et al., 2011). Comparando os grupos que receberam o rimonabant, a expressão gênica da adiponectina foi estatisticamente superior nos grupos (G7 e G8) que receberam o antagonista do receptor CB₁, o rimonabant comparado ao grupo controle G3. A utilização do rimonabant e do antagonista do receptor CB₁, o NESS038C6, no tratamento de ratos com risco cardiometabólico, aumentou a expressão da adiponectina no tecido adiposo (LAZZARI et al., 2011; PANG et al., 2011; MASTINU et al., 2012).

Os resultados da expressão gênica do mRNA da leptina demonstraram que houve uma redução significativa da expressão nos grupos que receberam a dieta de cafeteria (G2) e a dieta de cafeteria com DMSO (G3), sendo que não houve diferença entre os grupos G2 e G3. Esses dados sugerem que a dieta de cafeteria utilizada no estudo alterou a expressão gênica da leptina e que o veículo DMSO não interfere nesse parâmetro. Os dados da literatura não corroboram com os resultados encontrados. Estudo realizado com voluntários que apresentaram sobrepeso mostrou que os mesmos apresentaram um aumento significativo na expressão da leptina no tecido adiposo comparados com pessoas eutróficas (LECKE et al., 2011). Crianças obesas e com risco cardiometabólico também apresentaram um aumento significativo na expressão da leptina (RÍO-CAMACHO et al., 2013). Os grupos de tratamento extrato da folha de manga (G4) e mangiferina (G5) apresentaram um aumento estatisticamente significativo na expressão da leptina ao grupo que recebeu dieta de cafeteria e DMSO. A expressão da leptina nos grupos os tratados com os antagonistas dos receptores PPAR γ e CB₁

administrados isolados (G6, G7) ou combinados (G8) não foi afetado pelo efeito dos tratamentos com o extrato de folha de manga e a mangiferina, sugerindo que CB₁ e PPAR γ não estão relacionados à expressão da leptina.

Assim como a adiponectina, a expressão gênica da resistina no tecido adiposo dos animais tratados com ração comercial, dieta de cafeteria e dieta e cafeteria com DMSO não foi alterada, mostrando que a utilização da dieta escolhida no estudo e o veículo DMSO não alteram esse parâmetro. A literatura relata dados diferentes aos encontrados no presente estudo. Ratos alimentados com dieta rica em gordura (60%) por 10 semanas apresentaram um aumento significativo na expressão gênica da leptina e resistina e uma diminuição significativa da expressão da adiponectina (CATTA-PRETA et al., 2012). Resultado semelhante é encontrado em ratos alimentados com dieta rica em gordura que diminuíram significativamente a expressão da adiponectina e da resistina e aumentaram a expressão da leptina (CHOI et al., 2007; STROUBINI et al., 2009; LUO et al., 2011; LIU et al., 2011; YANG et al., 2012; WANG et al., 2012; MACEDO et al., 2012). Contudo, a diminuição da ingestão de gordura aumenta significativamente a expressão da adiponectina (DING et al., 2012) e diminui a expressão da resistina no tecido adiposo (FERNÁNDEZ et al., 2009). Já o grupo em que os animais foram tratados com o extrato da folha de manga (G4) também não apresentaram diferença na expressão da resistina. Já o grupo tratado com a mangiferina (G5) aumentou significativamente a expressão da resistina, ambos comparados ao grupo de controle dieta de cafeteria e DMSO. Esses dados sugerem a mangiferina com uma potencial atividade preventiva de risco metabólico. Nos grupos em que os animais foram tratados com seus antagonistas (G6 e G7), GW 9662 e rimonabant respectivamente, a expressão da resistina foi estatisticamente superior, sendo que a administração combinada desses antagonistas (G8) não alterou a expressão comparado ao G3. Os dados sugerem que a mangiferina ativa o receptor CB₁ e o receptor PPAR γ e que eles podem estar correlacionados, assim como descrito em revisão realizada por Addario et al. (2013), onde essa correlação foi também sugerida.

