

NATALIA MEDINA RAMÍREZ

**EFEITO DO CHÁ DE FOLHAS DE MANGA (*Mangifera indica* L.) NO  
ESTRESSE OXIDATIVO, NA INFLAMAÇÃO, NA ESTEATOSE HEPÁTICA E  
NA FUNÇÃO ENDOTELIAL EM RATOS OBESOS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M491e  
2018  
Medina Ramírez, Natalia, 1986-  
Efeito do chá de folhas de manga (*Mangifera indica* L.) no  
estresse oxidativo, na inflamação, na esteatose hepática e na  
função endotelial em ratos obesos / Natalia Medina Ramírez. –  
Viçosa, MG, 2018.  
xviii, 72f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: José Humberto de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Biomarcadores. 2. Marcadores genéticos.  
3. Antioxidantes - Efeito fisiológico. 4. Dieta hiperlipídica.  
5. Stress oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 572.8

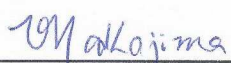
NATALIA MEDINA RAMÍREZ

**EFEITO DO CHÁ DE FOLHAS DE MANGA (*Mangifera indica* L.) NO ESTRESSE OXIDATIVO, NA INFLAMAÇÃO, NA ESTEATOSE HEPÁTICA E NA FUNÇÃO ENDOTELIAL EM RATOS OBESOS**


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

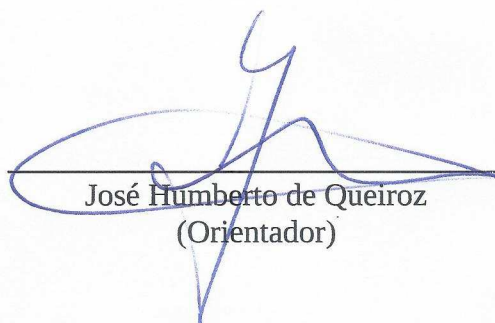
APROVADA: 14 de dezembro de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
Maria Eliza de Castro Moreira

  
\_\_\_\_\_  
Vania Mayumi Nakajima

  
\_\_\_\_\_  
Cláudio Lisías Mafra de Siqueira  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Hércia Stampini Duarte Martino  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
José Humberto de Queiroz  
(Orientador)

Aos meus familiares e amigos, especialmente aos  
meus pais José M. e M. Eunice

*“Sólo vives una vez, pero si lo haces bien, una vez es suficiente.”*  
Mae West

## AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial, arcanjos, anjos e guias astrais, por iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, José Marino e Maria Eunice, pelo amor e apoio incondicional em cada etapa da minha vida.

Aos meus irmãos, Lorena e Camilo, e meus sobrinhos, Tomás e Mateo, pela força, amor e por incentivar meus sonhos.

Ao meu querido orientador, José Humberto de Queiroz, pelo apoio incondicional, carinho, compreensão, formação, ensinamentos e receptividade. Fico profundamente grata pela oportunidade, orientação e amizade eterna. Muito Obrigada Zé.

À professora Sônia Machado Rocha pela amizade, carinho, apoio e disposição em me ajudar sempre. Muito obrigada!

Ao professor Claudio Lisías Mafra pelo apoio incondicional, carinho, guia, compreensão e amizade. Agradeço por ter conhecido você e sua família.

Aos professores: Hércia Stampini, Laércio A. Benjamin, Tiago Mendes, Maria Eliza Castro, e Marcia Paranho Veloso pelo aporte fundamental neste trabalho e constante apoio.

Aos integrantes da banca pelas contribuições e seus olhares científicos.

Aos colegas dos laboratórios de Metabolismo e Fermentação, de Nutrição Experimental e de parasitologia e epidemiologia molecular, pelo apoio, carinho, receptividade e companheirismo. Especialmente à Renata, Maria Eliza e Ananda.

À minha grande amiga Renata pelo carinho, força, apoio, ajuda, por cada momento de alegria, por cada luta, pela paciência e compressão. Desejo que a nossa amizade seja eterna, pois você e sua família, são minha família no Brasil.

Aos meus grandes amigos do brasil Angélica G, Silvia, Rose, Ana, Priscila, Daniel, Jose, Pamela, e Rafa, pelas experiências vividas, apoio e carinho.

Aos meus grandes amigos Andrea, Nelson, Juan Diego, John A, Luz Stella, Luísa, Norberto, Mauricio, Álvaro, Manuela, Sandra, Dahiana, Adriana, Carolina, Eydi,

e Daniel. Especialmente agradeço ao Nelson pelo seu apoio incondicional, carinho e maravilhosa amizade. Obrigada por tudo pessoal!

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, especialmente ao Eduardo e ao Marco pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar meu doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPEMIG, ao CNPq, ao INCT-INOVAR, e à rede mineira de química (RQ-MG), pelo apoio financeiro ao projeto.

Agradeço a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xviii</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
Objetivo geral .....	5
Objetivos específicos.....	5
<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>Efeitos de extratos naturais nos fatores de transcrição da inflamação crônica e doenças cardiovasculares associados à obesidade.....</b>	<b>6</b>
1. Introdução .....	7
2. Metodologia .....	7
3. Resultados e discussão .....	8
3.1. Biomarcadores na inflamação crônica.....	8
3.2. Biomarcadores nas doenças cardiovasculares (DCV).....	9
3.1. Extratos naturais e os biomarcadores da inflamação e DCV. ....	12
Conclusão .....	15
Referências .....	15
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>27</b>
<b>Chá de folhas de manga promove efeito hepatoprotetor em ratos obesos.....</b>	<b>27</b>
1. Introdução .....	28
2. Materiais e metodologia.....	29
2.1. Preparo do chá .....	29
2.2. Ensaio biológico .....	29
2.3. Consumo de dieta, peso corporal e parâmetros séricos.....	30
2.4. Análises do estresse oxidativo .....	31
2.4.1. Quantificação da proteína total.....	31
2.4.2. Superóxido dismutase (SOD).....	31
2.4.3. Atividade da catalase (CAT) .....	31

2.4.4.	Capacidade antioxidante total (TAC).....	32
2.4.5.	Malondialdeído (MDA).....	32
2.5.	Expressão de genes no fígado.....	32
2.6.	Expressão de proteínas pelo método de ELISA.....	33
2.7.	Western blot .....	33
2.8.	Acoplamento molecular .....	34
2.9.	Histologia.....	34
2.10.	Análise estatística .....	35
3.	Resultados .....	35
3.1.	Efeitos do chá de folhas de manga no peso corporal e parâmetros séricos	35
3.2.	Efeitos do chá de folhas de manga no estresse oxidativo.....	36
3.3.	O chá de folhas de manga nos genes e na concentração de proteínas .....	37
3.4.	Interação do PPAR- $\alpha$ e a mangiferina .....	38
3.5.	Alterações na morfometria do fígado .....	40
4.	Discussão .....	40
	Referências .....	45
<b>CAPÍTULO 3.....</b>		<b>52</b>
<b>Chá de folhas de manga modula o estresse oxidativo, a inflamação e a disfunção</b>		
<b>endotelial em ratos obesos .....</b>		<b>52</b>
1.	Introdução .....	53
2.	Materiais e metodologia.....	54
2.1.	Preparo do chá e modelo animal.....	54
2.2.	Análises de estresse oxidativo.....	54
2.3.	Análise RT-PCR.....	55
2.4.	Concentração de proteínas.....	56
2.5.	Acoplamento molecular .....	56
2.6.	Análise estatística .....	56
3.	Resultados .....	57
3.1.	Marcadores do estresse oxidativo .....	57
3.2.	Marcadores associados à inflamação .....	57
3.3.	Marcadores associados à disfunção endotelial.....	58
3.4.	Acoplamento molecular .....	61
4.	Discussão .....	61
	Referências .....	65

<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>70</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

#### Chá de folhas de manga promove efeito hepatoprotetor em ratos obesos

**Figura. 1.** (A) Ingestão calórica semanal e diária, (B) peso corporal (C) eficiência alimentar  $FE = [\text{ganho de peso corporal (g)} / \text{ingestão calórica (kcal)}] * 1000$ , e (D) consumo do chá, dos animais experimentais. Concentrações séricas de (E) Triacilgliceróis, (F) alanina aminotransferase, (G) aspartato aminotransferase, e (H) Colesterol total. Os valores representam a média e SEM (n=8). Os dados foram analisados usando ANOVA seguida do post hoc Tukey. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 indicaram diferenças em relação ao grupo OB; #P < 0.05 TF versus CG. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). Não foram observadas diferenças no consumo do chá entre as oito semanas de tratamento. .... 36

**Figura. 2.** Parâmetros do estresse oxidativo no fígado dos ratos experimentais após oito semanas de tratamento. (A) superóxido dismutase, (B) catalase, (C) atividade antioxidante total, (D) malondialdeído, (E) resultados expressados como “Fold change” dos valores em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). Os dados foram analisados usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF)..... 37

**Figura. 3.** Efeitos do chá de folhas de manga na expressão dos marcadores regulatórios da inflamação e o estresse oxidativo no fígado dos ratos experimentais, após as oito semanas de tratamento. Níveis de mRNA de (A) receptor ativado por proliferador de peroxissoma alpha, (B) fator nuclear kappa B p65, (C) fator de necrose tumoral alpha, (D) receptor de adiponectina II, (E) carnitina palmitoil-transferase I, (F) proteína de união a elementos regulatórios de esteróis 1c. Os resultados foram calculados usando o método de expressão relativa (GAPDH como endógeno) e normalizados em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). Os dados foram analisados usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). .... 38

**Figura. 4.** Efeitos do chá de folhas de manga nas concentrações de proteínas nos ratos experimentais após as oito semanas de tratamento. Proteínas séricas de (A) adiponectina, (B) resistina, e (C) relação entre os valores de adiponectina y resistina. Proteína nuclear hepática de (D) PPAR- $\alpha$ , (E) NF- $\kappa$ B p65 e blots de gel representativos para os níveis de

proteína nuclear e citoplasmática do NF- $\kappa$ B p65, usando a análise de Western blot; e (F) relação entre os valores de proteína de NF- $\kappa$ B p65/PPAR- $\alpha$ . Os valores representam a média e SEM (n=8). Os dados foram analisados usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF)..... 39

**Figura. 5.** (A) Interações entre os aminoácidos do receptor de PPAR- $\alpha$  e a mangiferina; (B) representação da melhor posição do acoplamento molecular entre a mangiferina e o PPAR- $\alpha$ . ..... 40

**Figura. 6.** (A) Histologia do tecido hepático dos ratos experimentais, após oito semanas de tratamento (H, hepatócito; V, veia hepática; I, células inflamatórias infiltradas; F, gotículas de gordura); (B) grau de esteatose; (C) peso do fígado; (D) índice hepatossomático (HSI (%) = [(peso do fígado/peso corporal final do animal) x 100]), e (E) parâmetros morfométricos no fígado ( $\bar{Y}$  porcentagem pela área total de 52900  $\mu\text{m}^2$ ). Os valores são expressos como media  $\pm$  SEM (n=8). As diferenças estatisticamente significantes foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF)..... 41

### CAPÍTULO 3

#### **Chá de folhas de manga modula o estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial em ratos obesos**

**Figura - 1.** Representação gráfica do desenho experimental usado no ensaio biológico. CG: grupo alimentado com dieta AIN93-M; OB: grupo alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); TF: grupo alimentado com HFD e tratado com 50 mL do chá de folhas de manga..... 54

**Figura - 2.** Marcadores do estresse oxidativo no coração e rins após oito semanas de tratamento. (A) superóxido dismutase, (B) catalase, (C) malondialdeído, (D) óxido nítrico, e (E) resultados expressados como “X-Fold” dos valores em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). ..... 58

**Figura - 3.** Marcadores associados aos processos inflamatórios no coração após oito semanas de tratamento. (A) expressão dos genes PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, (B) concentração das proteínas PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, (C) e (D) expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-6, respectivamente. Os dados da expressão gênica são expressos como “Fold change” do nível relativo de mRNA (GAPDH como endógeno) normalizados em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). Abreviações: PPAR- $\alpha$ , receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa; TNF-  $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; NF- $\kappa$ B p65, fator nuclear kappa B; IL-6, interleucina 6.....59

**Figura - 4.** Marcadores associados aos processos inflamatórios no rim após as oito semanas de tratamento. (A) expressão dos genes PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, (B) concentração das proteínas PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, (C) e (D) expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-6 respectivamente. Os dados da expressão gênica são expressos como “Fold change” do nível relativo de mRNA (GAPDH como endógeno) normalizados em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). Abreviações: PPAR- $\alpha$ , receptor ativado por proliferador de peroxissoma alpha; TNF-  $\alpha$ , fator de necrose tumoral alpha; NF- $\kappa$ B p65, fator nuclear kappa B; IL-6, interleucina 6. ....60

**Figura - 5.** Expressão gênica de marcadores associados à disfunção endotelial (A) do coração e (B) do rim após oito semanas de tratamento. Os dados são apresentados como “Fold change” do nível relativo de mRNA (GAPDH como endógeno) normalizados em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). Abreviações: AngII, angiotensina II; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; VCAM-1, molécula de adesão celular vascular 1; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1. ....61

**Figura - 6.** (A) Interações entre os aminoácidos do receptor de Angiotensina II e a mangiferina, (B) representação da melhor posição do acoplamento molecular, (C) valores Glide Score (GScore), e número de interações por ligações de hidrogênio, por forças de Van der Waals (good vdW), por empilhamento  $\pi$ - $\pi$  ( $\pi$ - $\pi$  stacking) e por cátions  $\pi$ . O

ligante padrão foi o medicamento Olmersartan. Foi usado o software “Induced Fit Docking Program, Schrödinger Suite” para a análise..... 62

**Figura - 7.** (A) Interações entre os aminoácidos do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e a mangiferina, (B) representação da melhor posição do acoplamento molecular, (C) valores Glide Score (GScore), e número de interações por ligações de hidrogênio, por forças de Van der Waals (good vdW), por pontes salinas (salt bridge) e por cátions  $\pi$ . O ligante padrão foi o reagente Vermelho de Bromopirogalol (BPR). Foi usado o software “Induced Fit Docking Program, Schrödinger Suite” para a análise. .... 63

**Figura - 8.** Representação gráfica das interações entre moléculas sinalizadoras envolvidas na inflamação crônica e na disfunção endotelial, associadas ao consumo de dieta hiperlipídica (HFD). A HFD pode aumentar a expressão da AngII quem estimula a formação de ROS, aumentando a expressão do NF- $\kappa$ B e reduzindo a eNOS. A inativação da eNOS e ativação do NF- $\kappa$ B pode levar ao aumento na adesão molecular tanto intercelular (ICAM) como da vascular (VCAM), desenvolvendo a disfunção endotelial. A HFD também pode causar a inflamação crônica, que estimula a expressão do TNF- $\alpha$ , IL-6 e do NF- $\kappa$ B, reduzindo a atividade do PPAR- $\alpha$ . O chá de folhas de manga pode inativar a via do TNF- $\alpha$  e da AngII, o que pode aumentar a eNOS e o PPAR- $\alpha$ , modulando a inflamação e a disfunção endotelial. As setas e os traços vermelhos representam o efeito agonista e antagonista, respectivamente, do chá de folhas de manga nos marcadores..... 65

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1**

#### **Efeitos de extratos naturais nos fatores de transcrição da inflamação crônica e doenças cardiovasculares associados à obesidade**

**Tabela - 1.** Principais marcadores associados à inflamação crônica..... 10

**Tabela - 2.** Principais Biomarcadores envolvidos nas doenças cardiovasculares (DCV)  
..... 11

**Tabela - 3. Parte A:** Compostos bioativos presentes em produtos naturais e seus efeitos na inflamação crônica e doenças cardiovasculares: ensaios in vivo e in vitro (2016-2018).  
..... 13

### **CAPÍTULO 2**

#### **Chá de folhas de manga promove efeito hepatoprotetor em ratos obesos**

**Tabela- 1.** Composição das dietas e densidade calórica ..... 30

**Tabela- 2.** Oligonucleotídeos usados na análise qRT-PCR no fígado dos animais experimentais. .... 33

### **CAPÍTULO 3**

#### **Chá de folhas de manga modula o estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial em ratos obesos**

**Tabela. 1.** Oligonucleotídeos usados na análise qRT-PCR no coração e rim dos animais experimentais. .... 55

## LISTA DE ABREVIÇÕES

<b>AdipoR2</b>	Receptor de adiponectina 2
<b>ADRB</b>	$\beta$ receptor adrenérgico
<b>AGL</b>	Ácidos graxos livres
<b>AGS</b>	Ácidos graxos saturados
<b>APO</b>	Apolipoproteínas
<b>AP-1</b>	Proteína ativadora 1
<b>AQP</b>	Aquaporina
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>CAT</b>	Catalase
<b>COX</b>	Ciclo-oxigenase
<b>Cpt1</b>	Carnitina palmitoil transferase
<b>CD</b>	Cluster de diferenciação
<b>CG</b>	Grupo não obeso
<b>CRP</b>	Proteína C-reativa
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>EO</b>	Estresse oxidativo
<b>ET-1</b>	Endotelina
<b>FAS</b>	Ácido graxo sintase
<b>GAE</b>	Equivalentes de ácido gálico
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
<b>HFD</b>	Dieta hiperlipídica
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IL-1,6,10</b>	Interleucinas 1,6 e 10
<b>IRFs</b>	Fatores reguladores do interferon
<b>LDL</b>	Colesterol de baixa densidade
<b>LPL</b>	Lipase lipoprotéica
<b>MCP1</b>	Proteína quimiostática de monócitos
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MUFAs</b>	Ácidos graxos monoinsaturados
<b>NADPH</b>	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOX</b>	Complexo NADPH oxidase
<b>OB</b>	Grupo obeso

<b>PPAR</b>	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
<b>PUFAS</b>	Ácidos graxos poli-insaturados
<b>RAAS</b>	Sistema renina-angiotensina-aldoesterona
<b>RCP</b>	Receptor acoplado à proteína
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SEM</b>	Erro padrão
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SRA1</b>	Coativador do receptor de esteroides 1
<b>SREBP1c</b>	Proteína de união a elementos regulatórios de esteróis
<b>TC</b>	Colesterol total
<b>TCA</b>	Capacidade antioxidante total
<b>TF</b>	Grupo tratado com chá de folhas de manga
<b>TGs</b>	Triacilgliceróis
<b>TLR</b>	Receptores tipo Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator alfa de necrose tumoral
<b>TXB2</b>	Tromboxano B2

#### **UNIDADES**

<b>pg - <math>\mu</math>g - mg - g</b>	Picogramas – Microgramas – Miligramas – Gramas –
<b>- Kg</b>	Quilogramas
<b><math>\mu</math>m – mm – cm</b>	Micrometros – Milímetros – Centímetros
<b>mmol</b>	Milimol
<b>dL – mL</b>	Decilitro – mililitro

## RESUMO

RAMÍREZ, Natalia Medina, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2018. **Efeito do chá de folhas de manga (*Mangifera indica* L.) no estresse oxidativo, na inflamação, na esteatose hepática e na função endotelial em ratos obesos.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino, Claudio Lisias Mafra de Siqueira e Sergio Luís Pinto da Matta.

O acúmulo excessivo de gordura na obesidade pode gerar a inflamação crônica e a disfunção endotelial, sendo a inflamação crônica o maior fator envolvido em doenças crônicas com alta prevalência a nível mundial, tais como as doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e o câncer. O chá de folhas de manga contém mangiferina e compostos fenólicos com atividade antioxidante. Recentemente, foram demonstrados seus efeitos anti-obesidade e anti-inflamatório, em ratos obesos. Assim, este estudo pesquisou seus efeitos nos marcadores moleculares associados à inflamação crônica, ao estresse oxidativo, à esteatose hepática, e à disfunção endotelial, em ratos com obesidade induzida. O estudo foi conduzido em ratos Wistar adultos divididos em três grupos (n=8): um grupo não obeso alimentado com dieta de manutenção AIN93M, um grupo obeso alimentado com dieta hiperlipídica (HFD), e um grupo alimentado com HFD e tratado com o chá de folhas de manga, durante 8 semanas. A obesidade foi induzida durante 7 semanas antes do início do tratamento com o chá. Ao final, os animais foram anestesiados e eutanasiados, sendo coletados o sangue, o fígado, o rim direito e o coração. O chá de folhas de manga aumentou as enzimas antioxidantes, a capacidade antioxidante total, a expressão de mRNA e concentração de proteínas do receptor de adiponectina II (AdipoR2) e do receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- $\alpha$ ), e inibiu a expressão dos genes fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B p65) e proteína de união a elementos regulatórios de esteróis SREBP-1c, no fígado. Esta bebida também elevou a expressão do gene carnitina palmitoil transferase (Cpt1) e reduziu significativamente o acúmulo de gotículas de gordura no fígado, atenuando a esteatose hepática. Adicionalmente, aumentou as enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, e inibiu a formação dos produtos da peroxidação lipídica, regulando o malondialdeído e o óxido nítrico, no coração e rins. Também a bebida suprimiu a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), do NF- $\kappa$ B, da angiotensina 2 (AngII), e das moléculas de adesão intercelular e vascular (ICAM-1 e VCAM-1) no grupo tratado, e aumentou a óxido nítrico síntese

(eNOS). A mangiferina demonstrou ter efeito agonista do PPAR- $\alpha$  e antagonista de a AngII e o NF- $\kappa$ B. Este estudo sugeriu uma possível regulação positiva do chá de folhas de manga sobre o estresse oxidativo, a inflamação crônica, a esteatose hepática, e a disfunção endotelial, no fígado, coração e rins de ratos obesos.

## ABSTRACT

RAMÍREZ, Natalia Medina, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, December, 2018. **Effect of mango leaf tea (*Mangifera indica* L.) in the oxidative stress, inflammation, hepatic steatosis, and endothelial function on obese rats.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-advisers: Hércia Stampini Duarte Martino, Claudio Lisias Mafra de Siqueira and Sergio Luis Pinto da Matta.

Fat accumulation by obesity causes a set of metabolic disorders that lead to several diseases development. Chronic inflammation and endothelial dysfunction, are examples of mechanisms in response to the obesity. Chronic inflammation is a major factor involved in the prevalence of the chronic diseases, as cardiovascular disorders, metabolic syndrome, and cancer. Due to mango leaf tea content of mangiferin and other bioactive compounds, this research focusses in the study of its effects on molecular biomarkers related to chronic inflammation, oxidative stress, hepatic steatosis, endothelial dysfunction, in high-fat- induced obese rats. The assay was conducted using adult Wistar rat, divided into three groups (n=8): a non-obese group fed a commercial diet (AIN93-M), an obese group fed a HFD, and a treated group fed a HFD and treated with mango leaf tea, for 8 weeks. Obesity was induced during 7 weeks before to the treatment. At the end, experimental animals were anesthetized and euthanized, been collected blood, liver, heart and kidney. The mango leaf tea increased antioxidant enzymes, total antioxidant capacity, AdipoR2 and PPAR- $\alpha$  mRNA and proteins expressions and, it also inhibited the NF- $\kappa$ B p65 and SREBP1c genes expressions in the liver. This beverage also leads to Cpt1 overexpression and a significant decrease in the accumulation of fat droplets, improving the hepatic steatosis. Additionally, augmented SOD and CAT, inhibited the lipid peroxidation products, by regulating MDA and NO, in heart and kidney. The beverage also suppressed TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, AngII, VCAM-1 and ICAM-1 expression, in the treated group, and increased eNOS. Molecular docking suggested an agonist effect on PPAR- $\alpha$ , and antagonist effect on AngII and NF- $\kappa$ B, by the mangiferin. This study suggested a possible positive modulation of mango leaf tea on oxidative stress, chronic inflammation, hepatic steatosis and endothelial dysfunction in liver, heart and kidney of obese rats.