Assim como a expressão gênica da resistina e da adiponectina no tecido adiposo, a expressão do mRNA do receptor PPAR γ dos animais tratados com ração comercial (G1), dieta de cafeteria (G2) e dieta e cafeteria com DMSO (G3) não foi alterada, mostrando que a dieta de cafeteria e o veículo DMSO não alteram a expressão desse receptor. Contudo, os dados obtidos não corroboram com a literatura, onde ratos alimentados com dieta rica em gordura apresentaram uma expressão do receptor PPAR γ

estatisticamente inferior comparada ao grupo controle (DUQUE-GUIMARÃES et al., 2009). Em estudo realizado com células de adipócitos 3T3-L1 tratadas com um produto final da peroxidação lipídica, o 4-hidroxinonenal mostrou que a expressão gênica do receptor PPAR γ foi estatisticamente superior (WANG et al., 2012a). No grupo em que os animais foram tratados com o extrato da folha de manga (G4), esse parâmetro também não foi alterado. Em contrapartida, os animais que receberam a mangiferina (G5) apresentaram uma expressão do receptor PPAR γ no tecido adiposo estatisticamente superior comparado ao grupo que recebeu dieta de cafeteria e DMSO, sugerindo a ativação do receptor pela mangiferina. A utilização do seu antagonista, o GW 9662 (G6) diminuiu significativamente a expressão de PPAR γ comparado ao G3, mostrando que a dose do antagonista utilizada no estudo foi adequada, assim como demonstrado por Goyal et al. (2010). Células de adipócitos 3T3-L1 tratadas com extrato aquoso de *Salacia reticulata*, que apresenta como principal composto a mangiferina, mostraram que houve uma inibição estatisticamente significativa do receptor PPAR γ (SHIMADA et al., 2011). Já a utilização do antagonista combinado com o rimonabant, não apresentou diferença na expressão. A utilização de agonistas do receptor PPAR γ apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiadipogênica, e em processos inflamatórios ocorre um aumento na expressão do mRNA do PPAR γ sugerindo que ele seja estimulado para combater a inflamação (SUEYOSHI et al., 2010; AROZAL et al., 2011). No presente estudo, o aumento da expressão do mRNA do PPAR γ no grupo em que os animais foram tratados com a mangiferina demonstrou uma atividade protetora dos riscos metabólicos e da adipogênese desse receptor, devido a sua ativação pelo composto bioativo estudado.

A dieta de cafeteria (G2) aumentou a expressão do mRNA de CB₁ comparado ao grupo que recebeu ração comercial (G1). A utilização do veículo DMSO diminuiu a expressão de CB₁, demonstrando que a utilização desse veículo interfere na expressão desse receptor. Os grupos em que os animais foram tratados com o extrato da folha de manga (G4) e a mangiferina (G5) aumentaram significativamente a expressão do mRNA do receptor CB₁ comparado ao grupo que recebeu dieta de cafeteria e DMSO (G3). O grupo que foi tratado com o antagonista de CB₁ (G7), o rimonabant, apresentou uma redução significativa na expressão de CB₁. Já o grupo que recebeu o antagonista de PPAR γ (G6) aumentou significativamente a expressão do receptor CB₁. Contudo, a utilização dos antagonistas combinados, não demonstrou alteração na expressão do mRNA do receptor CB₁. Esses dados sugerem que a mangiferina ativa ambos os

receptores, PPAR γ e CB₁, sugerindo um efeito atenuante da adipogênese. A utilização do rimonabant e do antagonista do receptor CB₁, o NESS038C6, no tratamento de ratos obesos diminuiu significativamente a expressão do mRNA da leptina e aumentou a expressão da adiponectina, porém não houve diferença na expressão gênica do receptor CB₁ no tecido adiposo (LAZZARI et al., 2011; PANG et al., 2011; MASTINU et al., 2012). Segundo Vigoa et al. (2009), o bloqueio do sistema endocanabinóide melhora os riscos cardiometabólicos e a obesidade. Contudo, estudos recentes demonstram que a utilização do rimonabant e do agonista do receptor CB₁, o WIN 55,212-2, comportam-se como anti-inflamatórios e modulam o sistema imune, e que tais efeitos são obtidos devido a ativação do receptor CB₁ (LAGO et al., 2012; TAUBER et al., 2012; MALFITANO et al., 2012; KAPLAN, 2013).

Isso sugere que existe uma interação entre os receptores, uma vez que, como demonstrado anteriormente, na ausência dos antagonistas de γ PPARCB₁, a mangiferina aumenta a expressão de ambos os receptores.

5. Conclusão

O estudo mostrou que a mangiferina e o extrato da folha de manga atenuaram os fatores de risco metabólico, uma vez a mangiferina diminuiu a expressão da adiponectina, da leptina e do receptor PPAR γ e aumentou a expressão do receptor CB₁, enquanto o extrato da folha de manga diminuiu a expressão da resistina e do receptor CB₁ e aumentou a expressão da adiponectina e do receptor PPAR γ . Esses resultados sugerem que os receptores PPAR γ e CB₁ são ativados pela mangiferina e podem estar relacionados.

Agradecimentos

As agências de fomento, FAPEMIG, CNPq e CAPES.

6. Referências Bibliográficas:

AHMED, O. M.; GABAR, M.A.; ALI, T. M. Impacts of the coexistence of diabetes and hypothyroidism on body weight gain, leptin and various metabolic aspects in albino rats. *Journal of Diabetes and Its Complications*, v. 26, p. 491-500, 2012.

ALEMANY, M. Regulation of adipose tissue energy availability through blood flow control in the metabolic syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 52, p. 2108-2119, 2012.

AROZAL, W.; WATANABE, K.; VEERAVEEDU, P.T.; MA, M.; THANDAVARAYAN, R.A.; SUKUMARAN, V.; SUZUKI, K.; KODAMA, M.; AIZAWA, Y. Telmisartan prevents the progression of renal injury in daunorubicin rats with the alteration of angiotensin II and endothelin-1 receptor expression associated with its PPAR- γ agonist actions. *Toxicology*, v. 279, p. 91-99, 2011.

BHATTARAI, B.R.; KAFLE, B.; HWANG, J.S.; HAM, S.W.; LEE, K.H.; PARK, H.; HAN, I.O.; CHO, H. Novel thiazolidinedione derivatives with anti-obesity: dual action as PTP1B inhibitors and PPAR- γ activators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, p. 6758-6763, 2010.

BOUSTANY-KARI, C.; JACKSON, V. M.; GIBBONS, C. P.; SWICK, A. G. Leptin potentiates the anti-obesity effects of rimonabant. *European Journal of Pharmacology*, v. 658, p. 270-276, 2011.

BREITFELD, J.; STUMVOLL, M.; KOVACS, P. Genetics of adiponectin. *Biochimie*, v. 94, p. 2157-2163, 2012.

CATTA-PRETA, M.; MARTINS, M. A.; BRUNINI, T. M. C.; RIBEIRO, A. C. M.; LACERDA, C. A. M.; AGUILA, M. B. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by diferente high-fat diets. *Nutrition*, v. 28, p. 212-219, 2012.

CHEN, W.; TANG, H.; LIU, H.; LONG, L.; GONG, Z.; ZHENG, J.; CHI, M.; XIE, Y., ZHENG, Z.; LI, S.; WANG, L. Novel selective antagonist of the cannabinoid CB₁ receptor, Mj15, with prominent anti-obesity effect in rodent models. *European Journal of Pharmacology*, v. 637, p. 178-185, 2010.

CHIBA, F.Y.; COLOMBO, N.H.; SHIRAKASHI, D.J.; SILVA, V.C.; MOIMAZ, S.A.S.; GARBIN, C.A.S.; ANTONIALI, C.; SUMIDA, D.H. NaF treatment increases TNF- α and resistin concentrations and reduces insulin signal in rats. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 138, p. 3-7, 2012.

CHOI, K. C.; LEE, S.Y.; YOO, H. J.; RYU, O. H.; LEE, K. W.; KIM, S. M.; BAIK, S. H.; CHOI, K. M. Effect of PPAR- δ agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and resistin in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 357, p. 62-67, 2007.

CLUNY, N. L.; CHAMBERS, A. P.; VEMURI, V.K.; WOOD, J. T.; ELLER, L. K.; FRENI, C.; REIMER, R. A.; MAKRIYANNIS, A.; SHARKEY, K. A. The neutral cannabinoid CB₁receptor antagonist AM 4113 regulates body weight through changes in energy intake in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 97, p. 537-543, 2011.

D'ADDARIO, C.; FRANCESCO, A.D.; PUCCI, M.; AGRÒ, A.F.; MACCARRONE, M. Epigenetic mechanisms and endocannabinoid signaling. *FEBS Journal*, in press, 2013.

DING, Q.; ASH, C.; MRACEK, T.; MERRY, B.; BING, C. Caloric restriction increases adiponectin expression by adipose tissue and prevents the inhibitory effect of insulin on circulation adiponectin in rats. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 23, p. 867-874, 2012.

DUQUE-GUIMARÃES, D.E.; CASTRO, J.; MARTINEZ-BOTAS, J.; SARDINHA, F.L.C.; RAMOS, M.P.; HERRERA, E.; CARMO, M.G.T. Early and prolonged intake of partially hydrogenated fat alters the expression. Of genes in rat adipose tissue. *Basic Nutritional Investigation*, v.25, p. 782-789, 2009.

DUVIVIER, V.F.; DELAFOY-PLASSE, L.; DELION, V.; LECHEVALIER, P.; BAIL, J.C.; GUILLOT, E.; PRUNIAUX, M.P.; GALZIN, A.M. Beneficial effect of a chronic treatment with rimonabant on pancreatic function and β -cell morphology in Zucker Fatty rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 616, p. 314-320, 2009.