## INTRODUÇÃO GERAL

A obesidade é uma condição crônica progressiva cuja prevalência tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Até o ano de 2016, foi relatado que aproximadamente um 13% da população adulta e 6% de crianças no mundo, são obesas <sup>1</sup>. Esta doença é uma das alterações metabólicas mais prevalentes no mundo, sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento da inflamação, do estresse oxidativo, da esteatose hepática e de doenças cardiovasculares <sup>2; 3; 4</sup>. Durante a obesidade a inflamação crônica pode ocorrer devido à produção de moléculas inflamatórias (citocinas) e à ativação das células do sistema imune (neutrófilos e macrófagos), como resultado do excessivo acúmulo de células adiposas, levando à ativação de diferentes vias de sinalização celular. Foi demonstrado que as vias do fator nuclear kappa-B (NF-κB) e o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) estão envolvidas no processo da inflamação por obesidade <sup>5-8</sup>. O excesso de ácidos graxos no organismo, podendo gerar um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e as antioxidantes, pode aumentar os mediadores pro-inflamatórios, e favorecer o acúmulo de gotículas de gordura nos hepatócitos <sup>9-12</sup>. Portanto, a obesidade devida ao elevado consumo da dieta rica em gordura, está fortemente associada ao estresse oxidativo, à inflamação crônica e a esteatose hepática <sup>13</sup>. Por outro lado, a obesidade pode alterar os processos de vasodilatação e vasoconstrição, o que favorece a adesão celular, o estado inflamatório vascular, a oxidação e portanto a disfunção endotelial <sup>14; 15</sup>. Doenças cardiovasculares como a aterosclerose e a hipertensão, são os principais fatores de risco da disfunção endotelial <sup>16</sup>. Marcadores moleculares como o receptor de adiponectina 2 (AdipoR2), a carnitina palmitoil transferase (Cpt1), a proteína de união de elementos regulatórios dos esteróis (SREBP-1c), a angiotensina 2 (AngII), a óxido nítrico síntese (eNOS), e as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1), estão fortemente envolvidos nas alterações mencionadas anteriormente <sup>14-18</sup>.

Devido aos graves efeitos da obesidade no metabolismo humano, atualmente são desenvolvidos vários tratamentos usando produtos naturais e fitoterápicos. Chás e extratos contendo diversos compostos bioativos tem sido amplamente estudados e usados. Os chás são naturais, econômicos e contém uma variedade de compostos bioativos com propriedades funcionais, representando uma grande alternativa para o tratamento e redução do risco da obesidade e suas alterações <sup>19-21</sup>.

A manga (*Mangifera indica*) é uma fruta tropical rica em compostos bioativos com potencial terapêutico. As folhas da manga são pouco usadas e são culturalmente consideradas um tipo de resíduo. No entanto, são uma importante fonte de mangiferina, fenólicos, flavonoides, benzofenonas e antioxidantes com atividade de retirada de radicais livres. Estes compostos bioativos tem sido relacionados às atividades biológicas, incluindo as anti-inflamatória, antioxidante, antidiabética, e outras <sup>22-25</sup>.

Assim, nosso grupo de pesquisa desenvolveu e estudou um chá preparado com folhas (processadas) da mangueira da variedade Ubá. Previamente publicamos que o chá de folhas de manga contém  $0.72 \pm 0.08 \text{ mg.ml}^{-1}$  de mangiferina,  $1.59 \pm 0.11 \text{ mg GAE. mL}^{-1}$

de fenólicos totais e  $80.33 \pm 0.18$  % de atividade de retirada de radical <sup>22</sup>. Também demonstramos que esta bebida reduz o acúmulo de gordura abdominal, regula o metabolismo da glicose, estimula marcadores anti-inflamatórios e melhora a hipertrofia dos adipócitos, confirmando seu efeitos anti-obesidade <sup>26</sup>. Em contraste, até a data não foram relatados efeitos do tratamento com o chá de folhas de manga no fígado, no coração e nos rins, de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Adicionalmente, estudos do acoplamento molecular entre a mangiferina e PPAR-  $\alpha$ , a AngII e NF- $\kappa$ B, também não foram descritos até a data.

## Referências

- <sup>1</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**: WHO 2018.
- <sup>2</sup> EMANUELA, F. et al. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, 2012. ISSN 2090-0724.
- <sup>3</sup> GRAUPERA, M.; CLARET, M. Endothelial Cells: New Players in Obesity and Related Metabolic Disorders. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 781-794, 2018/11/01/ 2018. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276018301644> >.
- <sup>4</sup> AVOGARO, A.; DE KREUTZENBERG, S. V. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 360, n. 1, p. 9-26, 2005/10/01/ 2005. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898105002822> >.
- <sup>5</sup> LEE, J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes. **Archives of pharmaceutical research**, v. 36, n. 2, p. 208-222, 2013. ISSN 0253-6269.
- <sup>6</sup> ASGHAR, A.; SHEIKH, N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. **Cellular Immunology**, 2017. ISSN 0008-8749.
- <sup>7</sup> TAILLEUX, A.; WOUTERS, K.; STAELS, B. Roles of PPARs in NAFLD: Potential therapeutic targets. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 809-818, 5// 2012. ISSN 1388-1981. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198111002204> >.

- 8 PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 720-733, 3// 2015. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016882781400806X> >.
- 9 VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007. ISSN 1463-1326.
- 10 FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.
- 11 RONKSLEY, P. E. et al. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Bmj**, v. 342, p. d671, Feb 22 2011. ISSN 0959-535x.
- 12 WALTENBERGER, B. et al. Natural Products to Counteract the Epidemic of Cardiovascular and Metabolic Disorders. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 807, 2016. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/6/807> >.
- 13 KOO, S.-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clinical and molecular hepatology**, v. 19, n. 3, p. 210-215, 2013. ISSN 2287-2728, 2287-285X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3796672/> >.
- 14 ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 8, p. 1983-1992, 2004. ISSN 1046-6673.
- 15 STEYERS, C. M.; MILLER, F. J. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 11324-11349, 2014.
- 16 MESTAS, J.; LEY, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 18, n. 6, p. 228-232, 2008. ISSN 1050-1738.
- 17 COLLINS, T. et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 10, p. 899-909, 1995. ISSN 0892-6638.

- 18 DEEPA, S. S.; DONG, L. Q. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 1, p. E22-E36, 2009. ISSN 0193-1849.
- 19 JOBU, K. et al. Effects of Goishi tea on diet-induced obesity in mice. **Food Research International, Elsevier**, v. 54, p. 324-329, 2013.
- 20 MOREIRA, M. E. D. C. et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 143-153, 2// 2017. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616303395> >.
- 21 CHAKRABARTI, R. Pharmacotherapy of obesity: Emerging drugs and targets. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, p. 195-207, 2009.
- 22 MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Extraction of Mangiferin and Chemical Characterization and Sensorial Analysis of Teas from *Mangifera indica* L. Leaves of the Ubá Variety. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 33, 2016. ISSN 2306-5710. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2306-5710/2/4/33> >.
- 23 RIBEIRO, S. M. R.; SCHIEBER, A. Chapter 34 - Bioactive Compounds in Mango (*Mangifera indica* L.). In: PREEDY, R. R. W. R. (Ed.). **Bioactive Foods in Promoting Health**. San Diego: Academic Press, 2010. p.507-523. ISBN 978-0-12-374628-3.
- 24 RIBEIRO, S. M. R. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 620-626, 10/1/ 2008. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608002367> >.
- 25 CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615, 2012. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/7/8615> >.
- 26 MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Anti-obesity effects of tea from *Mangifera indica* L. leaves of the Ubá variety in high-fat diet-induced obese rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, n. Supplement C, p. 938-945, 2017/07/01/ 2017. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217312179> >.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

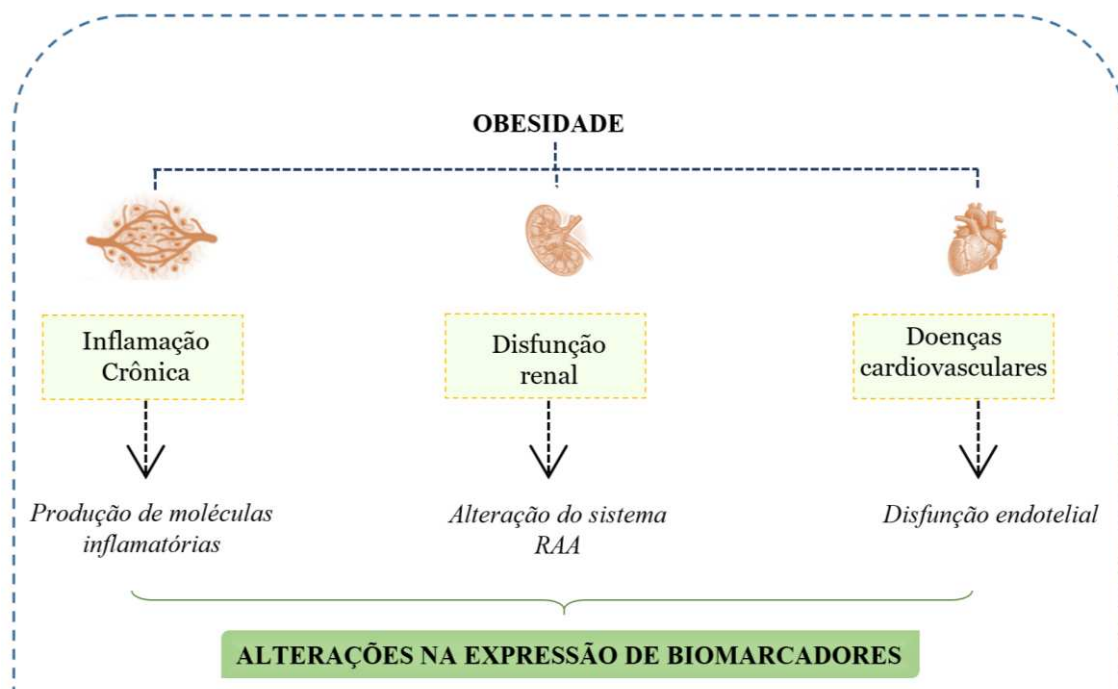
Avaliar o efeito do chá de folhas de manga (*Mangifera indica*) da variedade Ubá, no estresse oxidativo, na esteatose hepática, na inflamação e na disfunção endotelial em ratos obesos.

### Objetivos específicos

- φ Induzir a obesidade por alimentação com dieta hiperlipídica (HFD) em ratos Wistar adultos;
- φ Avaliar o efeito da ingestão do chá de folhas da *Mangifera indica* nos seguintes parâmetros:
  - No estresse oxidativo medindo a superóxido dismutase, catalase, o malondialdeído e o óxido nítrico;
  - Na expressão de mRNA dos genes: PPAR- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, TNF-  $\alpha$ , AdipoR2, Cpt1, SREBP-1c, AngII, eNOS, VCAM-1 e ICAM-1;
  - Na concentração das proteínas PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B;
  - Nos parâmetros histomorfométricos no fígado;
- φ Estudar a interação entre a mangiferina e as proteínas PPAR- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e AngII.

## CAPÍTULO 1 – REVISÃO

### Efeitos de extratos naturais nos fatores de transcrição da inflamação crônica e doenças cardiovasculares associados à obesidade



#### Resumo

A inflamação crônica é o maior fator envolvido em doenças crônicas com alta prevalência a nível mundial, tais como as doenças cardiovasculares, a síndrome metabólica e o câncer. Para desenvolver novos produtos terapêuticos com o objetivo de reduzir o risco destas doenças, é importante compreender o mecanismo molecular dos principais marcadores envolvidos nas mesmas. Esta revisão resume os principais fatores de transcrição da inflamação crônica e doenças cardiovasculares, associados à obesidade, e apresenta alguns produtos naturais recentemente desenvolvidos, usados para modular estas doenças.

**Palavras-chave:** compostos bioativos; marcadores moleculares; terapêuticos naturais.

## 1. Introdução

Mecanismos inflamatórios podem ocorrer após de pequenos ferimentos ou infecções leves (inflamação aguda) ou quando são elevados os níveis de marcadores inflamatórios nas condições de “desgaste” (inflamação crônica). A inflamação aguda não afeta seriamente o organismo, pois é uma tentativa do mesmo de se proteger após ser lesionado. No contrário, a inflamação crônica é persistente sendo responsável pelo desenvolvimento de várias doenças como a obesidade, alterações cardiovasculares (aterosclerose e hipertensão principalmente), diabetes, neuropatia, doença cerebrovascular (Alzheimer), doença inflamatória intestinal, estresse oxidativo, doença pulmonar e nos rins, e até o câncer<sup>1-9</sup>. Na inflamação crônica ocorrem interações entre citocinas inflamatórias, interleucinas e receptores, para iniciar uma sinalização em cascata e assim estimular o processo de transcrição de biomarcadores moleculares associados a diversas alterações metabólicas, como as doenças cardiovasculares (DCV)<sup>10;11</sup>. As DCV são definidas como um conjunto de desordens no coração e vasos sanguíneos, caracterizadas pela sua prevalência e mortalidade. As DCV causam aproximadamente 17,5 milhões de mortes a cada ano e estas desordens, podem resultar da obesidade, de dieta inadequadas (hiperlipídicas e hipercalóricas), sedentarismo, fatores genéticos, e consumo elevado de álcool<sup>12-15</sup>. DCV incluem as doenças coronária, cerebrovascular, da artéria periférica, hipertensão, reumatismo no coração e insuficiência cardíaca. Estas doenças são caracterizadas pela alteração no fluxo sanguíneo ou pela formação de placa nas artérias.

Devido ao impacto destas doenças crônicas na saúde, é necessário desenvolver novas terapias para sua prevenção e redução do risco. Vários produtos naturais são ricos em compostos bioativos com potenciais propriedades funcionais, representando uma grande alternativa como terapêuticos. Atualmente, estão sendo estudadas plantas medicinais e alimentos funcionais que modulam os efeitos da inflamação crônica e das DCV<sup>16-20</sup>.

Assim, esta revisão resume os principais fatores de transcrição associados aos processos inflamatórios e doenças cardiovasculares. Também apresenta novos produtos (período 2016-2018) naturais usados para modular estas doenças.

## 2. Metodologia

Foi realizada uma pesquisa sistemática dos artigos associados ao tema nas bases de dados da Elsevier via Science Direct e o Medline via PubMed principalmente. As palavras-chave da busca foram “marcadores inflamatórios”, “novos produtos naturais”, “doenças cardiovasculares”, “alterações da obesidade”, “fatores de transcrição nas doenças cardiovasculares”, e “extratos naturais”. A pesquisa foi limitada aos artigos em inglês unicamente e as palavras da busca foram na mesma língua. Foram incluídos os artigos apresentados nas revistas com diversos fatores de impacto, preferencialmente acima de 1. Os produtos naturais apresentados foram selecionados segundo artigos publicados no período compreendido entre o janeiro de 2016 e o setembro de 2018, ao tipo de ensaio in vitro ou in vivo (priorizando os estudos in vivo), e conforme os fatores

de transcrição modulados (unicamente os associados à inflamação e doenças cardiovasculares).

### 3. Resultados e discussão

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no corpo. Esta condição é causada principalmente pelo desequilíbrio energético, entre as calorias consumidas e as gastas, o qual pode ser gerado pela alimentação inadequada ou sedentarismo, principalmente. Estima-se que entre os anos de 1975 a 2016, o número de pessoas obesas no mundo triplicou <sup>21</sup>. Tal fato é importante considerando que esta doença pode levar ao desenvolvimento de diabetes, doenças cardiovasculares, processos inflamatórios crônicos, esteatose, estresse oxidativo, e outros fatores de risco importantes <sup>22; 23; 24</sup>. Durante a obesidade pode ser estimulada a expressão de fatores de transcrição tanto pro-inflamatórios como os envolvidos na lipogênese. Genes como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o fator nuclear kappa b (NF- $\kappa$ B), e a proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP- c), desempenham um papel importante nos fatores de risco da obesidade <sup>25; 26; 27</sup>.

Os fatores de transcrição são uma grande família de proteínas envolvidas em numerosos processos metabólicos que resultam do controle da informação genética. Principalmente são estudados para entender os mecanismos moleculares dos processos biológicos. As vias de sinalização celular são a forma de comunicação entre as células com atividades específicas. Estes fatores de transcrição são utilizados como ferramentas nessas vias de sinalização para o organismo realizar suas funções <sup>28; 29; 30</sup>. Com isto, os fatores de transcrição representam uma grande alternativa para serem usados como ferramentas para o tratamento e redução do risco de várias doenças.

Para melhor compreender, os resultados foram resumidos apresentando os principais biomarcadores envolvidos na inflamação crônica e nas doenças cardiovasculares.

#### 3.1. Biomarcadores na inflamação crônica

A inflamação crônica é um fator crítico da propagação e desenvolvimento da obesidade e de alterações metabólicas como a resistência à insulina, diabetes e dislipidemias <sup>31; 32</sup>. Neste processo biológico interferem diversos sinalizadores celulares, os quais podem ser usados como marcadores moleculares para sua modulação e regulação. Na Tabela 1 são descritos os biomarcadores expressados com maior frequência no processo de inflamação crônica. Os fatores de transcrição da via do NF- $\kappa$ B são os principais sinalizadores ativados em resposta dos processos inflamatórios crônicos. A via do NF- $\kappa$ B pode estimular a expressão em cascata de citocinas (como o TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1, 6, 8, 12), e proteínas com efeitos pro-inflamatórios. Em função do fator de transcrição NF- $\kappa$ B ser altamente sensível à inflamação, pode estar relacionado às alterações crônicas como a adesão e diferenciação celular e apoptoses, que podem levar à ativação dos receptores de necroses tumoral ou tipo “Toll” <sup>27; 33</sup>. A interleucina 6 (IL-6)

é uma citosina pro-inflamatória fortemente relacionada à inflamação crônica. Foi reportado que a inibição da IL-6 e o TNF $\alpha$  podem inibir a via do NF- $\kappa$ B, bloqueando a atividade inflamatória e outras alterações relacionadas. A inibição de IL-6 também pode inibir as células de diferenciação T reguladoras<sup>11; 34</sup>. Hormônios proteicos como a adiponectina, a resistina e a leptina, relacionam fortemente a inflamação e a obesidade. A adiponectina têm função anti-inflamatória, enquanto a resistina atua como um pro-inflamatório<sup>35; 36; 37</sup>. Assim, observa-se que na inflamação crônica associada à obesidade os biomarcadores pro-inflamatórios como o NF- $\kappa$ B e o TNF $\alpha$  podem ser regulados favorecendo a modulação desta doença.

### 3.2. Biomarcadores nas doenças cardiovasculares (DCV)

A obesidade influencia negativamente os fatores associados às doenças cardiovasculares. Esta doença pode aumentar a reabsorção de sódio nos rins (alterando a natriurese pressórica) desenvolvendo a hipertensão. Também pode favorecer a hipertrofia ventricular, aumentar a adiposidade cardíaca, aumentar a calcificação nas artérias, favorecer a formação de placa aterosclerótica, levar à insuficiência renal, entre outras<sup>13; 38; 39</sup>. Existem inúmeros biomarcadores envolvidos nas DCV, dois quais a maioria estão sendo ainda estudados. Na Tabela 2 são apresentados os principais biomarcadores que tem sido associados às DCV. Um importante sistema associado diretamente nas DCV, é o sistema renina-angiotensina-aldoesterona (RAAS). Quando este sistema é ativado, altera-se a pressão sanguínea aumentando o risco de vasoconstrição, fibroses, insuficiência renal e disfunção cardíaca<sup>40</sup>. No RAAS se dá a síntese da angiotensina II (Ang II), a qual leva à ativação do NF- $\kappa$ B, incrementando a expressão da IL-6 e VCAM-1. A Ang II pode aumentar a pressão sanguínea, os leucócitos e fibroblastos cardíacos<sup>41; 42; 43</sup>. A via da IL-6 também inclui a cardiotropina-1, marcador envolvido na insuficiência cardíaca, hipertensão, hipertrofia de cardiomiócitos e produção de fibroblastos<sup>34; 44</sup>. Outras moléculas como as alipoproteínas, o cluster de diferenciação (CD36) e a ciclo-oxigenase, também tem um papel importante no desenvolvimento das DCV. As lipoproteínas se ligam aos lipídios permitindo seu transporte no sangue e são fundamentais no metabolismo dos ácidos graxos<sup>45; 46</sup>. Os receptores CD36 tem função reguladora, podendo ligar ao colágeno, aos ácidos graxos de cadeia longa, e outros, para serem metabolizados<sup>47</sup>.

**Tabela - 1.** Principais marcadores associados à inflamação crônica.

Biomarcador	Descrição	Local de expressão	Referência
NF-κB	Fator de transcrição nos linfócitos e mediador central das respostas inflamatórias da função imune. ↑ TNF- α, IL-1 e IL-6	Fígado, cérebro, rins, pulmões, soro e plasma sanguíneos	25; 27; 48
TNF-α	Citosina pro-inflamatória relacionada principalmente à apoptoses. ↑ IL-1, IL-6 e ICAM-1	Fígado, soro e plasma sanguíneos e tecido adiposo	49; 50; 51
IL-1, IL-6, IL-12, IL-18	Interleucinas pro-inflamatórias ativadas em resposta do sistema imune. ↑ TLRs e NF-κB.	Fígado e plasma	52
IL-10, IL-13	Interleucinas anti-inflamatórias que atuam como reguladoras das moléculas pro-inflamatórias. ↓ TNF- α e IL-6	Fígado e plasma	52
(TLR)2	Receptores pro-inflamatórios capazes de identificar patógenos e ativar a resposta imune contra eles. ↑ NF-κB, TNF-α e IL-1β	Fígado, intestino e rins	53; 54
CRP	Proteína plasmática e marcador da inflamação regulado por citocinas pro-inflamatórias.	Fígado e plasma	55; 56
Adiponectina	Hormônio proteico anti-inflamatório associado ao catabolismo de ácidos graxos. ↓ células adiposas, NF-κB, TNF-α, e IL-6. ↑IL-10, PPAR-γ	Tecido adiposo, plasma e soro	35; 52; 57; 58; 59
Resistina	Proteína hormonal pro-inflamatória expressada principalmente pelo tecido adiposo e responsável pelo acúmulo de adipócitos.	Tecido adiposo e plasma	36
Leptina	Hormônio proteico anti-inflamatório produzida pelos adipócitos e relacionada com a regulação da ingestão dos alimentos.	Principalmente no tecido adiposo, plasma e fígado.	37; 60
PPARs	Hormônio nuclear que atua como receptor regulador da homeostase energética. Pode inibir a expressão de citocinas inflamatórias. Posse atividade anti-inflamatória. ↓NF-κB	<b>PPAR-α:</b> fígado, cérebro, pulmões, rins, coração, soro e plasma <b>PPAR-γ:</b> tecido adiposo. <b>PPAR-β/δ:</b> cérebro, pulmões, pele, musculo esquelético, adipócitos e macrófagos	61; 62
ICAM	Proteína pro-inflamatória expressada pelos macrófagos, células endoteliais, plaquetas, leucócitos e linfócitos.	Principalmente no cérebro. Rins e vasos sanguíneos.	63; 64
VCAM	Proteína pro-inflamatória mediador da adesão celular. Está associada ao desenvolvimento da aterosclerose.	Vasos sanguíneos e musculo cardíaco	63; 64; 65

NF-κB, fator nuclear kappa-B; TNF-α, fator de necrose tumoral alpha; IL: interleucina; TLR2, receptores tipo Toll 2; CRP: Proteína C-reativa; PPARs, receptores ativados por proliferadores de peroxissoma; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; VCAM-1, molécula de adesão celular vascular 1.