FERNÁNDEZ, C.M.; MOLTÓ, E.; GALLARDO, N.; ARCO, A.D.; MARTINEZ, C.; ANDRÉS, A.; ROS, M.; CARRASCOSA, J.M.; ARRIBAS, C. The expression of rat resistin isoforms is differentially regulated in visceral adipose tissues: effects of aging and food restriction. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 58, p. 204-211, 2009.

FUNG, A.; VIZCAYCHIPI, M.; LLOYD, D.; WAN, Y.; MA, D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: Mechanistic prospects. *Brain Research*, v. 1446, p. 144-155, 2012.

GOYAL, S.; ARORA, S.; BHATT, T.K.; DAS, P.; SHARMA, A.; KUMARI, S.; ARYA, D.S. Modulation of PPAR- γ by telmisartan protects the heart against myocardial infarction in experimental diabetes. *Chemical-Biological Interactions*, v. 185, p. 271-280, 2010.

GUZMÁN-RUIZ, R.; STUCCHI, P.; RAMOS, M. P.; SEVILLANO, J.; SOMOZA, B.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.; RUIZ-GAYO, M. Leptin drives fat distribution during diet-induced obesity in mice. *Endocrinología y Nutrición*, v. 59, n. 6, p. 354-361, 2012.

HADCOCK, J.R.; GRIFFITH, D. A.; IREDALE, P.A.; CARPINO, P.A.; DOW, R.L.; BLACK, S.C.; O'CONNOR, R.; GAUTREAU, D.; LIZANO, J.S.; WARD, K.; HARGROVE, D.M.; KELLY-SULLIVAN, D.; SCOTT, D.O. *In vitro* and *in vivo* pharmacology of CP-945,598, a potent and selective cannabinoid CB₁ receptor antagonist for the management of obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 394, p. 366-371, 2010.

HOU, S.; WANG, F.; LI, Y.; LI, Y.; WANG, M.; SUN, D.; SUN, C. Pharmacokinetic study of mangiferin in human plasma after oral administration. *Food Chemistry*, v. 132, p. 289-294, 2012.

JENSEN, M.D. What is the potential role of cannabinoid-1 receptor blockade in glucose and lipid management? *The American Journal of Medicine*, v. 120, p. s25-s32, 2007.

KAPLAN, B.L.F. The role of CB₁ in immune modulation by cannabinoids. *Pharmacology & Therapeutics*, in press, 2013.

KAWAKAMI, T.; HANAO, N.; NISHIYAMA, K.; KADOTA, Y.; INOUE, M.; SATO, M.; SUZUKI, S. Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 258, p. 32-42, 2012.

KIM, J.; LI, Y.; WATKINS, B.A. Endocannabinoid signaling and energy metabolism: A target for dietary intervention. *Nutrition*, v. 27, p. 624-632, 2011.

KISHINO, E.; ITO, T.; FUJITA, K.; KIUCHI, Y. A mixture of *Salacia reticulata* (kotalahimbutu) aqueous extract and cyclodextrin reduces body weight gain, visceral fat accumulation, and total cholesterol and insulin increases in male Wistar fatty rats. *Nutrition Research*, v. 29, p. 55-63, 2009.

LAGO, E.; MORENO-MARLET, M.; CABRANES, A.; RAMOS, J.A.; FERNÁNDEZ-RUIZ. Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB₁ receptor-mediated anti-inflammatory effects. *Neuropharmacology*, v. 62, p. 2299-2308, 2012.

LAZZARI, P.; SANNA, A.; MASTINU, A.; CABASINO, S.; MANCA, I.; PANI, L. Weight loss induced by rimonabant is associated with an altered leptin expression and hypothalamic leptin signaling in diet-induced obese mice. *Behavioural Brain Research*, v. 217, p. 432-438, 2011.

LECKE, S.B.; MATTEI, F.; MORSCH, D.M.; SPRITZER, P.M. Abdominal subcutaneous fat gene expression and circulating levels of leptin and adiponectin in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, v.95, p. 2044-2049, 2011.

LIN, Y.; SHIA, K.S.; HSIAO, W.C.; HSIEH, W.P.; YEH, T.K.; TSENG, S.L.; HSU, C.Y.; CHAO, Y.S.; HUNG, M.S. Biphasic suppression of appetite by cannabinoid CB₁ receptor antagonists with distinct functional activities. *Pharmacology Research*, v. 62, p. 337-343, 2010.

LINK, A.F.; BALAGUER, A.G. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemistry Pharmacology*, v. 80, p. 1771-1792, 2010.

LIU, H.; WANG, K.; TANG, Y.; SUN, Z.; JIAN, L.; LI, Z.; WU, B.; HUANG, C. Structure elucidation of *in vivo* and *in vitro* metabolites of mangiferin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, p. 1075-1082, 2011.

LIU, J.; ZHOU, L.; XIONG, K.; GOLLEWSKI, G.; MUKHOPADHYAY, B.; TAM, J.; YIN, S.; GAO, P.; SHAN, X.; PICKEL, J.; BATALLER, R.; O'HARE, J.; SCHERER, T.; BUETTNER, C.; KUNOS, G. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology*, v. 142, p. 1218-1228, 2012.

LIU, S.; WU, H. J.; ZHANG, Z. Q.; CHEN, Q.; LIU, B.; WU, J. P.; ZHU, L. The ameliorating effect of rosiglitazone on experimental nonalcoholic steatohepatitis is associated with regulating adiponectin receptor expression in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 650, p. 384-389, 2011.

LIU, W. J.; JIN, H. Y.; PARK, J. H.; BAEK, H. S.; PARK, T. S. Effect of rimonabant, the cannabinoid CB₁ receptor antagonist, on peripheral nerve in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 637, p. 70-75, 2010.

LUO, W.; BODARY, P.F.; SHEN, Y.; WICKENHEISER, K.J.; ÖHMAN, M.K.; GUO, C., BAHROU, K.L.; MYERS JR. M.G.; EITZMAN, D.T. Leptin receptor-induced STAT3-independent signaling pathways are protective against atherosclerosis in a murine model of obesity and hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, v. 214, p. 81-85, 2011.

MACEDO, I.C.; MEDEIROS, L.F.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, C.M.; ROZISKY, J.R.; SCARABELOT, V.L.; SOUZA, A.; SILVA, F.R.; SANTOS, V.S.; CIOATO, S.G.; CAUMO, W.; TORRES, I.L.S. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides*, v. 38, p. 189-196, 2012.

MALFITANO, A.M.; LAEZZA, C.; GALGANI, M.; MATARESE, G.; D'ALESSANDRO, A.; GAZZERRO, P.; BIFULCO, M. The CB₁ receptor antagonist rimonabant controls cell viability and ascetic tumor growth in mice. *Pharmacology Research*, v. 65, p. 365-371, 2012.

MASTINU, A.; PIRA, M.; PANI, L.; PINNA, G. A.; LAZZARI, P. NESS038C6, a novel selective CB1 antagonist agent with anti-obesity activity and improved molecular profile. *Behavioural Brain Research*, v. 234, p. 192-204, 2012.

MURUGANANDAN, S.; GUPTA, S.; KATARINA, M.; LAL, J.; GUPTA, P.K. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology*, v. 176, p. 165–173, 2002.

MØLHØJ, S.; HANSEN, H.S.; SCHWEIGER, M.; ZIMMERMANN, R.; JOHANSEN, T.; MALMLÖF. Effect of the cannabinoid receptor-1 antagonist rimonabant on lipolysis in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 646, p. 38-45, 2010.

NAM, D.H.; LEE, M.H.; KIM, J.E.; SONG, H.K.; KANG, Y.S.; LEE, J.E.; KIM, H.W.; CHA, J.J.; HYUN, Y.Y.; KIM, S.H.; HAN, S.Y.; HAN, K.H.; HAN, J.Y.; CHA, D.R. Blockade of cannabinoid receptor 1 improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in db/db mice. *Endocrinology*, v. 153, p. 1387-1396, 2012.

NUÑEZ, A.J.; DELGADO, R.; GARRIDO, G.; GARCIA, D.; GUEVARA, M.; PARDO, G. The paradox of natural products as pharmaceuticals experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacology Research*, v. 55, p. 351-358, 2009.

O'SULLIVAN, S.E.; KENDALL, D.A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology*, v. 215, p. 611-616, 2010.

OHASHI, K.; OUCHI, N.; MATSUZAWA, Y. Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie*, v. xx, p. 1-6, 2012.

PANG, Z.; WU, N.N.; ZHAO, W.; CHAIN, D.C.; SCHAFFER, E.; ZHANG, X.; YAMDAGNI, P.; PALEJWALA, V.A.; FAN, C.; FAVARA, S.G.; DRESSLER, H.M.; ECONOMIDES, K.D.; WEINSTOCK, D.; CAVALLO, J.S.; NAIMI, S.; GALZIN, A.M.; GUILLOT, E.; PRUNIAUX, M.P.; TOCCI, M.J.; POLITES, H.G. The central cannabinoid CB₁ receptor is required for diet-induced obesity and rimonabant's antiobesity effects in mice. *Obesity*, v. 19, p. 1923-1934, 2011.