**Tabela - 2.** Principais Biomarcadores envolvidos nas doenças cardiovasculares (DCV)

Biomarcador	Descrição	Local de expressão	Referência
Fibrinogênio	Proteína plasmática precursora da fibrina e principal causa da aterosclerose e trombozes.	Fígado e plasma	66
IL6R	Biomarcador inflamatório capaz de estimular à cardiotropina e outros sinalizadores associados às DCV.	Fígado, soro, coração e rins.	67
Ang II	Peptídeo negativamente envolvido na regulação do fluxo sanguíneo, podendo causar a hipertensão. Este é secretado pelo fígado.	Principalmente no fígado	68
Renina	Enzima secretada pelo rim para regular o fluxo sanguíneo (entrada e saída) nos glomérulos. Está associada com a hipertensão.	Principalmente no rim	40
Aldosterona	Hormônio secretado pelo rim (zona do glomérulo) para a regulação dos fluidos e dos eletrólitos. Está envolvido na hipertensão, insuficiência cardíaca e fibrose cardíaca.	Principalmente no rim	69
ADRB	Receptores associados às proteínas G e com a ativação da adenilato ciclase. Estão envolvidos na hipertensão e insuficiência cardíaca.	Coração, tecido adiposo, fluxo sanguíneo e outros.	70
iNOs	Enzimas que sintetizam óxido nítrico (NO) do aminoácido arginina-1. Em geral, está envolvida na regulação do fluxo sanguíneo, processos inflamatórios e no estresse oxidativo.	Fígado, cérebro, rins, coração, soro, plasma, outros.	71
Troponina	Proteína envolvida na contração cardíaca e do músculo esquelético.	Músculo cardíaco.	72
CD36	Receptor que atua como mediador de vários processos biológicos, principalmente no metabolismo dos ácidos graxos. Está fortemente envolvido na hipertensão, aterosclerose e no estresse oxidativo vascular.	Coração, cérebro, soro e plasma, rins.	47
IRFs	Proteínas reguladoras dos interferons e das resposta imunes. Estão envolvidas na progressão da aterosclerose e nas DCV.	Fígado, coração, outros.	73; 74; 75; 76
APOs	Proteína sintetizada em vários tecidos, com a função principal de ligar lipídios. Está associada no metabolismo do colesterol HDL (ApoA) e LDL (ApoB e). Está envolvida na aterosclerose e hipertensão.	Plasma e fígado principalmente.	45; 77
ABCA1	Proteína envolvida na biogênese do HDL favorecendo a circulação do colesterol livre.	Plasma, fígado e coração.	78

IL6R, receptor da interleucina 6; Ang II, angiotensina 2; ADRB,  $\beta$  receptor adrenérgico; iNOs, óxido nítrico sintase induzível; CD36, cluster 36 de diferenciação; IRFs, fatores reguladores do interferon; APOs, apolipoproteínas; ABCA1, TP- transportador de cassetes de ligação A1.

### 3.1. Extratos naturais e os biomarcadores da inflamação e DCV.

Diversos produtos naturais são fontes importantes de compostos bioativos com atividade funcional, representando uma grande estratégia para o desenvolvimento de medicamentos para combater e/ou prevenir doenças crônicas não transmissíveis como a obesidade e suas alterações.

Atualmente, há um incremento das pesquisas focadas em desenvolver produtos usando plantas e alimentos. Vários autores no mundo, relatam que a viabilidade de usar ervas, plantas medicinais e alimentos funcionais é grande, considerando as suas propriedades funcionais, acessibilidade e custo<sup>16; 79; 80</sup>. Os extratos aquosos representam uma alternativa como agentes terapêuticos, por apresentarem melhores propriedades organolépticas e permitirem a conservação de seus princípios ativos de uma forma mais simplificada, que os produtos sintéticos<sup>25; 81</sup>. Atualmente muitos extratos aquosos são utilizados de forma empírica em várias culturas a nível mundial, para o tratamento e redução dos fatores de risco da obesidade. Alguns exemplos são os extratos de *Andropogon squarrosus* (Japão)<sup>82</sup>, *Ocimum sanctum* e *Crataegus pubescens* (México), *Mangifera indica* (Brasil)<sup>83; 84</sup>, entre outros. Com isto, neste estudo foram selecionados alguns artigos que apresentam os resultados de pesquisas avaliando os efeitos de extratos aquosos ou alimentos com potencial funcional sobre os processos inflamatórios e as DCV.

Fenólicos totais, antioxidantes, chás, taninos, azeite de oliva, suco de laranja, e extratos de ervas, são alguns produtos mencionados na Tabela 3<sup>16; 20; 85; 86</sup>. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que flavonoides obtidos a partir de plantas como a *Garcinia brasiliensis* e frutas como a laranja, exercem atividade anti-inflamatória<sup>87; 88</sup>. Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs) também desempenham um importante papel como agentes anti-inflamatórios e cardioprotetores. Estes ácidos podem diminuir o colesterol total e o LDL, os triacilgliceróis (TGs), e melhorar a expressão de mRNA de genes pro-inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , as IL-1 $\beta$  e 6, MCP1, MPO, CD36 e o SRA1<sup>89; 90; 91</sup>. Antioxidantes presentes em algumas frutas, também reportaram atividade antioxidante<sup>92; 93</sup>. Estes extratos são só alguns exemplos da grande variedade de produtos naturais com potencial terapêutico, especialmente na modulação dos marcadores moleculares, que tem sido estudados nos últimos anos. A perspectiva clínica em relação ao uso de fitoterapêuticos visa aceitá-los como ferramentas mais saudáveis para a redução do risco e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, mediante a regulação dos fatores de transcrição. Portanto, sugere-se abordar uma pesquisa sistemática mas detalhada no futuro, como estratégia para destacar a importância de desenvolver produtos naturais ricos em compostos bioativos, cuja interação com os marcadores moleculares possa modular positivamente doenças como a obesidade e suas comorbidades.

**Tabela - 3. Parte A:** Compostos bioativos presentes em produtos naturais e seus efeitos na inflamação crônica e doenças cardiovasculares: ensaios in vivo e in vitro (2016-2018).

Compostos bioativos	Fonte	Doses	Atividade	Potencial uso terapêutico	Referência
MUFA PUFA	Aceite de sésamo Extrato aquoso	340 mg kg <sup>-1</sup>	In vitro e in vivo: ↓ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP1, MPO, CD36, SRA ↑ IL-4, IL-10, APOA1, PON1	Anti-inflamatório Anti-aterosclerose	89
Mangiferina Fenólicos	Mangifera indica Extrato aquoso	24 ml extrato / dia	In vivo: ↓ TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B-p65	Anti-inflamatório Hepatoprotetor Anti-obesidade	83; 84
Oleuropeína	Extrato de folhas de oliva	30 mg.kg <sup>-1</sup>	In vivo: ↓ NOX1, NOX2, atividade da MAPK, TLR-4	Anti-hipertensivo	94
Flavonóides	Crataegus pinnatifida Extrato de folha Bunge	5 mg kg <sup>-1</sup> 20 mg kg <sup>-1</sup>	In vitro e in vivo: ↑ RCP, LDLR ↓ ABCA	Anti-aterosclerose	95
Antocianinas	Extratos de Mirtilo	0.5 g kg <sup>-1</sup> 1.0 g kg <sup>-1</sup> 2.0 g kg <sup>-1</sup>	In vivo: ↓ Ang II, CRP, IL-6. ↑ ET-1, IL-10	Anti-inflamatório Anti-apoptose Cardioprotetor	96
Ligninas Sesquiterpenos	Syringa pinnatifolia Hemsl	20 mg kg <sup>-1</sup> 40 mg kg <sup>-1</sup> 80 mg kg <sup>-1</sup>	In vivo: ↓ COX1-2, 6-keto-PGF1 $\alpha$ , TXB2	Anti isquemia miocárdica	97
Polifenóis $\gamma$ -orizanois	Extrato aquoso de farelo de arroz	205 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	In vivo: ↓ CD36, NF- $\kappa$ B ↑ eNOS	Vasoprotetor	98

TNF- $\alpha$ , fator alpha de necrose tumoral; ILs, interleucinas; MCP1, proteína quimiostática de monocitos 1; MPO, mieloperoxidase; CD36, cluster 36 de diferenciação; SRA1, coativador do receptor de esteroides 1; APOA1, apolipoproteína A1; PON1, paraoxonase/aril-esterase 1; NF- $\kappa$ B, fator nuclear kappa-B; NOX, complexo NADPH oxidase; MAPK, proteíno-quinases ativadas por mitógenos; TLRs, receptores tipo “Toll”; COX, ciclo-oxigenase; RCP, receptor acoplado à proteína; LDLr, receptor de lipoproteína de baixa densidade; ABCA, transportadores de cassetes de ligação de ATP; AngII, angiotensina II; CRP, proteína c-reativa; ET-1, endotelina 1; 6-keto-PGF1 $\alpha$ , 6-ceto-prostaglandina F1 alfa; TXB2, tromboxano B2; eNOS, óxido nítrico sintase.

**Tabela – 3. Parte B:** Compostos bioativos presentes em produtos naturais e seus efeitos na inflamação crônica e doenças cardiovasculares: ensaios in vivo e in vitro (2016-2018).

Compostos bioativos	Fonte	Doses	Atividade	Potencial uso terapêutico	Referência
Polifenóis	Euterpe oleracea Martius	2.5 GAE mL <sup>-1</sup> 5 GAE mL <sup>-1</sup> 10 µg GAE mL <sup>-1</sup>	In vitro: ↓ aP2, LPL, FATP1, FAS, leptina, C/ebpα, C/ebpβ, Klf5, SREBP1c, ROS, TNF-α ↑ Adiponectina	Anti-inflamatório	99
Polifenóis Catequinas Ácido Ursólico	Pyracantha fortuneana fruit	120 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 400 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	In vitro e in vivo: ↓ LDLr, APOA1	Anti-inflamatório Anti- cholesterolemico	100
Benzophenones Flavonoides Proantocianinas	Garcinia brasiliensis	300 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	In vivo: ↑ PPAR-γ, IL-10 ↓ TNF-α	Anti-inflamatório Anti-obesidade	88
Flavonóides	Extrato de suco de laranja	40 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 100 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	In vivo: ↓ TNF-α, IL-1β, NF-κB, ICAM-1, iNOs ↑ MnSOD	Anti-inflamatório	87
n-3 PUFAs	-	3 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 10 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> 30 mg kg <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>	In vivo: ↓ TNF-α, IL-1β, IL-6	Anti-inflamatório Cardioprotetor	90
Antioxidantes	Lonicera caerulea	-	In vivo: ↓ NF-κB, TNF-α ↑IL-10	Antioxidante Anti-inflamatório Anti-apoptotico	93

aP2, proteína 2 ligante de ácido graxo do adipócito; LPL, lipase lipoprotéica; FATP1, proteínas transportadoras de ácidos graxos; FAS, ácido graxo sintase; C/ebpα e C/ebpβ, C/ebp, CCAAT/ proteínas estimuladoras de ligação a ...; Klf5, fator 5 do tipo Kruppel; SREBP1c, proteína de ligação ao elemento regulador do estero1 1c; ROS, espécies reativas de oxigênio; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; IL, interleucinas; PPAR-γ, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma; NF-κB, fator nuclear kappa-B; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; iNOs, óxido nítrico sintase induzível; MnSOD, superóxido dismutase dependente do manganês.

## Conclusão

Esta revisão apresentou um breve resumo dos fatores de transcrição associados aos processos inflamatórios e as doenças cardiovasculares, associados à obesidade. Também cita extratos naturais avaliados recentemente como terapêuticos dessas doenças. Em conclusão, os extratos naturais representam uma grande alternativa para serem utilizados como terapêuticos na modulação de biomarcadores de doenças, tais como a obesidade, inflamação crônica e as cardiovasculares.

## Referências

- <sup>1</sup> REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010. ISSN 0891-5849.
- <sup>2</sup> LIBBY, P. et al. Inflammation in Atherosclerosis: Transition From Theory to Practice. **Circulation Journal**, v. 74, n. 2, p. 213-220, 2010.
- <sup>3</sup> ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 2, p. 141-150, 8// 2014. ISSN 0168-8227. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822714001879> >.
- <sup>4</sup> TAUBE, A. et al. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 11, p. H2148-H2165, 2012.
- <sup>5</sup> EMANUELA, F. et al. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, 2012. ISSN 2090-0724.
- <sup>6</sup> HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 86, 2013. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-12-86> >.
- <sup>7</sup> RUBIN, D.; SHAKER, A.; LEVIN, M. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 107, 2012-May-08 2012. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00107> >.
- <sup>8</sup> HENEKA, M. T. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 388-405, 4// 2015. ISSN 1474-4422. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442215700165> >.

- <sup>9</sup> HOLMES, C. Review: Systemic inflammation and Alzheimer's disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 51-68, 2013. ISSN 1365-2990. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01307.x> >.
- <sup>10</sup> FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front Biosci**, v. 2, n. 1, p. d12-d26, 1997.
- <sup>11</sup> NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 2, p. 83-89, 4// 2011. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610111000050> >.
- <sup>12</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular disease (CVD): WHO 2017**.
- <sup>13</sup> PARTO, P.; LAVIE, C. J. Obesity and Cardiovascular Diseases. **Current Problems in Cardiology**, 2017. ISSN 0146-2806. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146280617300713> >.
- <sup>14</sup> NANGIA, R.; SINGH, H.; KAUR, K. Prevalence of cardiovascular disease (CVD) risk factors. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 72, n. 4, p. 315-319, 10// 2016. ISSN 0377-1237. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037712371400135X> >.
- <sup>15</sup> RONKSLEY, P. E. et al. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Bmj**, v. 342, p. d671, Feb 22 2011. ISSN 0959-535x.
- <sup>16</sup> WALTENBERGER, B. et al. Natural Products to Counteract the Epidemic of Cardiovascular and Metabolic Disorders. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 807, 2016. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/6/807> >.
- <sup>17</sup> SHAYGANNI, E. et al. Inflammaging and cardiovascular disease: Management by medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 23, n. 11, p. 1119-1126, 10/15/ 2016. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711315003566> >.
- <sup>18</sup> ROUHI-BOROJENI, H. et al. Medicinal plants with multiple effects on cardiovascular diseases: A systematic review. **Curr Pharm Des**, Oct 21 2016. ISSN 1381-6128.

- 19 BAHARVAND-AHMADI, B. et al. Overview of medicinal plants used for cardiovascular system disorders and diseases in ethnobotany of different areas in Iran. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 5, n. 1, 2016.
- 20 BASU, A. et al. Cardiovascular Disease Biomarkers in Clinical Use and Their Modulation by Functional Foods. In: PATEL, V. B. e PREEDY, V. R. (Ed.). **Biomarkers in Cardiovascular Disease**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. p.39-62. ISBN 978-94-007-7678-4.
- 21 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: WHO 2018**.
- 22 REMELY, M. et al. Obesity: epigenetic regulation - recent observations. **Biomol Concepts**, v. 6, n. 3, p. 163-75, Jun 2015. ISSN 1868-5021.
- 23 ZHOU, X. et al. A Model of Metabolic Syndrome and Related Diseases with Intestinal Endotoxemia in Rats Fed a High Fat and High Sucrose Diet. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115148, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115148> >.
- 24 CABALLERO, B. The global epidemic of obesity: an overview. **Epidemiol Rev**, v. 29, p. 1-5, 2007. ISSN 0193-936X (Print)-0193-936x.
- 25 PUGAZHENTHI, S. et al. Induction of an Inflammatory Loop by Interleukin-1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Involves NF- $\kappa$ B and STAT-1 in Differentiated Human Neuroprogenitor Cells. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69585, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069585> >.
- 26 EBERLÉ, D. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839-848, 2004/11/01/ 2004. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908404001658> >.
- 27 MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFkappaB system. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 8, n. 3, p. 227-41, May 2016. ISSN 1939-005x.
- 28 KIM, E. K.; CHOI, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 4, p. 396-405, 4// 2010. ISSN 0925-4439. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443910000153> >.

- 29 ZACKSENHAUS, E. et al. Chapter Seven - Transcription Factors in Breast Cancer—Lessons From Recent Genomic Analyses and Therapeutic Implications. In: ROSSEN, D. (Ed.). **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**: Academic Press, v. Volume 107, 2017. p.223-273. ISBN 1876-1623.
- 30 SOLLOME, J. et al. Environmental contaminants and microRNA regulation: Transcription factors as regulators of toxicant-altered microRNA expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 312, p. 61-66, 12/1/ 2016. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X16301430> >.
- 31 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.
- 32 FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.
- 33 GUPTA, S. C. et al. Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 10–12, p. 775-787, 10// 2010. ISSN 1874-9399. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939910000659> >. Acesso em: 2010/12//.
- 34 MIHARA, M. et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, v. 122, n. 4, p. 143-159, 2012.
- 35 NAGARAJU, G. P. et al. The role of adiponectin in obesity-associated female-specific carcinogenesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 31, p. 37-48, 10// 2016. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610116300053> >.
- 36 MCTERNAN, P. G.; KUSMINSKI, C. M.; KUMAR, S. Resistin. **Current Opinion in Lipidology**, v. 17, n. 2, p. 170-175, 2006. ISSN 0957-9672. Disponível em: < <http://journals.lww.com/co-lipidology/Fulltext/2006/04000/Resistin.11.aspx> >.
- 37 MANTZOROS, C. S. et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 4, p. E567-E584, 2011. ISSN 0193-1849.

- 38 WOFFORD, M. R.; HALL, J. E. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 29, p. 3621-3637, 2004. ISSN 1381-6128.
- 39 CHROSTOWSKA, M. et al. Impact of obesity on cardiovascular health. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 147-156, 2013/04/01/ 2013. ISSN 1521-690X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521690X13000183> >.
- 40 MA, T. K. et al. Renin–angiotensin–aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. **British journal of pharmacology**, v. 160, n. 6, p. 1273-1292, 2010. ISSN 1476-5381.
- 41 PACURARI, M. et al. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. **International journal of inflammation**, v. 2014, 2014. ISSN 2090-8040.
- 42 ALVAREZ, A. et al. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 402-408, 2004. ISSN 0006-4971.
- 43 LIANG, B. et al. Angiotensin-(1-7) Attenuates Angiotensin II-Induced ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 Expression via the MAS Receptor Through Suppression of P38 and NF- $\kappa$ B Pathways in HUVECs. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 2472-2482, 2015. ISSN 1015-8987. Disponível em: < <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000374047> >.
- 44 LÓPEZ-ANDRÉS, N. et al. Cardiotrophin 1 Is Involved in Cardiac, Vascular, and Renal Fibrosis and Dysfunction. **Hypertension**, v. 60, n. 2, p. 563-573, 2012.
- 45 LOPEZ, M. F.; KRASTINS, B.; NING, M. The role of apolipoprotein E in neurodegeneration and cardiovascular disease. **Expert Review of Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 371-381, 2014/06/01 2014. ISSN 1478-9450. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1586/14789450.2014.901892> >.
- 46 FILOU, S. et al. Distinct Roles of Apolipoproteins A1 and E in the Modulation of High-Density Lipoprotein Composition and Function. **Biochemistry**, v. 55, n. 27, p. 3752-3762, 2016/07/12 2016. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00389> >.
- 47 PARK, Y. M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. **Exp Mol Med**, v. 46, p. e99, 06/06/online 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2014.38> >.

- 48 BRASIER, A. R. The nuclear factor- $\kappa$ B–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. **Cardiovascular Research**, v. 86, n. 2, p. 211-218, 2010. ISSN 0008-6363. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvq076> >.
- 49 CHU, W.-M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 222-225, 1/28/2013. ISSN 0304-3835. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383512006027> >.
- 50 PATIAL, S.; PARAMESWARAN, N. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; Signaling in Macrophages. v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010-12-04 2010. Disponível em: <  
<http://dl.begellhouse.com/journals/6dbf508d3b17c437,4755276625828a95,5f80aba07ffe0f3a.html> >.
- 51 CABAL-HIERRO, L.; LAZO, P. S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1297-1305, 6// 2012. ISSN 0898-6568. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656812000630> >.
- 52 FEBBRAIO, M. A. Role of interleukins in obesity: implications for metabolic disease. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 312-319, 6// 2014. ISSN 1043-2760. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104327601400040X> >.
- 53 DE OLIVIERA NASCIMENTO, L.; MASSARI, P.; WETZLER, L. M. The role of TLR2 in infection and immunity. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 79, 2012. ISSN 1664-3224.
- 54 AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 07//print 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1038/nri1391> >.
- 55 BLACK, S.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. C-reactive protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 48487-48490, 2004. ISSN 0021-9258.
- 56 PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805-1812, 2003. ISSN 0021-9738.
- 57 BAHCECI, M. et al. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is

- adipocyte size associated with inflammation in adults? **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 30, n. 3, p. 210-214, 2007.
- 58 KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 3, p. 439-451, 2005. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/er.2005-0005> >.
- 59 KUBOTA, N. et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. **Cell Metab**, v. 6, n. 1, p. 55-68, Jul 2007. ISSN 1550-4131 (Print); 1550-4131.
- 60 PÉREZ-PÉREZ, A. et al. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2017. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610116301630> >.
- 61 TYAGI, S. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 4, p. 236-240, October 1, 2011 2011. ISSN 2231-4040. Disponível em: < <http://www.japtr.org/article.asp?issn=2231-4040;year=2011;volume=2;issue=4;spage=236;epage=240;aulast=Tyagi> >.
- 62 WHITE, U. A.; STEPHENS, J. M. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 318, n. 1–2, p. 10-14, 4/29/ 2010. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720709004602> >.
- 63 DE SOUSA, J. et al. Endothelium adhesion molecules ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 and VLA-4 expression in leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 116-124, 3// 2017. ISSN 0882-4010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401016305319> >.
- 64 STEINER, O. et al. Differential Roles for Endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in Shear-Resistant T Cell Arrest, Polarization, and Directed Crawling on Blood–Brain Barrier Endothelium. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 8, p. 4846-4855, 2010.
- 65 IWAMIYA, T. et al. Cardiac fibroblast-derived VCAM-1 enhances cardiomyocyte proliferation for fabrication of bioengineered cardiac tissue. **Regenerative Therapy**, v. 4, p. 92-102, 6// 2016. ISSN 2352-3204. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352320416000092> >.

- <sup>66</sup> SØRENSEN, B. et al. **Fibrinogen as a hemostatic agent**. Seminars in thrombosis and hemostasis: Thieme Medical Publishers, 2012. 268-273 p.
- <sup>67</sup> COLLABORATION, I. R. G. C. E. R. F. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1205-1213, //31 2012. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673611619314> >. Acesso em: 2012/4/6/.
- <sup>68</sup> BENIGNI, A.; CASSIS, P.; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 247-257, 2010.
- <sup>69</sup> GEKLE, M.; GROSSMANN, C. Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 458, n. 2, p. 231, 2009. ISSN 0031-6768.
- <sup>70</sup> CICCARELLI, M. et al. Chapter 11 - Adrenergic Receptors A2 - Schisler, Jonathan C. In: LANG, C. H. e WILLIS, M. S. (Ed.). **Endocrinology of the Heart in Health and Disease**: Academic Press, 2017. p.285-315. ISBN 978-0-12-803111-7.
- <sup>71</sup> UMAR, S.; VAN DER LAARSE, A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. **Mol Cell Biochem**, v. 333, n. 1-2, p. 191-201, Jan 2010. ISSN 0300-8177.
- <sup>72</sup> MEYER, N. L.; CHASE, P. B. Role of cardiac troponin I carboxy terminal mobile domain and linker sequence in regulating cardiac contraction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 601, p. 80-87, 7/1/ 2016. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986116300625> >.
- <sup>73</sup> JIANG, D.-S. et al. Interferon Regulatory Factor 1 Is Required for Cardiac Remodeling in Response to Pressure Overload. **Hypertension**, v. 64, n. 1, p. 77-86, 2014.
- <sup>74</sup> JIANG, D.-S. et al. Interferon Regulatory Factor 7 Functions as a Novel Negative Regulator of Pathological Cardiac Hypertrophy. **Hypertension**, v. 63, n. 4, p. 713-722, 2014.
- <sup>75</sup> ZHANG, S.-M. et al. Interferon regulatory factor 8 modulates phenotypic switching of smooth muscle cells by regulating the activity of myocardin. **Molecular and cellular biology**, v. 34, n. 3, p. 400-414, 2014. ISSN 0270-7306.

- 76 ZHAO, G.-N.; JIANG, D.-S.; LI, H. Interferon regulatory factors: at the crossroads of immunity, metabolism, and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 2, p. 365-378, 2// 2015. ISSN 0925-4439. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443914001173> >.
- 77 GREENOW, K.; PEARCE, N. J.; RAMJI, D. P. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, n. 5, p. 329-342, 2005// 2005. ISSN 1432-1440. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-004-0631-3> >.
- 78 NAKAYA, K.; AYAORI, M.; IKEWAKI, K. Chapter 6 - Role of ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1 in Reverse Cholesterol Transport and Atherosclerosis A2 - Komoda, Tsugikazu. In: (Ed.). **The HDL Handbook (Third Edition)**: Academic Press, 2017. p.121-151. ISBN 978-0-12-812513-7.
- 79 EMBUSCADO, M. E. Bioactives From Spices and Herbs. In: (Ed.). **Reference Module in Food Science**: Elsevier, 2018. ISBN 978-0-08-100596-5.
- 80 MOPURI, R.; ISLAM, M. S. Medicinal plants and phytochemicals with anti-obesogenic potentials: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 1442-1452, 2017/05/01/ 2017. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332216328177> >.
- 81 RIBEIRO, A. et al. Antiangiogenic compounds: well-established drugs versus emerging natural molecules. **Cancer Letters**, v. 415, p. 86-105, 2018/02/28/ 2018. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383517307723> >.
- 82 WANG, C.-L. et al. Aqueous extract of *Antrodia cinnamomea* reduced high-fat diet-induced obesity in mice and suppressed adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 185-196, 2017/08/01/ 2017. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617302864> >.
- 83 MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Anti-obesity effects of tea from *Mangifera indica* L. leaves of the Ubá variety in high-fat diet-induced obese rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, n. Supplement C, p. 938-945, 2017/07/01/ 2017. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217312179> >.

- 84 MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Mango leaf tea promotes hepatoprotective effects in obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 437-446, 2018. ISSN 1756-4646.
- 85 KRUGER, M. J. et al. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41-52, 5// 2014. ISSN 0963-9969. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914000520> >.
- 86 DU, G. et al. Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 162, p. 23-34, 6// 2016. ISSN 0163-7258. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016372581630050X> >.
- 87 FUSCO, R. et al. A flavonoid-rich extract of orange juice reduced oxidative stress in an experimental model of inflammatory bowel disease. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 168-178, 3// 2017. ISSN 1756-4646. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616304388> >.
- 88 MOREIRA, M. E. D. C. et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 143-153, 2// 2017. ISSN 1756-4646. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616303395> >.
- 89 NARASIMHULU, C. A. et al. Water-Soluble Components of Sesame Oil Reduce Inflammation and Atherosclerosis. **J Med Food**, v. 19, n. 7, p. 629-37, Jul 2016. ISSN 1096-620x.
- 90 DU, X. et al. Combined effects of vitamin E and omega-3 fatty acids on protecting ambient PM2.5-induced cardiovascular injury in rats. **Chemosphere**, v. 173, p. 14-21, 4// 2017. ISSN 0045-6535. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517300115> >.
- 91 JONES, P. J. H. et al. High-oleic canola oil consumption enriches LDL particle cholesteryl oleate content and reduces LDL proteoglycan binding in humans. **Atherosclerosis**, v. 238, n. 2, p. 231-238, 2// 2015. ISSN 0021-9150. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021915014016177> >.
- 92 MOLDOVAN, B. et al. Antioxidant activity of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruits extract and the in vivo evaluation of its anti-inflammatory effects. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 77-87, 10// 2016. ISSN 1756-4646. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616301827> >.

- <sup>93</sup> WANG, Y. et al. Effects of *Lonicera caerulea* berry extract on lipopolysaccharide-induced toxicity in rat liver cells: Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic activities. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 217-226, 6// 2017. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617301573> >.
- <sup>94</sup> ROMERO, M. et al. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. **Food Funct**, v. 7, n. 1, p. 584-93, Jan 2016. ISSN 2042-6496.
- <sup>95</sup> DONG, P. et al. Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) leave flavonoids attenuate atherosclerosis development in apoE knock-out mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 479-488, 2/23/ 2017. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887411730274X> >.
- <sup>96</sup> WANG, Z. et al. Blueberry Anthocyanin-Enriched Extracts Attenuate Fine Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>)-Induced Cardiovascular Dysfunction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016. ISSN 0021-8561.
- <sup>97</sup> CAO, Y. et al. Anti-myocardial ischemia effect of *Syringa pinnatifolia* Hemsl. by inhibiting expression of cyclooxygenase-1 and -2 in myocardial tissues of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 259-268, 7/1/ 2016. ISSN 0378-8741. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874116302409> >.
- <sup>98</sup> MUNKONG, N. et al. Vasoprotective effects of rice bran water extract on rats fed with high-fat diet. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 9, p. 778-784, 9// 2016. ISSN 2221-1691. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115310285> >.
- <sup>99</sup> MARTINO, H. S. D. et al. Anti-lipidaemic and anti-inflammatory effect of açai (*Euterpe oleracea* Martius) polyphenols on 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 432-443, 5// 2016. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616000931> >.
- <sup>100</sup> XU, H. et al. Characterization of active constituents in *Pyracantha fortuneana* fruit extract and their effects on hyperlipidaemia, obesity, and oxidative stress in rodents. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 278-290, 4// 2016. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616000311> >.

## CAPÍTULO 2

### Chá de folhas de manga promove efeito hepatoprotetor em ratos obesos

#### Artigo publicado

Journal of Functional Foods 49 (2018) 437–446



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)



### Mango leaf tea promotes hepatoprotective effects in obese rats

Natalia Medina Ramírez<sup>a,\*</sup>, José Humberto de Queiróz<sup>a</sup>, Sônia Machado Rocha Ribeiro<sup>b</sup>,  
Renata Celi Lopes Toledo<sup>b</sup>, Maria Eliza Castro Moreira<sup>b</sup>, Claudio Lisías Mafra<sup>a</sup>,  
Laércio dos Anjos Benjamin<sup>c</sup>, Camila de Moraes Coelho<sup>d</sup>, Marcia Paranho Veloso<sup>d</sup>,  
Hércia Stampini Duarte Martino<sup>b</sup>



<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, PH Rolfs Avenue, s/n, Viçosa, Minas Gerais 36571-000, Brazil

<sup>b</sup> Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, PH Rolfs Avenue, s/n, Viçosa, Minas Gerais 36571-000, Brazil

<sup>c</sup> Department of Veterinary, Federal University of Viçosa, PH Rolfs Avenue, s/n, Viçosa, Minas Gerais 36571-000, Brazil

<sup>d</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, Alfenas, Minas Gerais 37130-000, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Stress oxidative  
Hepatic steatosis  
*Mangifera indica*  
Molecular docking  
Liver histology  
NF-κB  
PPARα

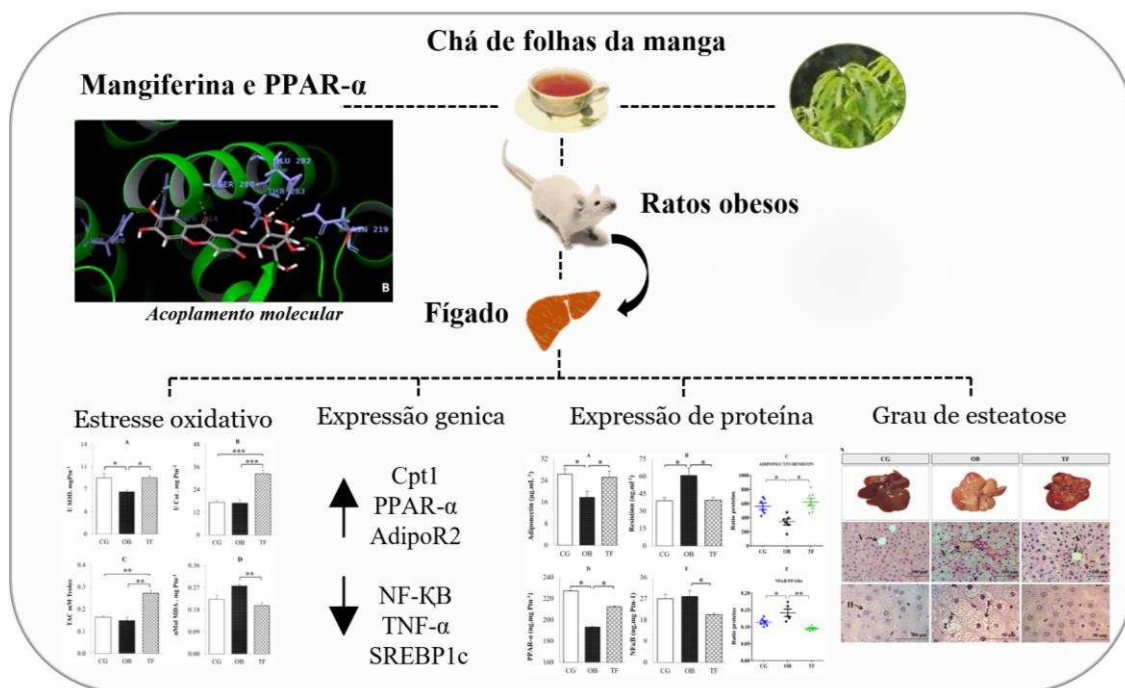
#### ABSTRACT

As mango leaf tea contains mangiferin and other bioactive compounds, this study investigated its anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective effects on rats with high-fat induced obesity. Three groups were established: a control group (AIN93M diet), an obese group (high-fat diet HFD) and a treatment group (HFD with mango leaf tea for 8 weeks). Mango leaf tea increased antioxidant enzymes, total antioxidant capacity, AdipoR2 and PPAR-α mRNA and proteins expressions and, it also inhibited the NF-κB p65 and SREBP1c genes expressions in the liver. This beverage also leads to Cpt1 overexpression and a significant decrease in the accumulation of fat droplets, improving the hepatic steatosis. Molecular docking suggested a positive interaction between mangiferin, the main bioactive compound of mango leaf tea, and PPAR-α. Mango leaf tea exhibited a hepatoprotective effect through activating PPARα and decreasing the NF-κB p65 expressions, reducing oxidative stress and steatosis, and improving the lipid metabolism.

MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Mango leaf tea promotes hepatoprotective effects in obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 437-446, 2018. ISSN 1756-4646.

## CAPÍTULO 2

### Chá de folhas de manga promove efeito hepatoprotetor em ratos obesos



### Resumo

O chá de folhas de manga contém mangiferina e outros compostos bioativos, o que nos motivou a pesquisar seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e hepatoprotectores em ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD). Três grupos foram estabelecidos: um grupo controle (dieta AIN93M), um grupo obeso (dieta HFD) e um grupo tratado (dieta HFD e chá de folhas de manga por 8 semanas). O chá de folhas de manga aumentou as enzimas antioxidantes, a capacidade antioxidante total, e a expressão de mRNA e proteínas do AdipoR2 e do PPAR- $\alpha$ , e inibiu a expressão dos genes NF- $\kappa$ B p65 e SREBP1c, no fígado dos animais tratados. Esta bebida também elevou a expressão do gene Cpt1 e diminuiu significativamente o acúmulo de gotículas de gordura no fígado, melhorando a esteatose hepática. A docagem molecular sugeriu uma interação positiva entre a mangiferina, principal componente do chá de folhas de manga, e o PPAR- $\alpha$ . O chá de folhas de manga exibiu um efeito hepatoprotetor ativando a expressão do PPAR- $\alpha$  e diminuindo o NF- $\kappa$ B p65, reduzindo o estresse oxidativo e a esteatose hepática, e modulando o metabolismo de lipídeos.

**Palavras-chave:** estresse oxidativo; esteatose hepática; Mangifera indica; acoplamento molecular; histologia do fígado; PPAR $\alpha$ .

## 1. Introdução

A obesidade é uma das alterações metabólicas de maior prevalência no mundo e o principal fator de risco para o desenvolvimento do processo inflamatório e o estresse oxidativo. No ano de 2016, estimou-se que 41 milhões de crianças (menores de 5 anos), 340 milhões de crianças e adolescentes (idades entre os 5 e 19 anos), e 650 milhões de adultos (maiores de 19 anos), foram diagnosticados com sobrepeso e obesidade. Conforme a Organização Mundial de Saúde, essas estimativas globais estão aumentando<sup>1;2</sup>. O consumo elevado de gorduras resulta em uma alteração metabólica dos lipídeos, a qual pode incrementar a liberação de lipídeos para o fígado e reduzir a oxidação dos ácidos graxos. Isto pode se manifestar no acúmulo de ácidos graxos (como triacilgliceróis) nos hepatócitos, causando a esteatose hepática<sup>3;4</sup>. O corpo tem uma sensibilidade particular ao consumo elevado de gordura, por isto está mais exposto a um desequilíbrio da homeostase redox (entre as espécies reativas de oxigênio e as antioxidantes) e um aumento dos mediadores pro-inflamatórios<sup>2;5</sup>. Portanto, a obesidade devido ao elevado consumo da dieta rica em gordura, está fortemente associada ao estresse oxidativo e a esteatose hepática<sup>3</sup>.

Durante a obesidade a inflamação crônica pode ocorrer devido à produção de moléculas inflamatórias (citocinas) e à ativação das células do sistema imune (neutrófilos e macrófagos), como um resultado do excessivo acúmulo de células adiposas, levando à ativação de diferentes vias de sinalização celular. Foi demonstrado que as vias do fator nuclear kappa-B (NF-κB) e o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) estão envolvidas no processo da inflamação por obesidade<sup>6-9</sup>.

Devido aos graves efeitos da obesidade no metabolismo humano, atualmente são desenvolvidos vários tratamentos usando produtos naturais e fitoterápicos. Chás e extratos contendo diversos compostos bioativos tem sido amplamente estudados e usados. Os chás são naturais, econômicos e contém uma variedade de compostos bioativos com propriedades funcionais, representando uma grande alternativa para o tratamento e redução do risco da obesidade e suas alterações<sup>10-13</sup>.

A manga (*Mangifera indica*) é uma fruta tropical rica em compostos bioativos com potencial terapêutico. As folhas da manga são pouco usadas e são culturalmente consideradas um tipo de resíduo. No entanto, são uma importante fonte de mangiferina, fenólicos, flavonoides, benzofenonas e antioxidantes com atividade de retirada de radicais livres. Estes compostos bioativos tem sido relacionados às atividades biológicas, incluindo as anti-inflamatória, antioxidante, antidiabética, e outras<sup>14-17</sup>. Como o chá é importante para a vida humana e as folhas da manga contêm muitos compostos bioativos, nosso grupo de pesquisa desenvolveu e estudou um chá usando folhas processadas da manga da variedade Ubá. Previamente reportamos que o chá de folhas de manga contém  $0.72 \pm 0.08$  mg.mL<sup>-1</sup> de mangiferina,  $1.59 \pm 0.11$  mg GAE. mL<sup>-1</sup> de fenólicos totais e  $80.33 \pm 0.18$  % de atividade de retirada de radical<sup>14</sup>. Também demonstramos que esta bebida diminuiu o acúmulo de gordura abdominal, regulou o metabolismo da glicose, estimulou marcadores anti-inflamatórios e melhorou a hipertrofia dos adipócitos,

confirmando seu efeito anti-obesidade <sup>18</sup>. Em contraste, até a data não foram relatados efeitos do tratamento com o chá de folhas de manga no fígado de ratos obesos. Nós temos a hipótese de que o chá de folhas de manga pode modular os marcadores associados ao acúmulo de lipídeos no fígado, tem efeito antioxidante, e melhora as alterações causadas pelo consumo de dieta hiperlipídica. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito hepatoprotetor do chá de folhas de manga no fígado de ratos com obesidade induzida.

## **2. Materiais e metodologia**

### **2.1. Preparo do chá**

Folhas novas de *M. indica* da variedade Ubá, foram coletadas em outubro de 2015, na Zona da Mata (20°60' S, 43°06' W, 183 m), estado de Minas Gerais (Brasil). As plantas foram identificadas, e os comprovantes dos espécimes foram depositados no herbário da Universidade Federal de Viçosa, No. VIC37611. As folhas foram lavadas, sanitizadas, secas e trituradas como foi descrito anteriormente <sup>14</sup>. O pó obtido (50 g) foi misturado com um litro de água (concentração final de 5%), aquecido (95°C) por 5 min e posteriormente filtrado (papel filtro Melitta N°4). O chá de folhas de manga foi previamente caracterizado por Medina Ramírez et al. <sup>14</sup>, onde a mangiferina foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), os fenólicos totais foram estimados usando o reativo de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante foi analisada usando pelo método do DPPH (2-diphenil-1-picrilhidrazil).

### **2.2. Ensaio biológico**

Um total de 24 ratos Wistar (200 ± 50 g), com 60 dias de idade, foram dispostos em condições controladas: ciclo claro-escuro de 12/12 h (07:00 AM-07:00 PM), temperatura ambiente 22 ± 3 °C e umidade constante (80%). Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o comitê de ética para pesquisas em animais da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (registro aprovado sob o número 29/2016). O desenho experimental e a dieta de intervenção foram descritos previamente <sup>18</sup>. De acordo com o método o grupo controle não-obeso (CG) recebeu dieta AIN93M e água, o grupo obeso (OB) foi alimentado com dieta HFD e água, e o grupo tratado (TF) recebeu HFD e 50 mL/dia do chá de folhas de manga, durante 8 semanas. Ambos os grupos OB e TF foram alimentados com dieta HFD por 7 semanas antes da intervenção. A água foi administrada ad libitum. O chá foi preparado diariamente e administrado via oral usando bebedouros que foram lavados e trocados diariamente, junto ao chá. As dietas experimentais são apresentadas na Tabela 1 <sup>19</sup>. Os animais foram anestesiados com Isoflurano<sup>®</sup> 100% (Cristália, SP, Brasil) e eutanasiados por punção cardíaca. Foram

coletados o sangue e o fígado, sendo colocados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem analisados. Fragmentos do fígado foram separados para realizar as análises histológicas.

**Tabela- 1.** Composição das dietas e densidade calórica

Ingredientes (g. 100 g <sup>-1</sup> )		
	AIN93M	HFD
Caseína	14,00	19,50
Maltodextrina	15,50	10,00
Sacarose	10,00	34,10
Amido de milho	46,57	5,32
Óleo de soja (mL)	4,00	1,00
Banha de porco	0,00	20,00
Celulose	5,00	5,00
Mix Mineral	3,50	3,50
Mix Vitamínico	1,00	1,00
Bitartarato colina	0,25	0,25
L-cistina	0,18	0,18
Colesterol	0,00	0,15
Butilato de hydroxitolueno	0,0008	0,004
Total	100,00	100,00
<b>Calorias (Kcal)</b>		
Caseina	56,00	78,00
Maltodextrina	62,00	40,00
Sacarose	40,00	136,40
Amido de milho	186,28	21,28
Óleo de soja (mL)	36,00	9,00
Banha de porco	-	180,00
CD	3,80	4,70

CD: densidade caloria (Kcal.g<sup>-1</sup>)

### 2.3. Consumo de dieta, peso corporal e parâmetros séricos

O consumo do chá e da dieta foram medidos diariamente e uma vez por semana, respectivamente. Para o controle do chá, foram coletados e medidos os resíduos do chá nos bebedouros e em copo de plástico de 50 mL (situado abaixo de cada bebedouro). O peso dos animais foi monitorado uma vez por semana simultaneamente. A eficiência alimentar foi calculada como se segue:  $FE = [\text{ganho de peso corporal (g)} / \text{consumo energético (kcal)}] * 1000$ . Foram determinados os parâmetros séricos alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), colesterol total (TC) e os triacilgliceróis (TG), como o descrito previamente<sup>18</sup>, usando kits comerciais (Bioclin Quibasa, SP, Brasil).

## 2.4. Análises do estresse oxidativo

O homogenato do fígado foi preparado homogeneizando 200 mg de tecido hepático (de cada animal, de cada grupo, separadamente) em solução tampão de Tris-HCL (10 mM, pH 7.4). Posteriormente foram centrifugados por 10 min a 4°C e 12000 x g. O sobrenadante foi coletado cuidadosamente e armazenado a -80°C, até realizar as análises. Os valores obtidos foram corrigidos pela quantidade de proteína total. Todos os reagentes foram de grau analítico e foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

### 2.4.1. Quantificação da proteína total

A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford <sup>20</sup>. Para a reação foram misturados 5 µl do homogenato hepático, 395 µl de água destilada e 100 µl do reagente Bradford (0.01% Coomassie Brilliant Blue [G250], 4.7% de etanol [ao 95%], e 8.5% de ácido fosfórico [ao 85%]). As amostras foram misturadas vigorosamente no vortex por 30 s e deixadas em repouso por 15 min, sem luz direta e a temperatura aproximada de 20°C. A absorvância foi lida a 595 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific MultiSkan™ GO). Os valores foram expressos como miligramas de proteína por mililitro de amostra (mg Ptn. mL<sup>-1</sup>), usando uma curva padrão de proteína de albumina sérica bovina –BSA (2 mg.mL<sup>-1</sup>), variando as concentrações de 2 até 44 µg.mL<sup>-1</sup>.

### 2.4.2. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada usando o método baseado na capacidade da enzima para inibir 50% da oxidação do pirogalol <sup>21</sup>. Para a reação, foram misturados 20 µl do homogenato hepático, 6 µl de MTT (brometo (3- [4,5-dimetiltiazol-2 M] -2,5-dipheniltetrazolio), 1.25 mM), 15 µl de pirogalol (1 mM, HCL 10 mM) e 259 µl de tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8.2). A mistura foi incubada por 5 min a 37°C e a absorvância foi lida a 570 nm (spectrophotometer Thermo Scientific MultiSkan™ GO). Foram medidos um branco (sem amostra e sem pirogalol) e um padrão (os reagentes só). Os valores foram expressos como Unidade de SOD por miligramas de proteína (U SOD. mg Ptn<sup>-1</sup>).

### 2.4.3. Atividade da catalase (CAT)

A CAT foi determinada pelo método espectrofotométrico do peróxido de hidrogênio, onde uma unidade de CAT (1 U) descompõe um micromol (1 µmol) de peróxido de hidrogênio, em 1 minuto de reação <sup>22; 23</sup>. Para a reação, foram misturados 10 µl do homogenato do fígado com 1 mL tampão fosfato (NaCl 136.9 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.27 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1 mM, pH 7.4) contendo 30% de peróxido de hidrogênio. Posteriormente, foi medida a absorvância a 240 nm nos tempos 0 e 60 s (T70 + UV/VIS spectrometer, PG Instruments Ltd, Leicestershire, UK). O branco consistiu de 10 µl do homogenato

hepático de cada amostra em 1 mL de tampão fosfato. Os valores foram expressos como uma unidade de CAT por miligramas de proteína (U CAT. mg Ptn<sup>-1</sup>) como segue: U CAT. mg Ptn<sup>-1</sup> = [(Abs<sub>t0</sub> - Abs<sub>t60</sub>) \* 2.361] / (mg de proteína da amostra \* Abs<sub>t0</sub>), onde Abs representa a absorvância medida.