PITA, J.; PANADERO, A.; SORIANO-GUILLÉN, L.; RODRÍGUEZ, E.; ROVIRA, A. The insulin sensitizing effects of PPAR γ agonist are associated to changes in adiponectin index and adiponectin receptors in Zucker fatty rats. *Regulatory Peptides*, v. 174, p. 18-25, 2012.

POULSEN, L.L.C.; SIERSBAEK, M.; MANDRUP, S. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 23, p. 631-639, 2012.

QUARTA, C.; BELLOCCHIO, L.; MANCINI, G.; MAZZA, R.; CERVINO, C.; BRAULKE, L.J.; FEKETE, C.; LATORE, R.; NANNI, C.; BUCCI, M.; CLEMENS, L.E.; HELDMAIER, G.; WATANABE, M.; LESTE-LASSERE, T.; MAITRE, M.; TEDESCO, L.; FANELLI, F.; REUSS, S.; KLAUS, S.; SRIVASTAVA, R.K.; MONORY, K.; VALERIO, A.; GRANDIS, A.; GIORGIO, R.D.; PASQUALI, R.; NISOLI, E.; COTA, D.; LUTZ, B.; MARSICANO, G.; PAGOTTO, U. CB₁ signaling in forebrain and sympathetic neurons is a key determinant of endocannabinoid actions on energy balance. *Cell Metabolism*, v. 11, p. 273-285, 2010.

RÍO-CAMACHO, G.D.; DOMÍNGUEZ-GARRIDO, M.N.; PITA, J.; ARAGÓN, I.; COLLADO, R.; SORIANO-GUILLÉN, L. Masa ventricular izquierda, espirometría basal forzada y perfil de adipocitocinas en niños obesos con y sin síndrome metabólico, *Anales de Pediatría*, v. 78, p. 27-34, 2013.

RODEIRO, I.; HERNANDEZ, S.; MORFFI, J.; HERRERA, J.A.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DELGADO, R.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J. Evaluation of genotoxicity and DNA protective effects of mangiferin, a glucosylxanthone isolated from *Mangifera indica* L. stem bark extract. *Food and Chemistry Toxicology*, v. 50, p. 3360-3366, 2012.

SHIMADA, T.; NAGAI, E.; HARASAWA, Y.; WATANABE, M.; NEGISHI, K.; AKASE, T.; SAI, Y.; MIYAMOTO, K.; ABURADA, M. Salacia reticulata inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, p. 67-74, 2011.

STROUBINI, T.; PERELAS, A.; LIAPI, C.; PERREA, D.; DONTAS, I.; TZAVARA, C.; GALANOPOULOU, P. Serum adiponectin and resistin in rats under three isocaloric diets: The effect of sibutramine. *Cytokine*, v. 46, p. 171-175, 2009.

SUEYOSHI, S.; MITSUMATA, M.; KUSUMI, Y.; NIIHASHI, M.; ESUMI, M.; YAMADA, T.; SAKURAI, I. Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α and PPAR- γ in human atherosclerosis. *Pathology- Research and Practice*, v. 206, p. 429-438, 2010.

TAUBER, S.; PAULSEN, K.; WOLF, S.; SYNWOLDT, P.; PAHL, A.; SCHNEIDER-STOCK, R.; ULLRICH, O. Regulation of MMP-9 by a WIN-Binding site in the monocyte-macrophage system independent from cannabinoid receptors. *PLOS ONE*, v. 7, p. 1-19, 2012.

WANG, B.; YU, Y.; HAN, L. Adiponectin improves endothelial dysfunction caused by elevated FFAs levels, partially through cAMP-dependent pathway. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 97, p. 119-124, 2012.

WANG, Z.; DOU, X.; GU, D.; SHEN, C.; YAO, T.; NGUYEN, V.; BRAUNSCHWEIG, C.; SONG, Z. 4-hydroxynonenal differentially regulates adiponectin gene expression and secretion via activating PPAR γ and accelerating ubiquitin-proteasome degradation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 349, p. 222-231, 2012a.

XU, D.; MURAKOSHI, N.; IGARASHI, M.; HIRAYAMA, A.; ITO, Y.; SEO, Y.; TADA, H.; AONUMA, K. PPAR- γ activator Pioglitazone prevents age-related atrial fibrillation susceptibility by improving antioxidant capacity and reducing apoptosis in a rat model. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, v. 23, p. 209-217, 2012.