#### 2.4.4. Capacidade antioxidante total (TAC)

A TAC foi determinada pelo ensaio de ELISA usando o Kit do ensaio antioxidante (CS0790, SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, USA), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos como milimol de Trolox por litro de homogenato (mM Trolox).

#### 2.4.5. Malondialdeído (MDA)

O MDA foi medido pelo teste das substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) <sup>24; 25</sup>. Para a reação, foram misturados 100 µl do homogenato hepático e 200 µl da solução de TBARS (15% de ácido tricloroacético, 0.375% de ácido tiobarbitúrico, e HCL 0.25 M). A mistura foi incubada por 40 min a 90 °C e deixada em repouso por 5 min. Posteriormente foram adicionados 300 µl de n-butanol e misturados usando vortex por 2 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 min a 3500 x g e o sobrenadante foi coletado cuidadosamente. A absorvância foi medida a 535 nm (spectrophotometer Thermo Scientific MultiSkan™ GO). Os resultados foram expressos como nanomol de MDA por miligramas de proteína (nMol.mg Ptn<sup>-1</sup>) usando uma curva padrão de TMPO (1,1,3,3 tetraetoxipropano) variando as concentrações de 2,5 até 20 µM.

#### 2.5. Expressão de genes no fígado

O RNA foi extraído de 100 mg de tecido hepático, usando o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA). O cDNA foi preparado a partir de 2 µg de RNA usando o kit M-MLV Reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA). Os genes foram analisados usando o ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), para o qual foram utilizados 2 µL of cDNA e o SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), de acordo com as especificações do fabricante. Os parâmetros da RT-qPCR foram: uma etapa de desnaturação a 95 °C for 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, o anelamento a 60 °C for 30 s, e uma etapa de alongação a 72 °C por 30 s, seguidos da curva de Melting. As amostras de cDNA foram lidas no equipamento AB SepOne Rt-PCR System (Applied Biosystem). Os resultados foram expressos como o Fold Change calculado de acordo com o método da expressão relativa, usando uma curva padrão de cada gene (intervalo de concentração de 1000 ng até 31.25 ng), e normalizados em relação ao grupo OB. As sequências dos primers (Tabela 2) foram obtidas usando o software Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

**Tabela- 2.** Oligonucleotídeos usados na análise qRT-PCR no fígado dos animais experimentais.

Gene alvo	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
AdipoR2	CATGTTTGCCACCCCTCAGTA	ATGCAAGGTAGGGATGATTCCA
PPAR- $\alpha$	CATTTCTGCTCCACACTATGAA	CGGGAAGGACTTTATGTATGAG
Cpt1	GTAAGGCCACTGATGAAGGAAGA	ATTTGGGTCCGAGGTTGACA
SREBP1c	CGTACCGTTCCTCTATCAATGAC	AGTTTCTGGTTGCTGTGCTGTAAG
NF- $\kappa$ B p65	CTGCGCGCTGACGGC	TCGTCGTCTGCCATGTTGAA
TNF- $\alpha$	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG
GAPDH	AGGTTGTCTCCTGTCACTTC	CTGTTGCTGTAGCCATATTC

ADIPOR2, receptor de adiponectina 2; PPAR- $\alpha$ , receptor ativado por proliferador de peroxissoma alpha; CPT1, carnitina palmitoiltransferase I; SREBP1c, proteína de união a elementos regulatórios de esteróis 1c; NF- $\kappa$ B p65, fator nuclear kappa B; GAPDH, gliceraldehido 3-fosfato desidrogenase.

## 2.6. Expressão de proteínas pelo método de ELISA

As proteínas foram quantificadas pelo ensaio de ELISA. As concentrações séricas de adiponectina e resistina foram determinadas usando os kits Rat Adiponectin (EZRADP-62K, Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Germany) e Rat Resistin (SEA847RA, Wuhan USCN Business Co., Ltd.-Life science, Houston, USA), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos como microgramas e nanogramas de adiponectina e resistina respectivamente, por mililitro de soro.

Para a análise das proteínas PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, foram extraídas as frações da proteína nuclear do fígado usando o kit “Nuclear and Cytoplasmic Extraction” da Thermo Scientific™ NE-PER™ (Rockford, USA). Posteriormente a proteína nuclear foi quantificada usando os kits Rat PPAR- $\alpha$  (Nº E-EL-R0725) e Rat NF- $\kappa$ B p65 (Nº E-EL-R0674) da Elabscience Biotechnology Co.,Ltd (USA), de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos como nanogramas por miligrama de proteína nuclear (ng . mg Ptn<sup>-1</sup>). Foi analisada a relação NF- $\kappa$ B p65/PPAR- $\alpha$ , entre os valores das proteínas.

## 2.7. Western blot

Foram extraídas as frações, nuclear e citoplasmática, das proteínas do tecido hepático usando o kit “Nuclear and Cytoplasmic Extraction” da Thermo Scientific™ NE-PER™ (CA, USA). A proteína total do NF- $\kappa$ B p65 foi detectada pelo ensaio Western blot, usando o sistema de eletroforese vertical (Loccus Verti-10, LPS 600V, SP, Brasil). Para isto, foram misturados 30  $\mu$ L do extrato (nuclear ou citoplasmático), contendo 15  $\mu$ g de proteína total, com 10  $\mu$ L da solução tampão 4X. As amostras foram aplicadas em gel de poliácridamida-SDS (Tris 1.5M, pH 8.8; 30% acrilamida; 10% SDS; 10% persulfato de amônio; água ultrapura) em tampão TAE 1x, a corrente elétrica constante 100V por 2h 40 min aproximadamente. As proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (BioRad®, CA, California) usando tampão de transferência

(Tris 0.25M, glicina ao 2.0M e 20% de metanol), a corrente elétrica constante de 0.35A por 90 min. Após a transferência, as membranas foram lavadas com água ultrapura e coradas com Ponceau 0,5% (corante vermelho). As proteínas inespecíficas foram bloqueadas com 3% de BSA em solução, mantendo uma temperatura de 4°C por 12 h, e finalizado o tempo foram lavadas com TBS-Twin a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas a 4°C durante 12 h, com anticorpo primário monoclonal (anti-NF-κB p65, 65kDA, ab13594, diluído 3:1000 em TBS-T e 3% de BSA, Ab Cambridge, United Kingdom). Ao final, as membranas foram lavadas com TBS-Twin, incubadas a 20°C por 1 h com anticorpo secundário (Horseradish Peroxidase - HRP, A9044, diluído 3:1000 em TBS-T e 3% de BSA, Sigma-Aldrich Ltda, St Louis, MO, USA), e novamente lavadas como descrito na etapa anterior. As proteínas de NF-κB p65 foram reveladas deixando as membranas em solução mix (Tris-HCl 50mM, pH 7.6; 3,3-Diaminobenzidina tetrahydrocloruro; 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 15 min a temperatura ambiente.

## 2.8. Acoplamento molecular

A docagem molecular entre a mangiferina e o receptor de PPAR- $\alpha$  foi realizada como o descrito previamente<sup>12</sup>. As aplicações informáticas foram realizadas usando o software OpenSUS Tumbleweed. De acordo com as modificações, a mangiferina e o Aleglitazar (ligante usado na análise de reacoplamento) foram desenhados usando o programa Maestro 10.2.010 (Schrödinger Release 2015-2: Maestro, version 10.2.010, LLC, New York, NY, USA). Os softwares usados para a preparação dos ligantes envolvidos no estudo foram o LigPrep 3.4 (Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, version 3.4, LLC) com OPLS\_3 campo de força e estado de ionização para pH 7.0  $\pm$  2.0. A estrutura cristalográfica do PPAR- $\alpha$  (Protein Data Bank [PDB] ID: 3G8I)<sup>26</sup>, foi obtida da base de dados PDB. Também foi utilizado o software Protein Preparation Wizard (Schrödinger Release 2015-2: Schrödinger Suite 2015-2 Protein Preparation Wizard; Epik version 3.2; Impact version 6.7; Prime version 4.0, Schrödinger, LLC) para preparar o receptor de PPAR- $\alpha$ . A otimização dos resultados realizou-se mediante o campo de força OPLS3 no MacroModel 9.9. Os estudos da docagem molecular entre o PPAR- $\alpha$  e o ligante foram realizados usando o Induced Fit Docking protocol (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2: Schrödinger Suite 2015-2 Induced Fit Docking protocol; Glide version 6.7; Prime version 4.0; Schrödinger, LLC), definindo uma área de grade de 20 $\times$ 20 $\times$ 20 Å. Todos os softwares foram adquiridos da Schrödinger Suite.

## 2.9. Histologia

Fragmentos do fígado foram fixados em formalina (10%) e embebidos em resina glicolmetacrilato (Leica, Historesin<sup>®</sup>). Foram laminadas secções de 5 $\mu$ m e coradas com hematoxilina-eosina (HE). As imagens foram obtidas usando o fotomicroscópio Nikon-Elipse E600YF-L (Japão). As porcentagens de núcleo, gotículas de gordura, infiltrados inflamatórios citoplasma e vasos sanguíneos, foram determinados no tecido hepático

usando o software ImageJ (Fiji). O diâmetro do núcleo e o citoplasma hepático foram determinados usando o software Image-Pro Plus 7.0. Adicionalmente, foi calculada a relação núcleo/citoplasma (NCR). O grau de esteatose hepática foi medido semi-quantitativamente de acordo com a porcentagem de gordura acumulada, como segue: grau 0, se < 5%; grau 1, se  $\geq 5\%$  e  $\leq 33\%$ ; grau 2, se  $> 33\%$  e  $\leq 66\%$ ; e grau 3, se  $> 66\%$  <sup>27</sup>. O índice hepatossômico (HSI) foi calculado como segue: HSI (%) = [(peso do fígado/peso final do animal) x 100].

#### 2.10. Análise estatística

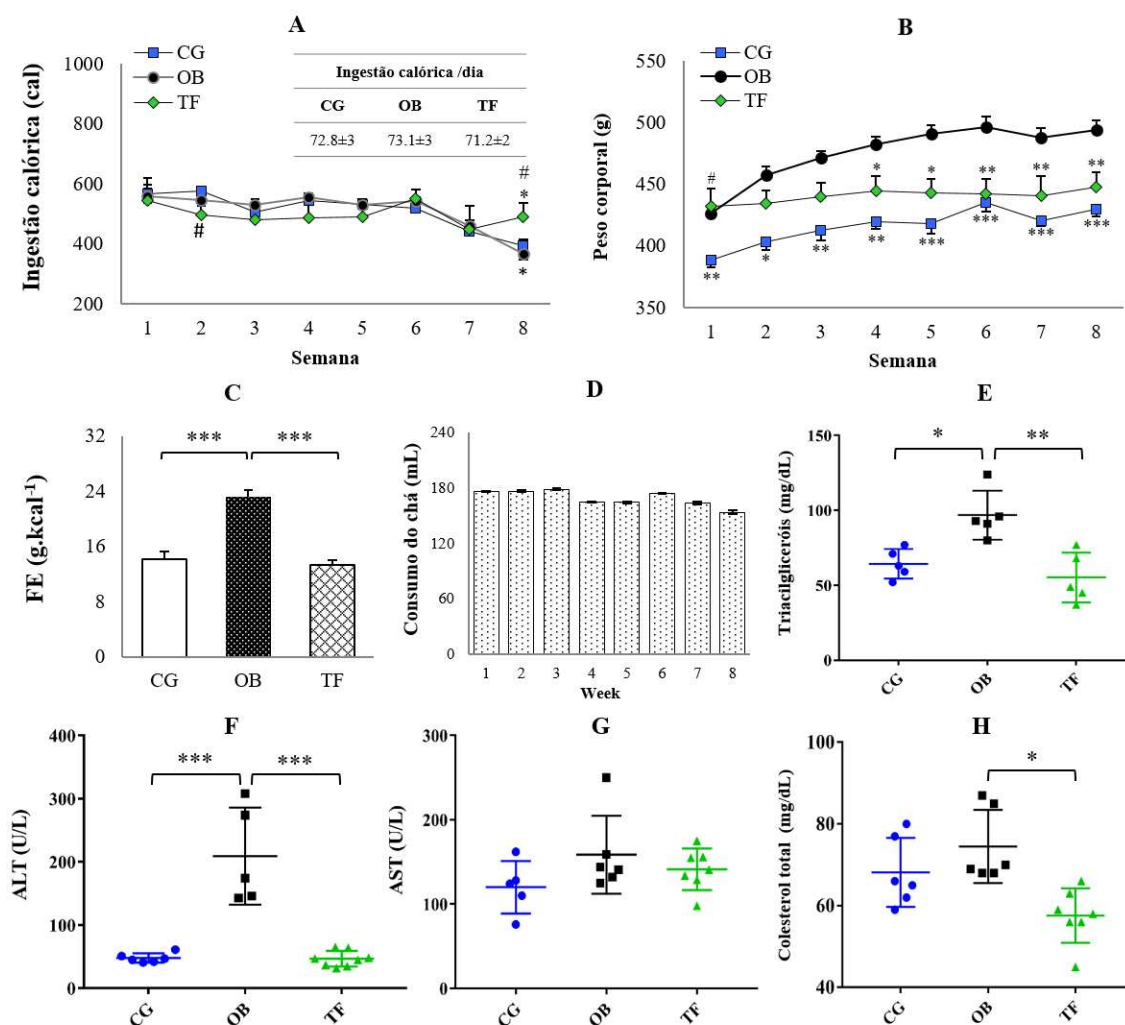
O estudo foi desenhado com uma potência estatística de 80%, e os resultados foram expressos como média e erro padrão (SEM). Para comparar os grupos foi realizada uma análise de variância (ANOVA) paramétrica unidirecional seguida do post hoc de Tukey. A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, CA). Os resultados com um  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

### 3. Resultados

#### 3.1. Efeitos do chá de folhas de manga no peso corporal e parâmetros séricos

Não foram observadas diferenças estatísticas no consumo calórico entre os grupos obeso (OB) e tratado (TF) até a oitava semana de tratamento, semana na qual houve um aumento no grupo TF. No entanto, a ingestão de calorias não diferiu quando comparada entre os dias do tratamento. Esta ingestão similar de calorias garante que os efeitos observados no estudo não sejam associados à variação da ingestão alimentar (Fig. 1A). Após a terceira semana, o chá de folhas de manga inibiu o ganho de peso. Este efeito foi acompanhado pelos valores significativamente elevados da eficiência alimentar no grupo TF (Fig. 1B e C). O consumo de chá foi  $169 \pm 1$  mL/semana (25 mL/dia) e não foi diferente durante as 8 semanas de tratamento (Fig. 1D).

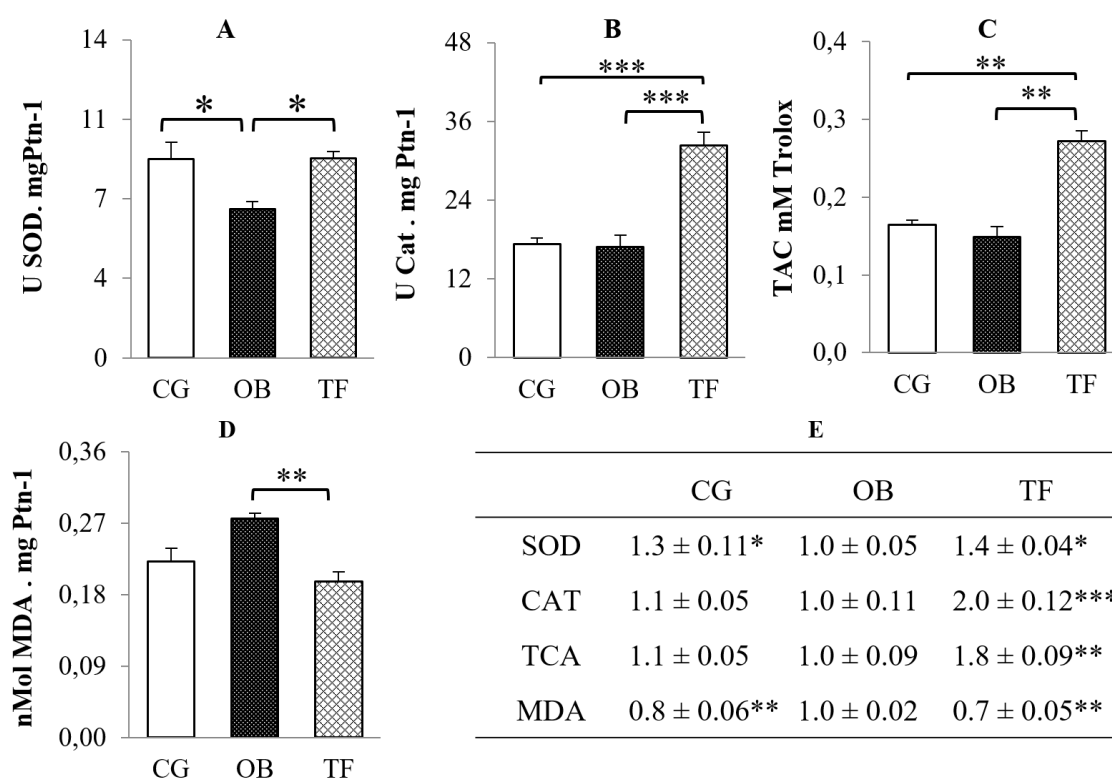
Os níveis séricos de triacilgliceróis e alanina aminotransferase (ALT) foram significativamente altos no grupo OB quando comparado com os grupos controle (CG) e TF. Não foram observadas diferenças no aspartato aminotransferase (AST) entre os grupos. O colesterol total foi estatisticamente menor nos grupos CG e TF comparados com o grupo OB (Fig. E-H).



**Figura 1.** (A) Ingestão calórica semanal e diária, (B) peso corporal (C) eficiência alimentar  $FE = [\text{ganho de peso corporal (g)} / \text{ingestão calórica (kcal)}] \times 1000$ , e (D) consumo do chá, dos animais experimentais. Concentrações séricas de (E) Triacilgliceróis, (F) alanina aminotransferase, (G) aspartato aminotransferase, e (H) Colesterol total. Os valores representam a média e SEM (n=8). Os dados foram analisados usando ANOVA seguida do post hoc Tukey. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  indicaram diferenças em relação ao grupo OB; # $P < 0.05$  TF versus CG. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). Não foram observadas diferenças no consumo do chá entre as oito semanas de tratamento.

### 3.2. Efeitos do chá de folhas de manga no estresse oxidativo

Foram avaliados SOD, CAT, MDA e TAC para estudar os efeitos do chá de folhas de manga nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo. Foram observadas baixas concentrações de SOD no grupo OB, enquanto que CAT e TCA não foram alteradas pela dieta HFD. O chá de folhas de manga estimulou as concentrações de CAT ( $32.4 \pm 1.9$  U CAT  $\cdot \text{mg Ptn}^{-1}$ ) e TAC ( $0.27 \pm 0.01$  mM Trolox), quase duplicando os valores dos grupos OB e CG (Fig. 2A-C and E). A HFD aumentou a formação dos produtos da peroxidação lipídica (MDA), em resposta ao estresse oxidativo. Interessantemente, foram observados baixos valores na formação de MDA nos animais tratados (Fig. 2D).



**Figura. 2.** Parâmetros do estresse oxidativo no fígado dos ratos experimentais após oito semanas de tratamento. (A) superóxido dismutase, (B) catalase, (C) atividade antioxidante total, (D) malondialdeído, (E) resultados expressados como “Fold change” dos valores em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). Os dados foram analisados usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF).

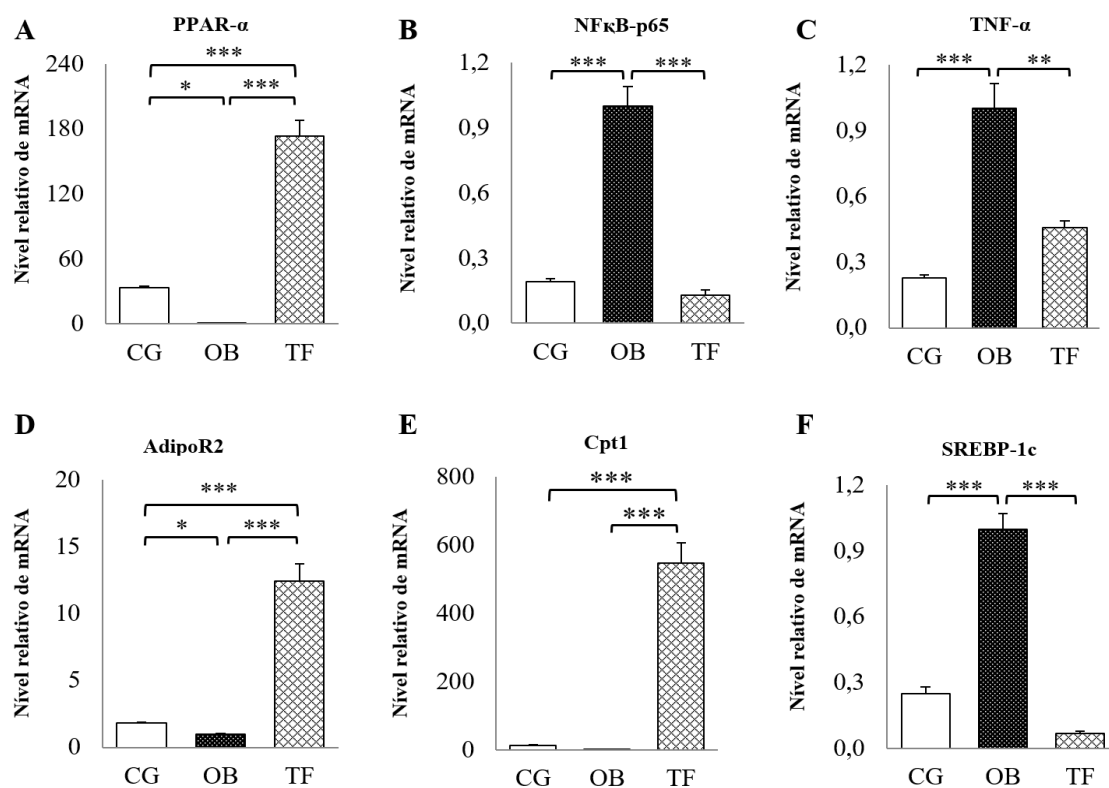
### 3.3. O chá de folhas de manga nos genes e na concentração de proteínas

Após oito semanas de tratamento, o chá de folhas de manga aumentou 225 vezes os níveis de mRNA de PPAR- $\alpha$  e atenuou os genes pro-inflamatórios NF- $\kappa$ B p65 e TNF- $\alpha$ . Além disso, a bebida também levou à regulação positiva (12 vezes) do receptor de adiponectina (AdipoR2) e aumentou a expressão da carnitina-palmitoil transferase (Cpt1), marcador envolvido na regulação da  $\beta$ -oxidação. O chá também inibiu o aumento da expressão de NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$  e SREBP1c ocasionado pela HFD (Fig. 3B-F).

Foram analisadas as proteínas séricas adiponectina e resistina para avaliar o efeito do chá de folhas de manga no excesso de adiposidade e perda de peso dos ratos. A HFD teve efeitos negativos nessas variáveis. No entanto, os resultados demonstraram que esta bebida aumentou significativamente os níveis de adiponectina e reduziu a resistina. A correlação entre estas proteínas confirmou este efeito. Não foram observadas diferenças entre os grupos CG e TF, em ambas as concentrações de proteínas (Fig. 4A-C).

De acordo com os resultados na expressão de mRNA, o tratamento com o chá de folhas de manga estimulou a transcrição da proteína PPAR- $\alpha$  (Fig. 4D). Não foram observadas diferenças na expressão das proteínas do NF- $\kappa$ B p65 entre os grupos OB e

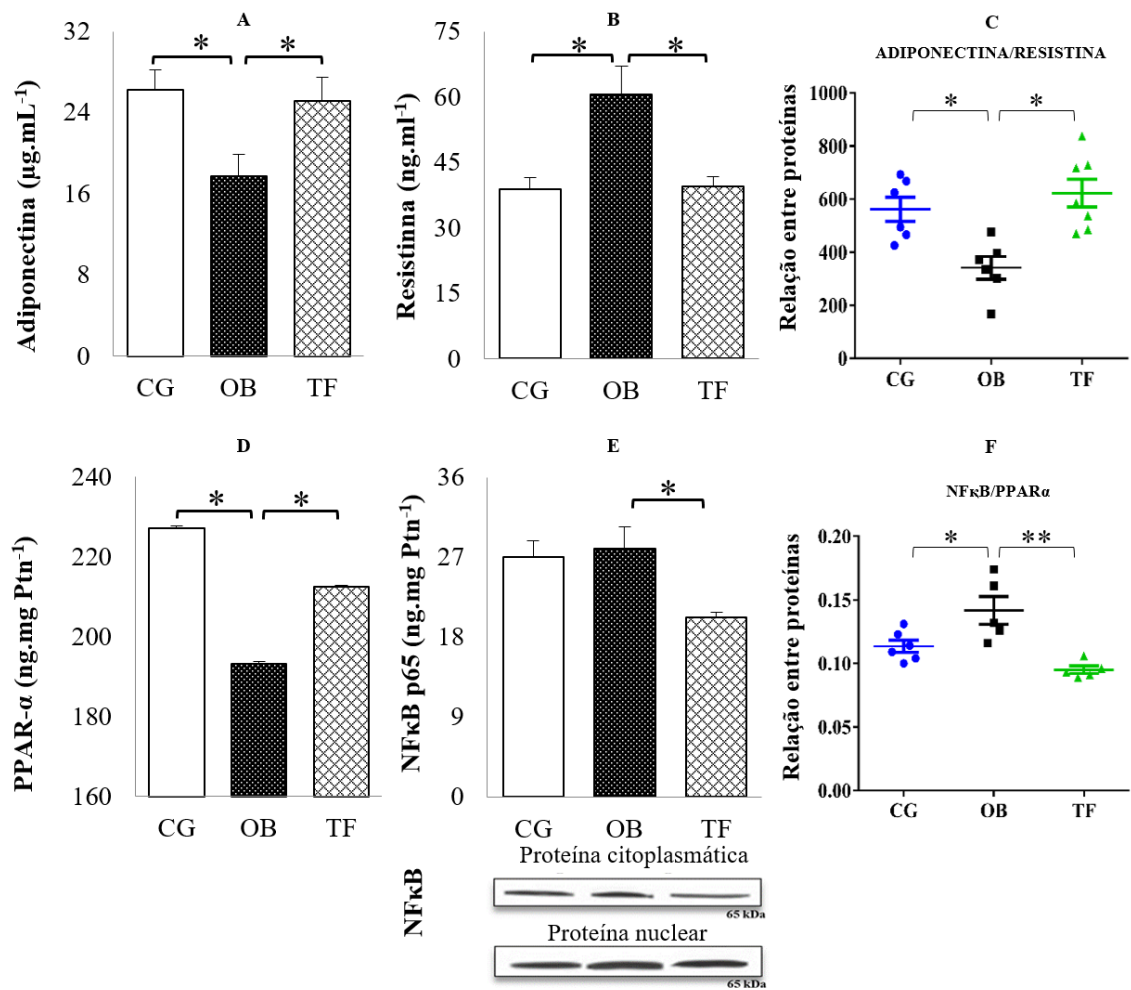
CG. No entanto, a correlação entre o NF- $\kappa$ B p65 e o PPAR- $\alpha$ , indicou um predomínio do NF- $\kappa$ B no grupo OB, quando comparado ao grupo CG (Fig. 4C).



**Figura. 3.** Efeitos do chá de folhas de manga na expressão dos marcadores regulatórios da inflamação e o estresse oxidativo no fígado dos ratos experimentais, após as oito semanas de tratamento. Níveis de mRNA de (A) receptor ativado por proliferador de peroxissoma  $\alpha$ , (B) fator nuclear kappa B p65, (C) fator de necrose tumoral  $\alpha$ , (D) receptor de adiponectina II, (E) carnitina palmitoil-transferase I, (F) proteína de união a elementos regulatórios de esteróis 1c. Os resultados foram calculados usando o método de expressão relativa (GAPDH como endógeno) e normalizados em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). Os dados foram analisados usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF).

### 3.4. Interação do PPAR- $\alpha$ e a mangiferina

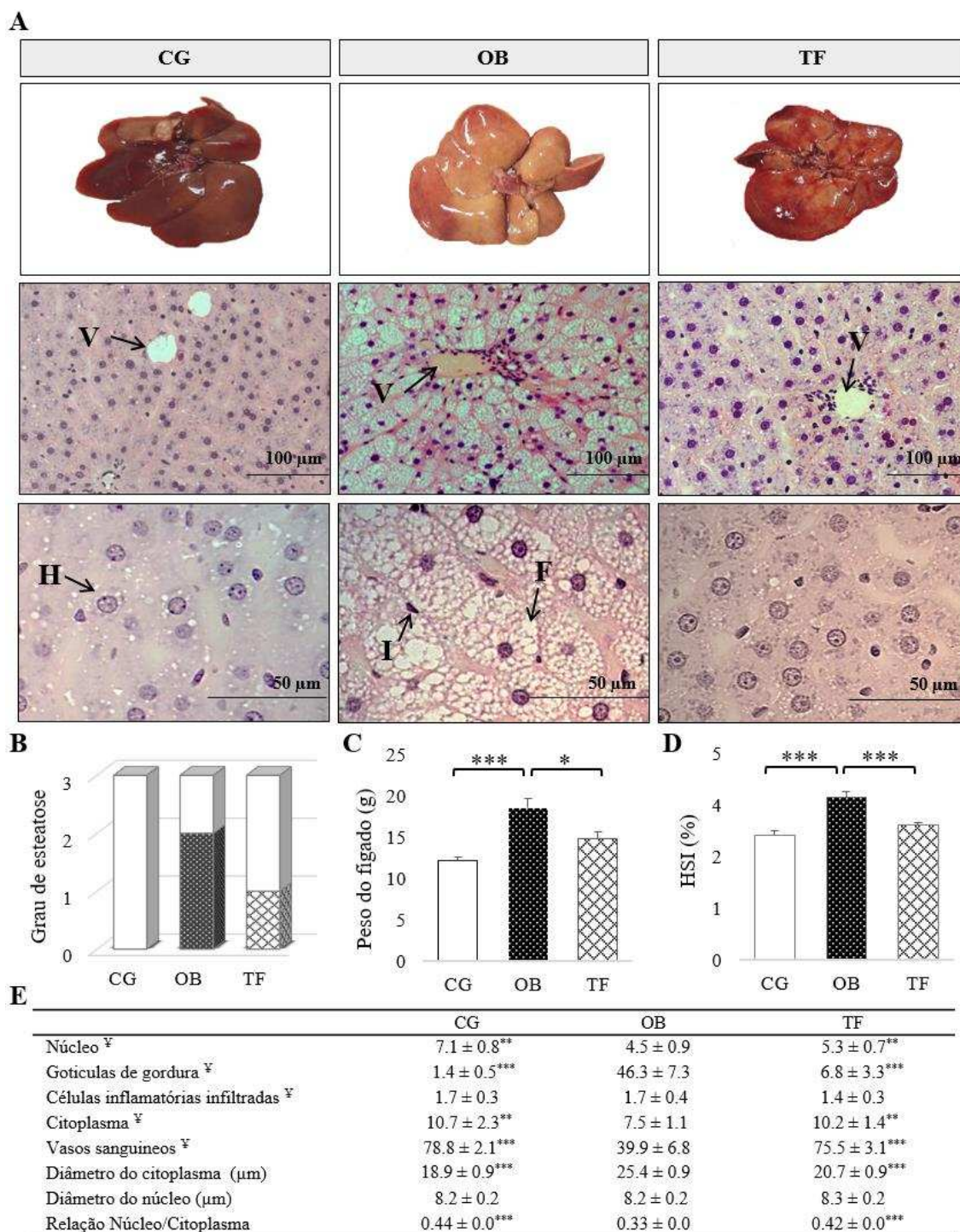
O acoplamento entre a mangiferina e o receptor PPAR- $\alpha$ <sup>26</sup> foi realizado e apresentado com um valor energético (GScore) de -10.286 kcal.mol<sup>-1</sup>. Esta interação ocorreu principalmente por 7 ligações de hidrogênio com os seguintes resíduos de aminoácidos do receptor de PPAR- $\alpha$ : Asn219 (duas interações), Ser280, Glu282, Thr283, Tyr314 e Hle440, e em adição 322 interações hidrofóbicas favoráveis (forças de Van der Waals).



**Figura. 4.** Efeitos do chá de folhas de manga nas concentrações de proteínas nos ratos experimentais após as oito semanas de tratamento. Proteínas séricas de (A) adiponectina, (B) resistina, e (C) relação entre os valores de adiponectina y resistina. Proteína nuclear hepática de (D) PPAR- $\alpha$ , (E) NF- $\kappa$ B p65 e blots de gel representativos para os níveis de proteína nuclear e citoplasmática do NF- $\kappa$ B p65, usando a análise de Western blot; e (F) relação entre os valores de proteína de NF- $\kappa$ B p65/PPAR- $\alpha$ . Os valores representam a média e SEM (n=8). Os dados foram analisados usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF).

Foi realizada uma validação dos acoplamentos moleculares no alinhamento obtido com um valor de RMSD de 0.119 Å. (PDB code: 3G8I). As principais interações demonstraram um valor elevado de afinidade, podendo levar à atividade agonista do receptor (Fig. 5). A Figura 5 ilustra o resultado do acoplamento molecular no formato 2D da mangiferina com os aminoácidos do PPAR- $\alpha$ , e a Figura 5B ilustra os melhores encaixes no componente avaliado.





**Figura 6.** (A) Histologia do tecido hepático dos ratos experimentais, após oito semanas de tratamento (H, hepatócito; V, veia hepática; I, células inflamatórias infiltradas; F, gotículas de gordura); (B) grau de esteatose; (C) peso do fígado; (D) índice hepatossômico (HSI (%)) = [(peso do fígado/peso corporal final do animal) x 100], e (E) parâmetros morfométricos no fígado (<sup>Y</sup> porcentagem pela área total de 52900 μm<sup>2</sup>). Os valores são expressos como média ± SEM (n=8). As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF).

Baseando-se nos valores previamente publicados <sup>14</sup>, podemos estabelecer que os animais tratados consumiram  $121.2 \pm 4.7$  mg de mangiferina e  $269.5 \pm 6.7$  mg EGA de fenólicos totais por semana. Alguns estudos reportaram que a mangiferina reduz o acúmulo de lipídeos mediante a ativação da via do AMPK, previne a esteatose hepática regulando a transcrição de proteínas hepáticas, reduz a toxicidade hepática induzida por dieta HFD e diminui a inflamação reduzindo a ativação da JNK no plasma e fígado de modelos animais de obesidade <sup>28-33</sup>. Fenólicos também tiveram efeitos positivos na obesidade e suas alterações via mecanismos de sinalização, em modelos animais e humanos <sup>34</sup>.

Como esperado, a ingestão de HFD aumentou o acúmulo de células de gordura, alterando a regulação do peso corporal e o metabolismo de ácidos graxos. Mesmo sendo a ingestão calórica similar nos três grupos, o chá de folhas de manga inibiu o ganho de peso demonstrando um efeito preventivo.

Os elevados valores de AST e ALT foram um indicativo da lesão hepatocelular. Essas enzimas são biomarcadores importantes da doença hepática não alcoólica (NAFLD), e portanto da esteatose hepática. Similarmente, o nível elevado de triacilgliceróis é associado ao incremento dos ácidos graxos no fígado, levando à esteatose hepática <sup>3; 35</sup>. O consumo elevado de gordura altera a homeostase do colesterol e a biossíntese de ácidos biliares, os quais desempenham um papel importante na absorção intestinal do colesterol e dos ácidos graxos. Assim uma concentração elevada no colesterol sérico ou plasmático reflete uma maior absorção intestinal do mesmo <sup>36; 37</sup>. Os valores baixos de colesterol nos animais tratados, sugerem que o chá de folhas de manga pode reduzir a absorção intestinal do colesterol diminuindo o colesterol livre no corpo. Por outro lado, esta bebida também diminuiu as concentrações séricas de triacilgliceróis, ALT e colesterol total, indicando que promove as alterações positivas na lesão hepática causada pela HFD. Um estudo demonstrou que o chá de folhas de manga diminui as concentrações de triacilgliceróis e colesterol total, e melhora o metabolismo de lipídeos no modelo animal <sup>38</sup>.

No modelo de estresse oxidativo, há um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando um desequilíbrio entre as espécies antioxidantes e oxidantes, resultando na inflamação e na degradação celular <sup>39; 40</sup>. A superóxido dismutase e a catalase são enzimas com alta atividade antioxidante, as quais são usadas como marcadores do estresse oxidativo e reduzem o acúmulo de células de gordura. Como a HFD estimula a formação de ROS, essas enzimas aumentam sua atividade em resposta a um processo adaptativo para proteger os tecidos. No entanto, esta adaptação é deficiente quando uma formação elevada de ROS sobrecarrega o sistema de defesa antioxidante e portanto, a quantidade de enzimas antioxidantes não é suficiente para regular as espécies oxidantes e antioxidantes <sup>2; 41</sup>. Curiosamente, observamos uma redução da SOD mas não alteração da CAT no grupo obeso, e um aumento da CAT e da capacidade antioxidante total no grupo tratado. A ativação da CAT como sistema de defesa antioxidante para o controle da homeostase redox, poderia ter sido responsável pelo incremento da CAT no grupo OB. Isto indica que o chá de folhas de manga pode diminuir o nível de formação

de ROS pela estimulação das enzimas superóxido dismutase e catalase, sem esquecer a redução da peroxidação lipídica.

O AdipoR2 atua como mediador da adiponectina ativando várias moléculas, incluindo as da via do PPAR- $\alpha$  <sup>42; 43; 44</sup>. Alguns autores reportaram que a regulação positiva do PPAR- $\alpha$  melhora o metabolismo dos lipídeos, a inflamação, e o estresse oxidativo em ratos obesos <sup>9; 45; 46</sup>. Uma modulação negativa do AdipoR2 e o PPAR- $\alpha$  está associada à esteatose hepática <sup>47</sup>. Neste estudo, encontramos que a HFD diminui a expressão de AdipoR2 e PPAR- $\alpha$ , ao passo que o chá de folhas de manga estimula a expressão desses genes, atenuando a esteatohepatite. Além disso, o chá de folhas de manga aumentou a expressão do Cpt1, enzima fortemente envolvida na oxidação de ácidos graxos e da  $\beta$ -oxidação <sup>48; 49</sup>. Por outro lado, o SREBP1c, o maior fator de transcrição que contribui com a síntese de lipídeos, foi super expresso no fígado de ratos obesos <sup>50</sup>. Também observamos que a expressão do Cpt1 poderia ser responsável por melhorar a toxicidade lipídica induzida pela dieta via  $\beta$ -oxidação, e poderia ter diminuído a percentagem de gotículas de gordura e regular o SREBP1c no fígado do grupo tratado.

O TNF- $\alpha$  é um mediador das respostas inflamatórias, exercendo efeitos pleitrópicos sobre várias células e mediando grande variedade de atividades biológicas, incluindo a ativação da via do NF- $\kappa$ B <sup>51</sup>. A ativação do NF- $\kappa$ B desempenha um papel importante em inúmeros processos biológicos, tais como a inflamação, respostas ao estresse, diferenciação celular e morte celular programada. Neste estudo, a HFD aumentou os níveis do acúmulo de células de gordura levando à formação das ROS, gerando estresse oxidativo e portanto ativando a via do NF- $\kappa$ B. Nossos resultados demonstram que os baixos valores de MDA podem ser um indicativo da diminuição de ROS, podendo ser associada à regulação negativa do NF- $\kappa$ B p65 e à regulação positiva do PPAR- $\alpha$ . Isto sugere que o chá de folhas de manga inibe a peroxidação lipídica e os genes pró-inflamatórios, pela modulação da expressão do TNF- $\alpha$  e o NF- $\kappa$ B <sup>52; 53; 54</sup>.

Níveis elevados de adiponectina afetam positivamente o metabolismo da glicose, a  $\beta$ -oxidação e a perda de peso corporal, e aumenta a atividade anti-inflamatória. Autores relataram que esta proteína também suprime a expressão do SREBP1c e previne a esteatose hepática em ratos. Nós sugerimos que o elevado nível de adiponectina observado no grupo tratado, poderia estar associado à elevada expressão de AdipoR2 e Cpt1, à supressão do ganho de peso corporal dos animais, e a inibição do SREBP1c <sup>55; 56</sup>. A resistina se expressa no tecido adiposo, interfere na atividade da insulina, e foi sugerido que seu aumento ou redução é diretamente proporcional ao acúmulo de lipídeos <sup>57; 58; 59</sup>. Interessantemente, temos encontrado que o chá de folhas de manga reduziu a concentração sérica de resistina até o ponto de não diferir do grupo não obeso. Um estudo recente sugeriu que o chá de folhas da manga melhora o metabolismo da glicose e a função das células  $\beta$ , estimulando a ingestão de glicose num intervalo de 30–120 min, e a secreção de insulina <sup>18</sup>.

Os níveis de expressão de proteínas sugeriram que o chá de folhas de manga estimula a transcrição do PPAR- $\alpha$ , o qual interage com o fator NF- $\kappa$ B p65 promovendo sua regulação negativa. Isto é devido a que o PPAR- $\alpha$  atua como um antagonista do processo

transcricional de marcadores pro-inflamatórios associados à obesidade, prevenindo o acúmulo de gordura, estimulando a oxidação de ácidos graxos e melhorando a homeostase de lipídeos<sup>8;60</sup>. Nossos resultados sugerem que o chá de folhas de manga exerce um efeito anti-inflamatório melhorando a homeostase hepática, pela modulação do NF-κB e a ativação do PPAR-α.

Os estudos da docagem molecular foram realizados com a finalidade de verificar um perfil agonista provável da mangiferina sobre o PPAR-α. Os resultados mostraram uma boa afinidade, com valores de energia (Gscore) correspondentes a -10.286 kcal.mol<sup>-1</sup>. A estrutura química da mangiferina apresentou vários grupos funcionais com possíveis interações de ligações de hidrogênio. Os resultados do acoplamento indicaram 7 interações, assim como 322 contatos por forças de Van der Waals em regiões hidrofóbicas da mangiferina, confirmando o efeito agonista da mangiferina no PPAR-α. Assim, nosso estudo sugere que o chá de folhas de manga tem atividade agonista sobre o receptor do PPAR-α.

A análise morfométrica do fígado dos animais demonstrou que a HFD aumenta o tamanho do citoplasma dos hepatócitos e leva ao deslocamento do núcleo. Evidentemente, o tamanho do citoplasma foi devido ao acúmulo de gotículas de gordura e à toxicidade lipídica causada pela ingestão elevada de gordura na dieta. Este efeito foi confirmado pela relação núcleo-plasmática encontrada. A porcentagem de hepatócitos afetados (46%) no grupo obeso, foi um indicativo do grau de esteatose hepática<sup>27</sup>. Esta condição foi revertida pelo chá de folhas de manga, uma vez que os animais apresentaram um grau de esteatose hepática 1 (6.8% de gordura hepática), e não deferiu estatisticamente do grupo controle não obeso. O índice hepatossomático é um indicador da energia de reserva no fígado e da hepatomegalia<sup>61</sup>. Em comparação ao grupo obeso, os ratos tratados com o chá de folhas de manga apresentaram valores baixos no índice hepatossomático, o qual pode ser associado à elevada redução de gotículas de gordura e lipídeos no fígado. O PPAR-α foi associado com o metabolismo dos lipídeos, aumentando a oxidação de ácidos graxos e diminuindo o acúmulo de gotículas de gordura no fígado<sup>62</sup>. A ausência da hepatomegalia no grupo tratado poderia ser devida aos elevados níveis de PPAR-α<sup>63</sup>. Uma vez que o tratamento com o chá de folhas de manga melhora o peso corporal, diminui marcadores relacionados ao estresse oxidativo e leva à reduzir o acúmulo de lipídeos, é possível afirmar que a bebida tem efeitos positivos nos parâmetros histológicos e histomorfométricos no fígado de ratos com obesidade induzida.

Os animais tratados com o chá de folhas de manga ingeriram aproximadamente 18 mg de mangiferina por dia, para obter os efeitos descritos anteriormente (25 mL do chá/dia). Extrapolando essa dose aos humanos, e considerando um adulto com peso corporal de 60 kg, este valor corresponde a 2.9 mg.Kg<sup>-1</sup> ao dia, que são equivalentes a 240 mL da bebida<sup>64</sup>.

Este estudo demonstrou que o chá de folhas de manga tem efeito anti-inflamatório, modulando o NF-κB p65 e aumentando a expressão de mRNA de AdipoR2, PPAR-α e Cpt1 no fígado. Além disso, a bebida é capaz de inibir a lipogênese e a peroxidação lipídica, melhorando o estresse oxidativo e a esteatose hepática em ratos obesos.

Adicionalmente, a mangiferina, principal composto bioativo do chá de folhas de manga, pode ser responsável por induzir marcadores anti-inflamatórios. Em conclusão, o chá de folhas de manga tem potencial efeito hepatoprotetor na obesidade induzida por dieta HFD em ratos.