YANG, X.; ZHANG, Y.; LIN, J.; PEN, A.; YING, C.; CAO, W.; MAO, L. A lower proportion of dietary saturated/monounsaturated/polyunsaturated fatty acids reduce the expression of adiponectin in rats fed a high-fat diet. *Nutrition Research*, v. 32, p. 285-291, 2012.

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS
Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-3783

CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) / UFV certifica que o projeto n.º 86/2011, intitulado “*Efeito da mangiferina e do extrato das folhas de manga Ubá (mangifera indica L) na modulação da expressão dos receptores CB₁, PPAR gama e nos marcadores inflamatórios em animais com Síndrome metabólica*”, coordenado pelo professor Luiz Humberto de Queiroz, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 16/11/2011.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 86/2011, “*Effect of mangiferin and the extract of Ubá mango (Mangifera indica L) in modulating the expression of CB₁ receptors, PPAR gamma and inflammatory markers in animals with metabolic syndrome*”, is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on November 16, 2011 approved this process.

Viçosa, 16 de novembro de 2011.

Professor Cláudio César Fonseca
Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV - CEUA
Coordenador

ANEXO 2

Análise da mangiferina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A quantificação de mangiferina no extrato da folha de manga foi realizada de acordo com Ling *et al.* (2009), em aparelho HPLC Shimadzu LC-2AD (Shimadzu®, Japão), equipado com detector de arranjo diodo SPD-M20A, coluna C₁₈ (150 x 4,6mm, 4,6µm), com pé -coluna C₁₈. A fase móvel consistiu de solvente A: água acidificada com 0,3% de ácido acético P.A. e solvente B: acetonitrila (grau HPLC). O gradiente iniciou-se com 10% do solvente B e 90% do solvente A por 5 minutos, seguido de 20% do solvente B e 80% do solvente A por 15 minutos, 100% do solvente B por 15 minutos e finalização com 10% do solvente B e 90% do solvente A por 10 minutos para lavagem e restabelecimento das condições iniciais da coluna. O comprimento de onda usado para detecção foi de 254 nm e a temperatura da coluna foi de 40 °C. O fluxo foi de 1 ml/min e o volume injetado foi de 50 µl. Realizou-se a quantificação pelo método de padrão externo com mangiferina, sendo injetados cinco diferentes volumes de solução do padrão a 1mg/ml. Os volumes e massas injetados do padrão e as áreas dos picos obtidos estão descritos na Tabela abaixo. A curva padrão da mangiferina está representada na Figura 1. Dissolveu-se 1mg do extrato em 1,5 ml em solução metanol grau HPLC/água destilada (2:1), filtrando-o em seguida.

Tabela 1 –Volumes e massas do padrão mangiferina injetados no HPLC e áreas de picos obtidas

Volume injetado (µl)	Massa injetada (µg)	Área do pico
5	3,33	11661089
10	6,66	24156048
15	9,99	36572766
20	13,32	48616870
25	16,65	58459838

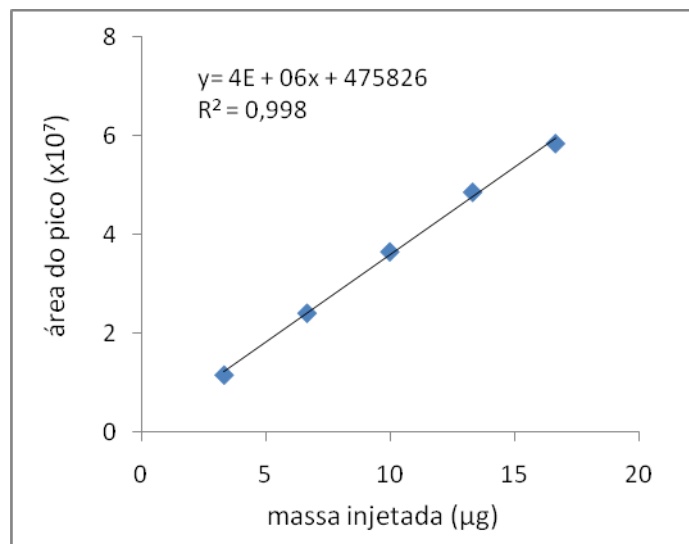


Figura 1 - Curva padrão da mangiferina e equação obtida a partir da injeção no HPLC de diferentes massas de mangiferina

Isolamento da mangiferina e confirmação estrutural

O processo de purificação do extrato etanólico obtido das folhas de *Mangifera indica* forneceu 21g de mangiferina, sendo o rendimento de 3,60% a partir da droga seca e 5,83% a partir do extrato. O composto apresentou cromatograma no HPLC com pico único (TR 8.2 min) e espectro UV obtido por arranjo fotodiodo compatível com padrão (Figura 2).

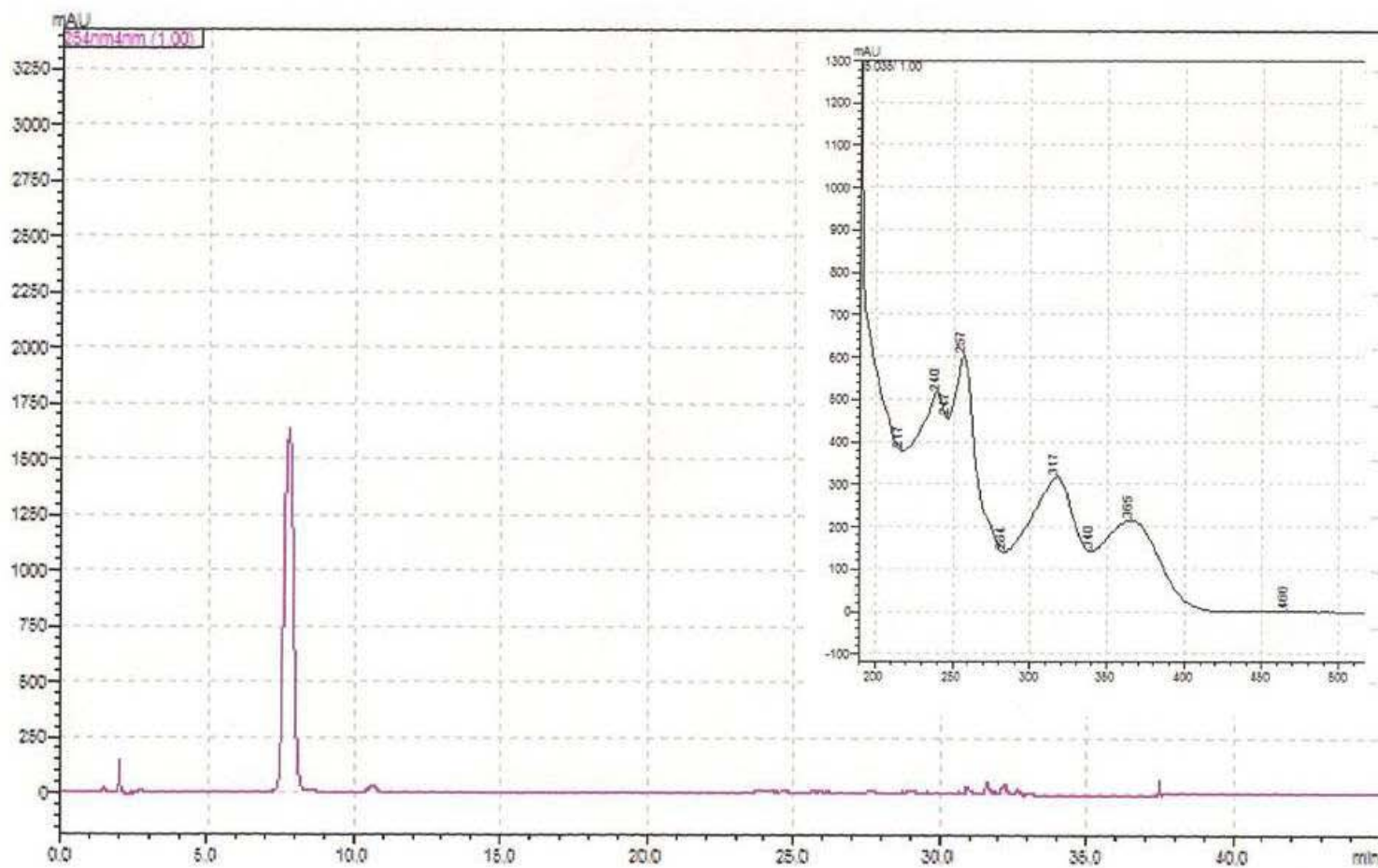


Figura 2 - Cromatograma e espectro UV da mangiferina purificada a partir de folhas de *M. indica*. Condições: detector de arranjo diodo; coluna C18; fase móvel: solvente A 0,3 % ácido acético P.A. e solvente B acetonitrila grau HPLC; gradiente: 10% de B por 5 min, 20% de B por 15, 100% de B por 15 min, 10% de B por 10 min; fluxo:1ml/min, volume injetado: 50 μ l