## Referências

- <sup>1</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**: WHO 2018.
- <sup>2</sup> FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.
- <sup>3</sup> KOO, S.-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. **Clinical and molecular hepatology**, v. 19, n. 3, p. 210-215, 2013. ISSN 2287-2728, 2287-285X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3796672/>>.
- <sup>4</sup> FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-89, 2010.
- <sup>5</sup> VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813-839, 2007. ISSN 1463-1326.
- <sup>6</sup> LEE, J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 2, p. 208-222, 2013. ISSN 0253-6269.
- <sup>7</sup> ASGHAR, A.; SHEIKH, N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. **Cellular Immunology**, 2017. ISSN 0008-8749.
- <sup>8</sup> TAILLEUX, A.; WOUTERS, K.; STAELS, B. Roles of PPARs in NAFLD: Potential therapeutic targets. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 5, p. 809-818, 2012. ISSN 1388-1981. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198111002204>>.
- <sup>9</sup> PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-

- alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 720-733, 3// 2015. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016882781400806X> >.
- <sup>10</sup> JOBUI, K. et al. Effects of Goishi tea on diet-induced obesity in mice. **Food Research International, Elsevier**, v. 54, p. 324-329, 2013.
- <sup>11</sup> HAE-IN LEE et al. Anti-visceral obesity and antioxidant effects of powdered sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf tea in diet-induced obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2370–2376, 2011.
- <sup>12</sup> MOREIRA, M. E. D. C. et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 143-153, 2// 2017. ISSN 1756-4646. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616303395> >.
- <sup>13</sup> CHAKRABARTI, R. Pharmacotherapy of obesity: Emerging drugs and targets. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, p. 195-207, 2009.
- <sup>14</sup> MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Extraction of Mangiferin and Chemical Characterization and Sensorial Analysis of Teas from *Mangifera indica* L. Leaves of the Ubá Variety. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 33, 2016. ISSN 2306-5710. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2306-5710/2/4/33> >.
- <sup>15</sup> RIBEIRO, S. M. R.; SCHIEBER, A. Chapter 34 - Bioactive Compounds in Mango (*Mangifera indica* L.). In: PREEDY, R. R. W. R. (Ed.). **Bioactive Foods in Promoting Health**. San Diego: Academic Press, 2010. p.507-523. ISBN 978-0-12-374628-3.
- <sup>16</sup> RIBEIRO, S. M. R. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 620-626, 10/1/ 2008. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608002367> >.
- <sup>17</sup> CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615, 2012. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/7/8615> >.
- <sup>18</sup> MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Anti-obesity effects of tea from *Mangifera indica* L. leaves of the Ubá variety in high-fat diet-induced obese rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, n. Supplement C, p. 938-945, 2017/07/01/ 2017. ISSN

- 0753-3322. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217312179> >.
- <sup>19</sup> RESEARCH-DIETS®. Open formula purified diets for lab animals – D12079B. OPEN SOURCE DIETS., 2006.
- <sup>20</sup> BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976/05/07 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273> >.
- <sup>21</sup> MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 16 1974. ISSN 0014-2956 (Print), 0014-2956.
- <sup>22</sup> GÓTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, v. 196, n. 2, p. 143-151, 1991/02/15 1991. ISSN 0009-8981. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000989819190067M> >.
- <sup>23</sup> AEIB, H. Catalase in vivo. **Methods of Enzimology**, n. 105, p. 11-127, 1984.
- <sup>24</sup> BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879 (Print), 0076-6879.
- <sup>25</sup> KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**., v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.
- <sup>26</sup> BÉNARDEAU, A. et al. Aleglitazar, a new, potent, and balanced dual PPAR $\alpha/\gamma$  agonist for the treatment of type II diabetes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 9, p. 2468-2473, 5/1/ 2009. ISSN 0960-894X. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X09003576> >.
- <sup>27</sup> KLEINER, D. E. et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005. Disponível em: <  
<https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hep.20701> >.

- 28 LIM, J. et al. Dual Mode Action of Mangiferin in Mouse Liver under High Fat Diet. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90137, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0090137> >.
- 29 NIU, Y. et al. Mangiferin Decreases Plasma Free Fatty Acids through Promoting Its Catabolism in Liver by Activation of AMPK. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30782, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0030782> >.
- 30 BENARD, O.; CHI, Y. Medicinal properties of mangiferin, structural features, derivative synthesis, pharmacokinetics and biological activities. **Mini Rev Med Chem**, v. 15, n. 7, p. 582-94, 2015. ISSN 1389-5575.
- 31 BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 12, n. 1, p. 141-179, 1994. ISSN 0732-0582.
- 32 STEYERS, C. M.; MILLER, F. J. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 11324-11349, 2014.
- 33 LIU, Y.-W. et al. Up-regulation of glyoxalase 1 by mangiferin prevents diabetic nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 721, n. 1-3, p. 355-364, 12/5/ 2013. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299913006389> >.
- 34 HSU, C. L.; YEN, G. C. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 1, p. 53-61, 2008. ISSN 1613-4133.
- 35 WEDEMEYER, H. et al. ALT screening for chronic liver diseases: Scrutinizing the evidence. **Zeitschrift fur Gastroenterologie**, v. 48, n. 1, p. 46-55, 2010. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-76549096343&partnerID=40&md5=105865e4a73262535ca2b559728cd37e> >.
- 36 COLLINS, T. et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 10, p. 899-909, 1995. ISSN 0892-6638.
- 37 MESTAS, J.; LEY, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 18, n. 6, p. 228-232, 2008. ISSN 1050-1738.

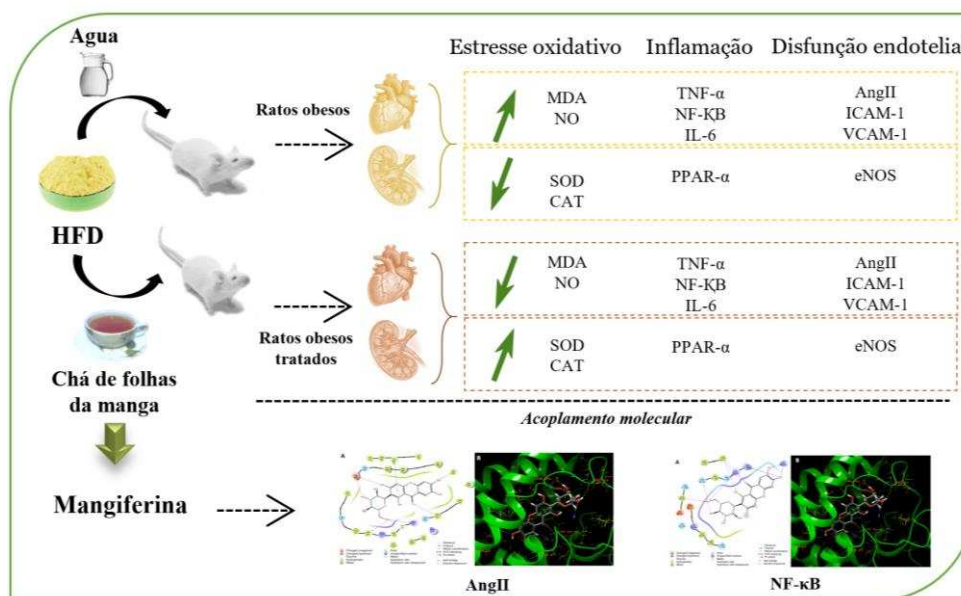
- 38 ZHANG, Y. et al. Regulation of lipid and glucose homeostasis by mango tree leaf extract is mediated by AMPK and PI3K/AKT signaling pathways. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2896–2905, 2013.
- 39 RADAK, Z. et al. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 10, p. 1208-1246, 2013. ISSN 1523-0864.
- 40 BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 6// 2011. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693410001392> >.
- 41 MATSUDA, M.; SHIMOMURA, L. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, p. e330-e341, 2013.
- 42 DEEPA, S. S.; DONG, L. Q. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 1, p. E22-E36, 2009. ISSN 0193-1849.
- 43 SMOLINSKA, N. et al. Expression of adiponectin and adiponectin receptors 1 (AdipoR1) and 2 (AdipoR2) in the porcine uterus during the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 1–2, p. 42-54, 4// 2014. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432014000414> >.
- 44 KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 3, p. 439-451, 2005. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/er.2005-0005> >.
- 45 NOMAGUCHI, K. et al. Aloe vera phytosterols act as ligands for PPAR and improve the expression levels of PPAR target genes in the livers of mice with diet-induced obesity. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 5, n. 3, p. e190-e201, 7// 2011. ISSN 1871-403X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871403X11000044> >. Acesso em: 2011/9//.

- 46 PARK, H. et al. Chokeberry attenuates the expression of genes related to de novo lipogenesis in the hepatocytes of mice with nonalcoholic fatty liver disease. **Nutrition Research**, v. 36, n. 1, p. 57-64, 1// 2016. ISSN 0271-5317. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531715002675> >.
- 47 PENG, Y. et al. Downregulation of Adiponectin/AdipoR2 is Associated with Steatohepatitis in Obese Mice. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 13, n. 11, p. 2043, 2009// 2009. ISSN 1873-4626. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11605-009-1032-2> >.
- 48 SERRA, D. et al. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 3, p. 269-284, 2013. ISSN 1523-0864.
- 49 MCGARRY, J. D.; BROWN, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. **Eur J Biochem**, v. 244, n. 1, p. 1-14, Feb 15 1997. ISSN 0014-2956 (Print), 0014-2956.
- 50 EBERLÉ, D. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839-848, 2004/11/01/ 2004. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908404001658> >.
- 51 ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 909-950, 2014. ISSN 0031-9333.
- 52 MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFkappaB system. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 8, n. 3, p. 227-41, May 2016. ISSN 1939-005x.
- 53 NAKANO, H. et al. Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-κB and JNK. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 730-737, 2006. ISSN 1350-9047.
- 54 MORGAN, M. J.; LIU, Z.-G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 103-115, 2011. ISSN 1001-0602.
- 55 AWAZAWA, M. et al. Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 382, n. 1, p. 51-6, Apr 24 2009. ISSN 0006-291x.

- <sup>56</sup> FUKUSHIMA, J. et al. Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. **Hepatol Res**, v. 39, n. 7, p. 724-38, Jul 2009. ISSN 1386-6346 (Print), 1386-6346.
- <sup>57</sup> STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307-312, 2001. ISSN 0028-0836.
- <sup>58</sup> MCTERNAN, P. G.; KUSMINSKI, C. M.; KUMAR, S. Resistin. **Current Opinion in Lipidology**, v. 17, n. 2, p. 170-175, 2006. ISSN 0957-9672. Disponível em: < <http://journals.lww.com/co-lipidology/Fulltext/2006/04000/Resistin.11.aspx> >.
- <sup>59</sup> KUSMINSKI, CHRISTINE M.; MCTERNAN, PHILIP G.; KUMAR, S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. **Clinical Science**, v. 109, n. 3, p. 243-256, 2005.
- <sup>60</sup> LEFEBVRE, P. et al. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. **J Clin Invest**, v. 116, n. 3, p. 571-80, Mar 2006. ISSN 0021-9738 (Print), 0021-9738.
- <sup>61</sup> SUCHY, F. J. Chapter 18 - Hepatomegaly A2 - by, Edited. In: KLIEGMAN, R. M.; GREENBAUM, L. A., et al (Ed.). **Practical Strategies in Pediatric Diagnosis and Therapy (Second Edition)**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. p.333-344. ISBN 978-0-7216-9131-2.
- <sup>62</sup> GRYGIEL-GÓRNIAK, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, p. 17, February 14 2014. ISSN 1475-2891. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-17> >.
- <sup>63</sup> YE, J.-M. et al. PPAR $\alpha/\gamma$  ragaglitazar eliminates fatty liver and enhances insulin action in fat-fed rats in the absence of hepatomegaly. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 284, n. 3, p. E531-E540, 2003.
- <sup>64</sup> REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **Faseb j**, v. 22, n. 3, p. 659-61, Mar 2008. ISSN 0892-6638.

## CAPÍTULO 3

### Chá de folhas de manga modula o estresse oxidativo, a inflamação e a disfunção endotelial em ratos obesos



#### Resumo

O acúmulo excessivo de gordura na obesidade gera um conjunto de alterações metabólicas como a inflamação crônica e a disfunção endotelial. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do chá de folhas de manga (variedade Ubá) nos marcadores moleculares associados ao estresse oxidativo, à inflamação crônica e à disfunção endotelial em ratos obesos. O estudo foi conduzido em três grupos de ratos Wistar (n=8): controle não obeso (CG), controle obeso (OB) e grupo obeso tratado com 50 mL do chá de folhas de manga (TF), durante 8 semanas. Ao final, foram coletados o coração e o rim direito. Adicionalmente, foi realizado um estudo de acoplamento molecular para avaliar a afinidade entre a mangiferina, principal composto ativo do chá de folhas de manga, e a AngII e o NF- $\kappa$ B. Após as oito semanas de tratamento, o chá de folhas de manga aumentou as enzimas antioxidantes SOD e CAT, e inibiu a formação dos produtos da peroxidação lipídica, regulando o MDA e o NO. Também a bebida suprimiu a expressão de TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, AngII, VCAM-1 e ICAM-1 no grupo tratado, e aumentou a eNOS. A mangiferina demonstrou ter efeito antagonista sobre a AngII e o NF- $\kappa$ B. Este estudo sugeriu uma possível modulação positiva do chá de folhas de manga sobre o estresse oxidativo, a inflamação crônica e a disfunção endotelial, no coração e nos rins de ratos obesos.

**Palavras-chave:** Mangifera indica; acoplamento molecular; angiotensina; NF- $\kappa$ B p65 coração e rim; HFD.

## 1. Introdução

A obesidade é uma condição crônica progressiva cuja prevalência tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Até 2016, foi reportado que aproximadamente 13% da população adulta e 6% de crianças no mundo, apresentaram obesidade <sup>1</sup>. O acúmulo excessivo de gordura produzido na obesidade, gera um conjunto de alterações que levam a inibir ou estimular diversos biomarcadores moleculares, desencadeando uma sinalização em cascata como resposta do sistema para se equilibrar. Alterações como a inflamação crônica e a disfunção endotelial têm sido associadas à obesidade <sup>2; 3; 4</sup>.

A inflamação crônica causada pela obesidade está caracterizada pelo aumento na produção de citocinas e macrófagos principalmente, causado pelo desequilíbrio no metabolismo de lipídeos. Neste processo, ocorre um aumento nos marcadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) <sup>5; 6</sup>. Por outro lado, a disfunção endotelial é caracterizada pelo desequilíbrio entre o processo de vasodilatação e vasoconstrição, onde há um incremento na vasoconstrição e na adesão celular endotelial <sup>7</sup>. Esta condição, envolve os marcadores de adesão molecular intercelular ICAM-1 e vascular VCAM-1, e a angiotensina II (AngII).

O consumo excessivo de gordura, pode elevar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais reduzem a produção da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), principal produtor de óxido nítrico (NO), incrementando a adesão molecular mediada por marcadores como a ICAM-1 e VCAM-1. Isto favorece o estado inflamatório vascular, a vasoconstrição, a oxidação, e portanto o desenvolvimento da disfunção endotelial. A concentração dos agentes vasoconstritores como ROS, o íon superóxido e a angiotensina II, é diretamente proporcional à disfunção endotelial <sup>7; 8</sup>. Doenças cardiovasculares como a aterosclerose e a hipertensão, são os principais fatores de risco da disfunção endotelial <sup>9</sup>.

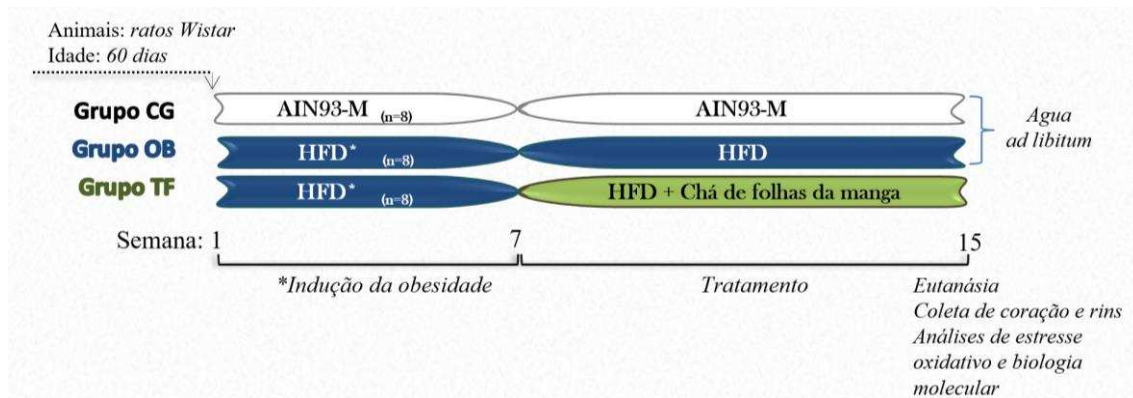
Atualmente, estão sendo desenvolvidos produtos naturais a base de plantas e frutas, como tratamento e redução de risco das doenças mencionadas anteriormente. A manga (*Mangifera indica*), é uma fruta comumente produzida e consumida em países tropicais. Esta fruta é rica em compostos bioativos, principalmente em mangiferina, e tem sido amplamente usada como terapêutico para diversas doenças <sup>10; 11; 12</sup>. As folhas da mangueira, também são ricas em compostos com atividade bioativa, mesmo assim são pouco utilizadas. Estudos recentes reportaram que o chá de folhas de manga contém mangiferina, compostos fenólicos, que apresentam elevada atividade de retirada de radical. Também foram relatados seus efeitos anti-obesidade e hepatoprotectores em ratos obesos tratados durante 8 semanas com a bebida <sup>13; 14; 15</sup>. Entretanto, até a data, não foram relatados seus efeitos no coração e nos rins de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD). Adicionalmente, estudos do acoplamento molecular entre a mangiferina e a AngII ou a mangiferina e o NF- $\kappa$ B, também não foram descritos até a data. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do chá de folhas de manga nos marcadores associados ao estresse oxidativo, à inflamação crônica e à disfunção endotelial (devidos à obesidade), em ratos com obesidade induzida por HFD.

## 2. Materiais e metodologia

### 2.1. Preparo do chá e modelo animal

O preparo do chá e o ensaio biológico foram descritos previamente<sup>13; 14</sup>. Segundo o método, foram coletadas folhas novas da *Mangifera indica*, da variedade Ubá, no estado de Minas Gerais, Brasil (certificado de autenticação dos espécimes número VIC37611, depositados no herbário da Universidade Federal de Viçosa). O chá foi preparado na concentração final de 5%, usando 50 g de folhas da manga (lavadas, sanitizadas, secas e moídas) diluídas em 1 L de água potável; a mistura foi aquecida por 5 min (95°C) e posteriormente filtrada (papel filtro Melitta N°4).

Para o ensaio biológico, foram obtidos vinte e quatro ratos machos Wistar entre 90 e 100 g, do Bioterio Central do Centro de Ciências biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa (Brasil) e foram dispostos em condições controladas (temperatura: 22 ± 3 °C; umidade 80%; ciclo claro-escuro de 12/12-h). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa em animais da Universidade Federal de Viçosa (N° 29/2016). O desenho experimental do ensaio biológico está representado na Figura 1. A obesidade foi previamente induzida com dieta hiperlipídica-HFD (20% de proteína, 54% de carboidratos, 21% de gordura, 5% vitaminas e minerais). O chá de folhas de manga foi preparado diariamente e 50 mL foram imediatamente administrados ao grupo tratado, via oral usando bebedouros. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com Isoflurano® 100% (Cristália, SP, Brasil) e eutanasiados por punção cardíaca sendo coletados e congelados (-80°C) o coração e os rins de cada animal.



**Figura - 1.** Representação gráfica do desenho experimental usado no ensaio biológico. CG: grupo alimentado com dieta AIN93-M; OB: grupo alimentado com dieta hiperlipídica (HFD); TF: grupo alimentado com HFD e tratado com 50 mL do chá de folhas de manga.

### 2.2. Análises de estresse oxidativo

Foram determinados a superóxido dismutase (SOD), atividade da catalase (CAT), malondialdeído (MDA) e o óxido nítrico, em homogenatos de coração e rim direito dos animais experimentais (100 mg de tecido em 1 mL de tampão Tris-HCL 10 mM, pH 7.4)

seguindo a mesma metodologia descrita previamente<sup>13</sup>. Para analisar o óxido nítrico (NO), foi utilizado o método de Griess que detecta o íon nitrito em meio ácido<sup>16; 17</sup>. Para a reação, foram misturados 50 µL do homogenato com 100 µL de uma solução 1:1 de Sulfanilamida (1% diluída em ácido fosfórico [2.5%]) e naftil etileno-amida-dihidrocloruro (0.1% diluído em ácido fosfórico [2.5%]). A mistura reagiu por 10 min no escuro, e foi lida a absorvância a 570 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific MultiSkan™ GO). Os resultados foram expressos como nanomol de NO por miligramas de proteína (nmol NO. mg<sup>-1</sup>), usando uma curva padrão de nitrito de sódio variando as concentrações de 5 a 25 µM.

### 2.3. Análise RT-PCR

A expressão dos genes associados à inflamação e à disfunção endotelial, foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) como descrito previamente<sup>13; 14</sup>. O mRNA foi extraído a partir de 100 mg do tecido (rim direito ou coração), usando Trizol (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA). O cDNA foi sintetizado usando o kit M-MLV Reverse transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA). Para a RT-PCR foram misturados 2 µL de cDNA e o SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), seguindo as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos usando o método de expressão relativa e normalizados em relação ao grupo obeso OB. As sequências dos primers são apresentadas na Tabela 1 e foram obtidas usando o software Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

**Tabela. 1.** Oligonucleótidos usados na análise qRT-PCR no coração e rim dos animais experimentais.

Gene alvo	Senso (5´- 3´)	Anti-senso (5´- 3´)
PPAR- $\alpha$	CATTTCTGCTCCACACTATGAA	CGGGAAGGACTTTATGTATGAG
NF- $\kappa$ B p65	CTGCGCGCTGACGGC	TCGTCGTCTGCCATGTTGAA
TNF- $\alpha$	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG
IL-6	ACCTGGAGTTTGTGAAGAACAAC	GGAAGTTGGGGTAGGAAGGA
AngII	CCCATCACCATCTGCATAGC	GTTATCCGAAGGCCGTAAG
eNOS	GCTGAGAGCCTGCAATTA	GGATTTGCTGCTCTGTAGGT
VCAM-1	TCT CTC AGG AAA TGC CAC CC	CAC AGC CAA TAG CAG CAC AC
ICAM-1	AGGTATCCATCCATCCCACA	GCCACAGTTCTCAAAGCACA
GAPDH	AGGTTGTCTCCTGTCACTTC	CTGTTGCTGTAGCCATATTC

PPAR- $\alpha$ , receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa; NF- $\kappa$ B p65, fator nuclear kappa B; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; IL-6, interleucina 6; AngII, receptor de angiotensina II; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; VCAM-1, molécula de adesão celular vascular 1. ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; GAPDH, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

#### 2.4. Concentração de proteínas

Foram extraídas as frações nuclear e citoplasmática do rim direito e do coração de cada animal experimental usando o kit “Nuclear and Cytoplasmic Extraction” (Thermo Scientific™ NE-PER™, Rockford, USA). As proteínas foram quantificadas por ELISA usando os kit Rat PPAR- $\alpha$ , N° E-EL-R0725 e Rat NF- $\kappa$ B p65, N° E-EL-R0674 (Elabscience Biotechnology Co.,Ltd; USA) seguindo as especificações do fabricante.

#### 2.5. Acoplamento molecular

Todas as aplicações de bioinformática foram realizadas usando o software OpenSUS Tumbleweed. As estruturas dos ligantes à mangiferina foram construídas usando o software Maestro 10.2.010 (Schrödinger Release 2015-2: Maestro, version 10.2.010, LLC, New York, NY, USA). Tais estruturas foram: Olmersartan (ligante usado para a análise redock com o receptor de angiotensina II) e vermelho de bromopirogalol (ligante usado na análise recock com o fator de transcrição NF- $\kappa$ B). Também foram usados o LigPrep 3.4 (Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, version 3.4, LLC) com o campo de força OPLS\_3 e um estado de ionização para pH  $7.0 \pm 2.0$ , para preparar os ligantes utilizados no estudo. Foram obtidas as estruturas cristalográficas do receptor de Angiotensina II (PDB ID: 4ZUD)<sup>18</sup> e o NF- $\kappa$ B (PDB ID: 1NFK)<sup>19; 20; 21</sup>, a partir da base de dados Protein Data Bank (PDB), sendo utilizado o software Protein Preparation Wizard (Schrödinger Release 2015-2: Schrödinger Suite 2015-2 Protein Preparation Wizard; Epik version 3.2; Impact version 6.7; Prime version 4.0, Schrödinger, LLC) para preparar essas estruturas. A macromolécula de DNA cocrystalizado presente em 1NFJK foi removida da estrutura e foram selecionados para o acoplamento, os monômeros e dímeros p50 (cadeias A e B). Para otimizar os resultados, foi usado o campo de força OPLS3 no MacroModel 9.9. Foi utilizado o protocolo “Induced Fit Docking” Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2: Schrödinger Suite 2015-2 Induced Fit Docking protocol; Glide version 6.7; Prime version 4.0; Schrödinger, LLC, NY 2015) para o acoplamento molecular do estudo. O programa Prime foi usado para o refinamento dos compostos e o programa Glide forneceu a pontuação, considerando as proteínas e o ligante flexível. A área da grade foi definida como  $20 \times 20 \times 20 \text{ \AA}$  para o receptor da Angiotensina II e  $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$  para o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Todos os programas de computador pertencem à Schrödinger suite.

#### 2.6. Análise estatística

Todos os resultados representam a média e o erro padrão (SEM). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, CA). Para comparar os grupos, foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os dados foram considerados diferentes estatisticamente quando:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ .

### 3. Resultados

Foram estudados o coração e rim de ratos com obesidade induzida, para analisar o efeito do chá de folhas de manga nos marcadores associados à inflamação e disfunção endotelial. Os resultados da caracterização da bebida, monitoramento do peso corporal, consumo calórico e os parâmetros bioquímicos, foram previamente publicados<sup>13; 14; 15</sup>.

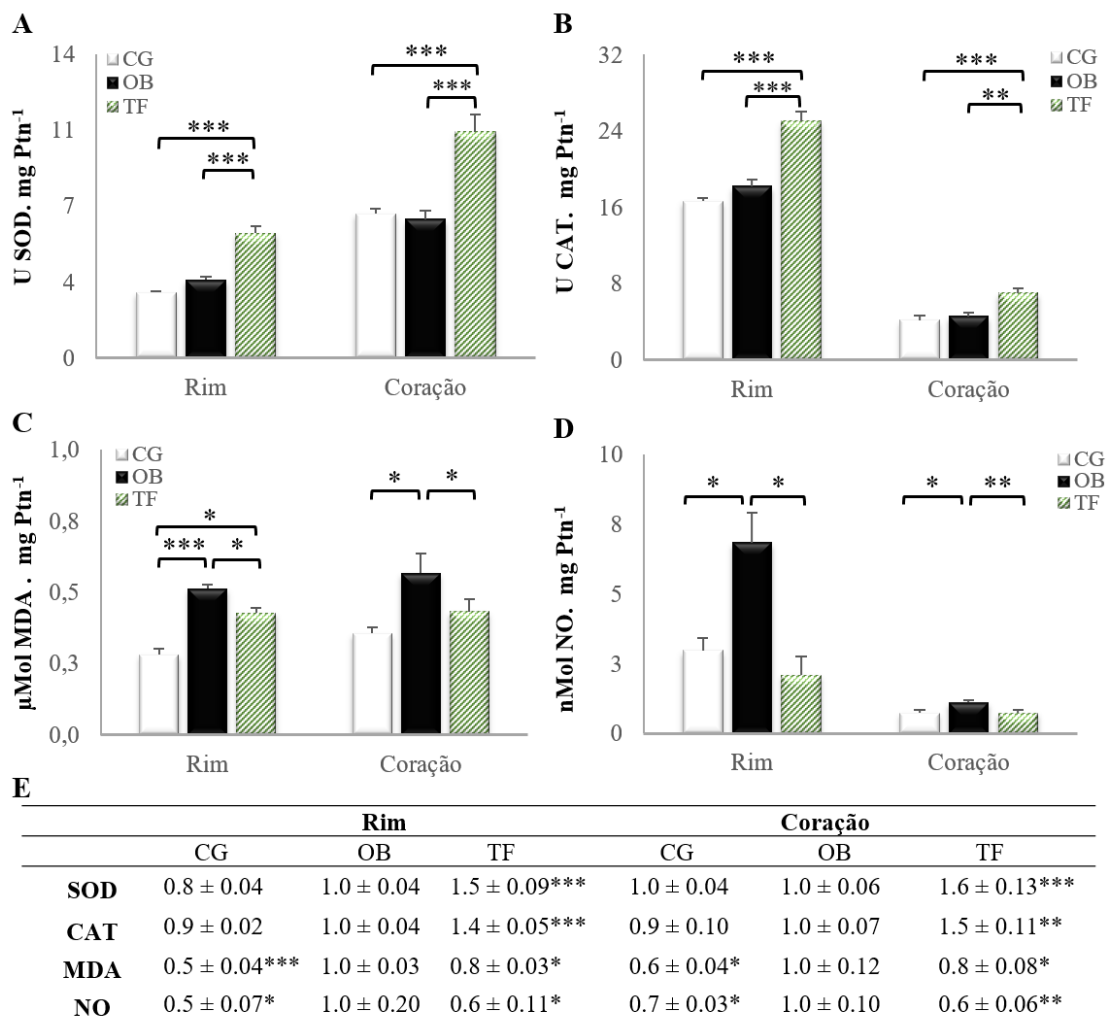
Os animais tratados consumiram uma média de  $25 \pm 1.9$  mL/dia de chá de folhas de manga, sendo estável durante as oito semanas de tratamento. Baseando-se nos dados publicados anteriormente e no chá consumido neste estudo, os animais tratados consumiram  $18 \pm 0.1$  mg de mangiferina e  $40 \pm 0.1$  mg EAG de fenólicos totais<sup>15</sup> por dia.

#### 3.1. Marcadores do estresse oxidativo

A Figura 2 apresenta os resultados das concentrações de SOD, CAT, MDA e NO, no rim e coração. Foi observado que a HFD não alterou os níveis das enzimas antioxidantes SOD e CAT no grupo OB comparado ao grupo CG. Interessantemente, o chá de folhas de manga aumentou significativamente esses níveis após as oito semanas de tratamento. Tanto no coração como no rim, foram observados níveis elevados de MDA e NO no grupo OB. O tratamento com o chá favoreceu a redução das substâncias no grupo TF ao ponto de não diferir do grupo não obeso (CG), sugerindo que a bebida inibiu a formação de peróxidos de hidrogênio e de óxido nítrico.

#### 3.2. Marcadores associados à inflamação

Para observar o efeito do chá de folhas de manga no processo inflamatório associado à obesidade, foram analisados os marcadores PPAR- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$ , e IL-6 no coração e nos rins. Como esperado, a HFD alterou negativamente os níveis de expressão de mRNA dos genes mencionados. Tanto no coração como no rim, a HFD reduziu a expressão de PPAR- $\alpha$  e estimulou a expressão de NF- $\kappa$ B p65 e TNF- $\alpha$  em comparação aos grupos CG e TF (Fig. 3A-C e 4A-C). A relação entre os valores da expressão de mRNA e das proteínas indicou uma predominância do NF- $\kappa$ B p65 nos tecidos, evidenciando o efeito pro-inflamatório da HFD. O chá de folhas de manga estimulou a expressão do marcador anti-inflamatório PPAR- $\alpha$  no grupo TF quase dobrando os valores do grupo OB (Fig. 3A e 4A). Também inibiu a expressão dos marcadores NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$  e IL-6 no coração (Fig. 3B-D) e o NF- $\kappa$ B p65 e TNF- $\alpha$  no rim (Fig. 4B-C).

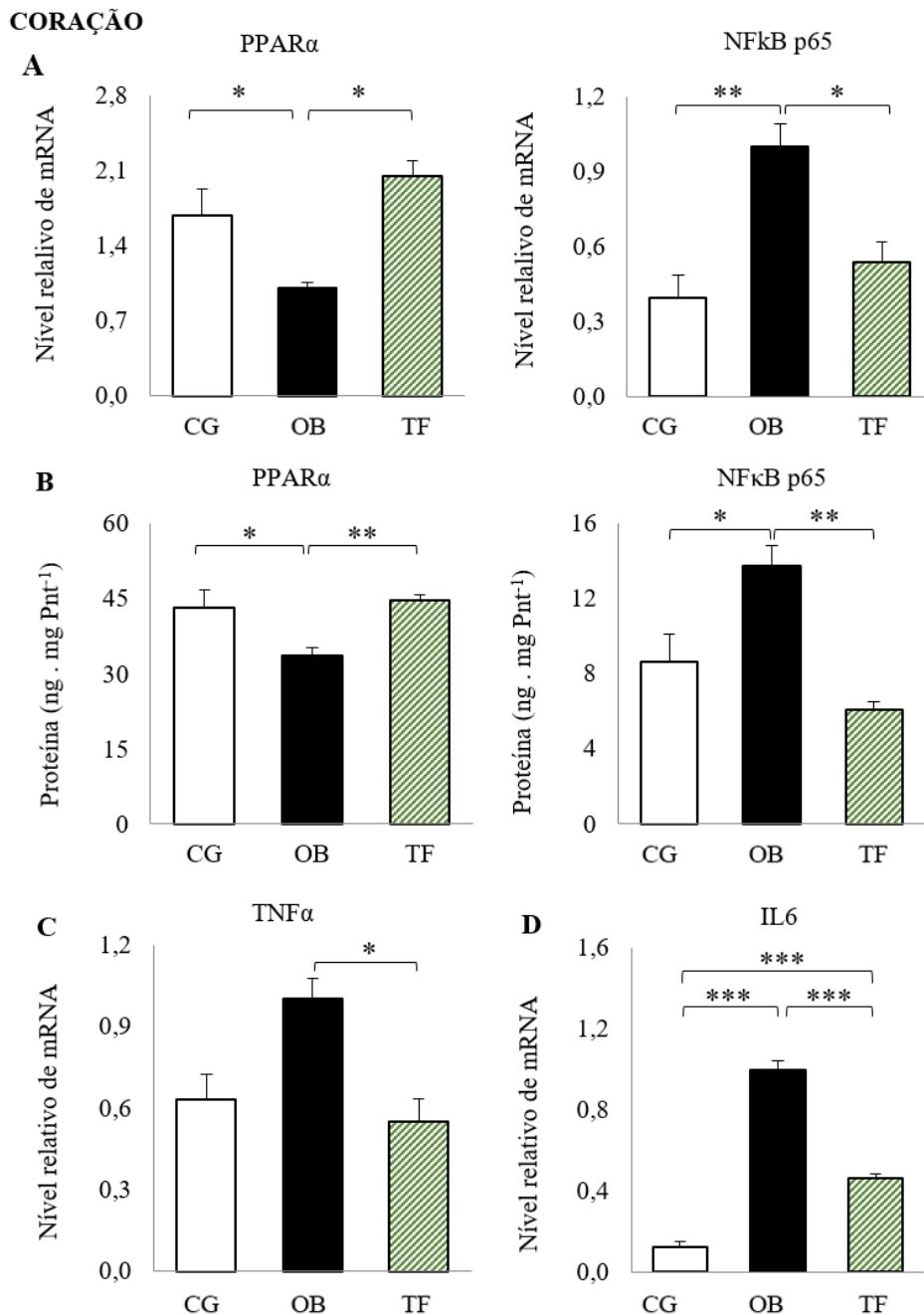


**Figura - 2.** Marcadores do estresse oxidativo no coração e rim após oito semanas de tratamento. (A) superóxido dismutase, (B) catalase, (C) malondialdeído, (D) óxido nítrico, e (E) resultados expressados como “X-Fold” dos valores em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF).

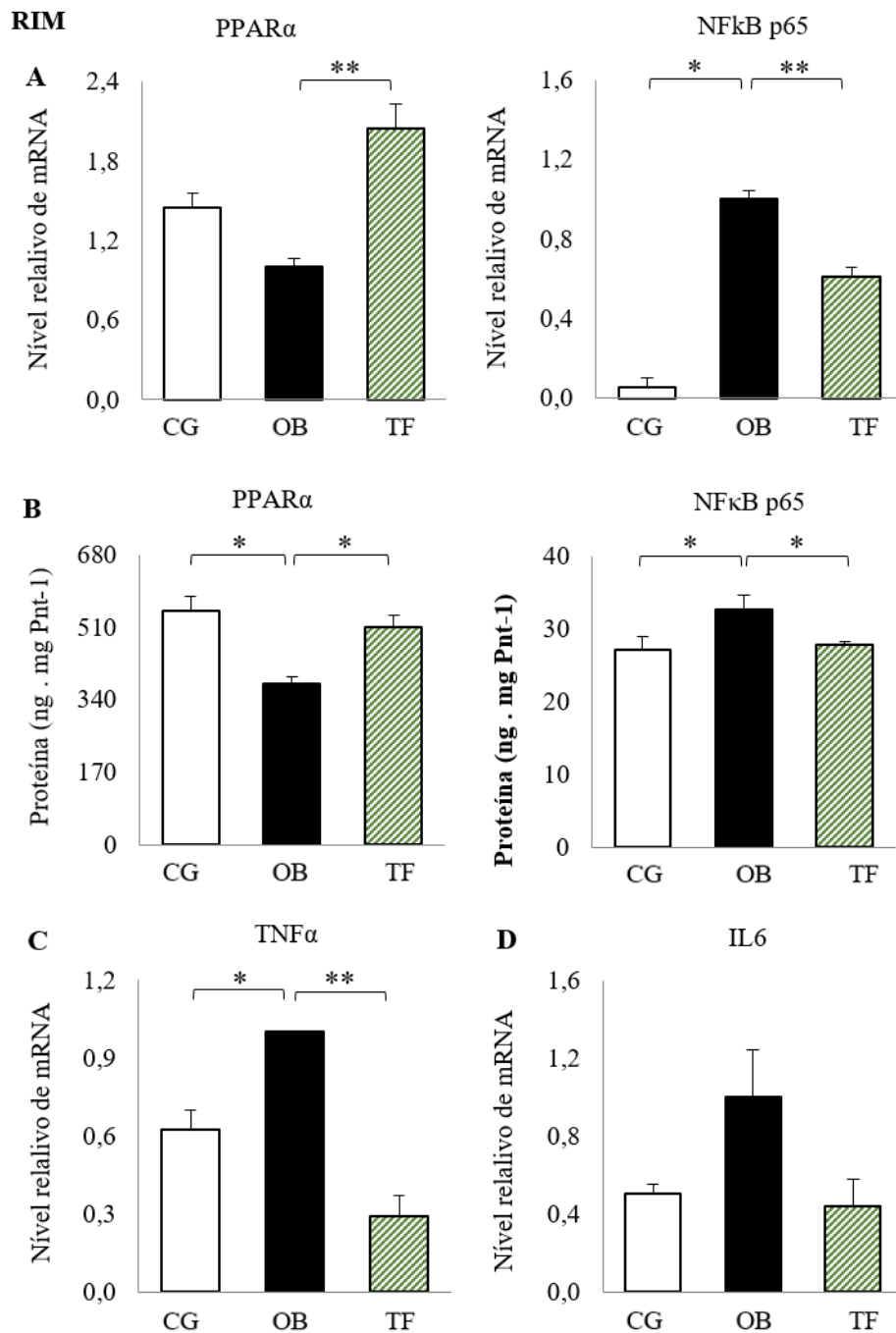
### 3.3. Marcadores associados à disfunção endotelial

Para observar o efeito do chá de folhas de manga na disfunção endotelial, foram analisados os marcadores Ang II, eNOS, VCAM-1 e ICAM-1 no coração e rim dos animais experimentais. Os resultados indicaram que a HFD estimula a AngII e os marcadores de adesão celular VCAM-1 e ICAM-1, e diminui a expressão de eNOS no coração e rim do grupo OB. Ao contrário, o chá de folhas de manga regulou positivamente esses marcadores diminuindo a expressão da AngII (à metade aproximadamente), VCAM-1 e ICAM-1 nos tecidos. Adicionalmente, foram observados valores elevados de eNOS no coração do grupo TF (2 vezes maior que o grupo OB). Também, a bebida

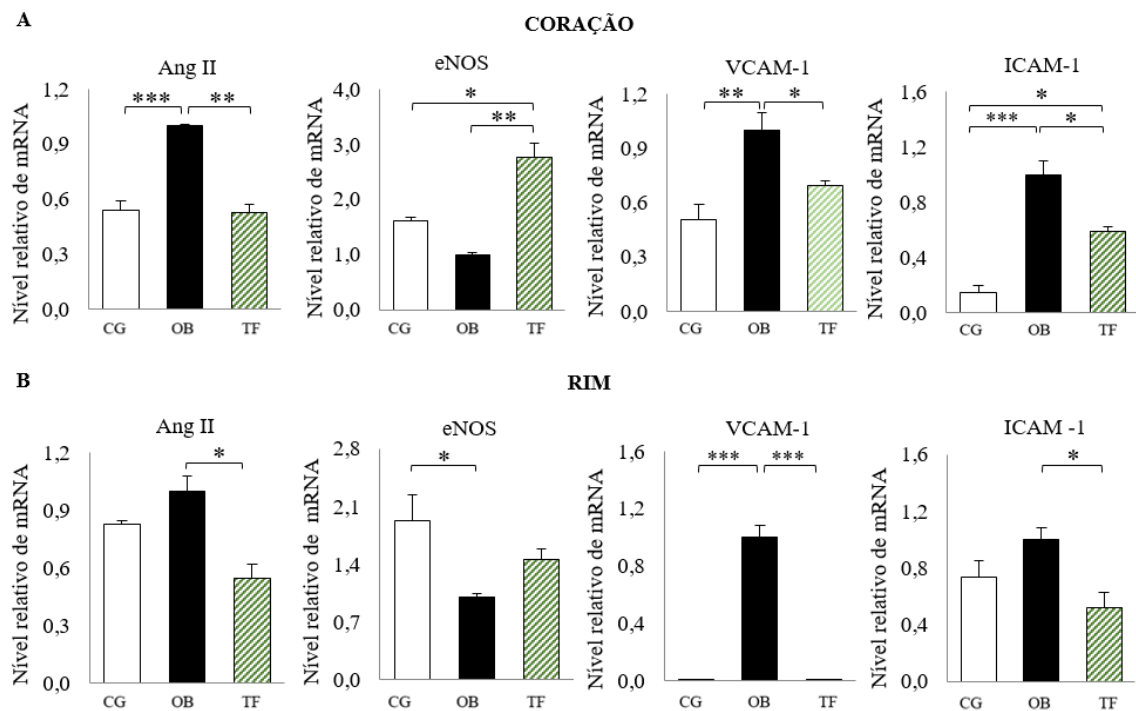
diminuiu drasticamente a expressão de VCAM-1 no rim, quando comparado ao grupo OB. Os resultados são apresentados na Figura 5.



**Figura - 3.** Marcadores associados aos processos inflamatórios no coração após oito semanas de tratamento. (A) expressão dos genes PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, (B) concentração das proteínas PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, (C) e (D) expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-6, respectivamente. Os dados da expressão gênica são expressos como “Fold change” do nível relativo de mRNA (GAPDH como endógeno) normalizados em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). Abreviações: PPAR- $\alpha$ , receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa; TNF-  $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; NF- $\kappa$ B p65, fator nuclear kappa B; IL-6, interleucina 6.



**Figura - 4.** Marcadores associados aos processos inflamatórios no rim após as oito semanas de tratamento. (A) expressão dos genes PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, (B) concentração das proteínas PPAR- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B p65, (C) e (D) expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-6 respectivamente. Os dados da expressão gênica são expressos como “Fold change” do nível relativo de mRNA (GAPDH como endógeno) normalizados em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). Abreviações: PPAR- $\alpha$ , receptor ativado por proliferador de peroxissoma alpha; TNF-  $\alpha$ , fator de necrose tumoral alpha; NF- $\kappa$ B p65, fator nuclear kappa B; IL-6, interleucina 6.



**Figura - 5.** Expressão gênica de marcadores associados à disfunção endotelial (A) no coração e (B) no rim após oito semanas de tratamento. Os dados são apresentados como “Fold change” do nível relativo de mRNA (GAPDH como endógeno) normalizados em relação ao grupo OB. Os valores representam a média e SEM (n=8). As diferenças estatísticas foram determinadas usando ANOVA seguida do post hoc Tukey, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001. Os ratos foram alimentados com dieta AIN93M (CG), HFD (OB) e HFD e tratados com o chá de folhas de manga (TF). Abreviações: AngII, angiotensina II; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; VCAM-1, molécula de adesão celular vascular 1; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1.

### 3.4. Acoplamento molecular

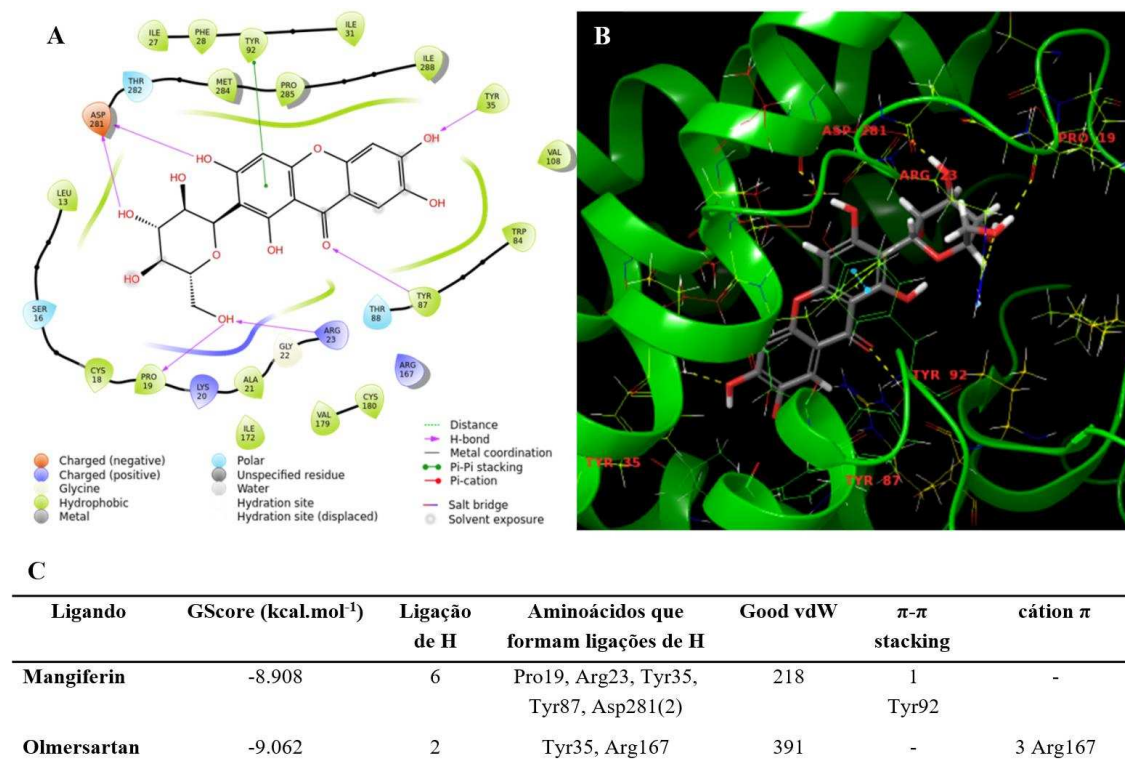
As principais interações e melhores posições do acoplamento molecular são apresentadas nas Figuras 6 e 7. A mangiferina apresentou um valor de acoplamento molecular (GScore) de  $-8.908 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , 6 interações por ligações de hidrogênio, 218 interações hidrofóbicas (por forças de Van der Waals) e 1 interação por empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , com o receptor da AngII (Fig. 6C). Na interação com o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, a mangiferina mostrou um valor de acoplamento molecular (GScore) de  $-6.929 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , 7 interações por ligações de hidrogênio, 248 interações hidrofóbicas (por forças de Van der Waals) favoráveis e 2 interações iônicas (Fig. 7C). Assim, a mangiferina demonstrou ter efeito antagonista tanto para a AngII quanto para o NF- $\kappa$ B.

## 4. Discussão

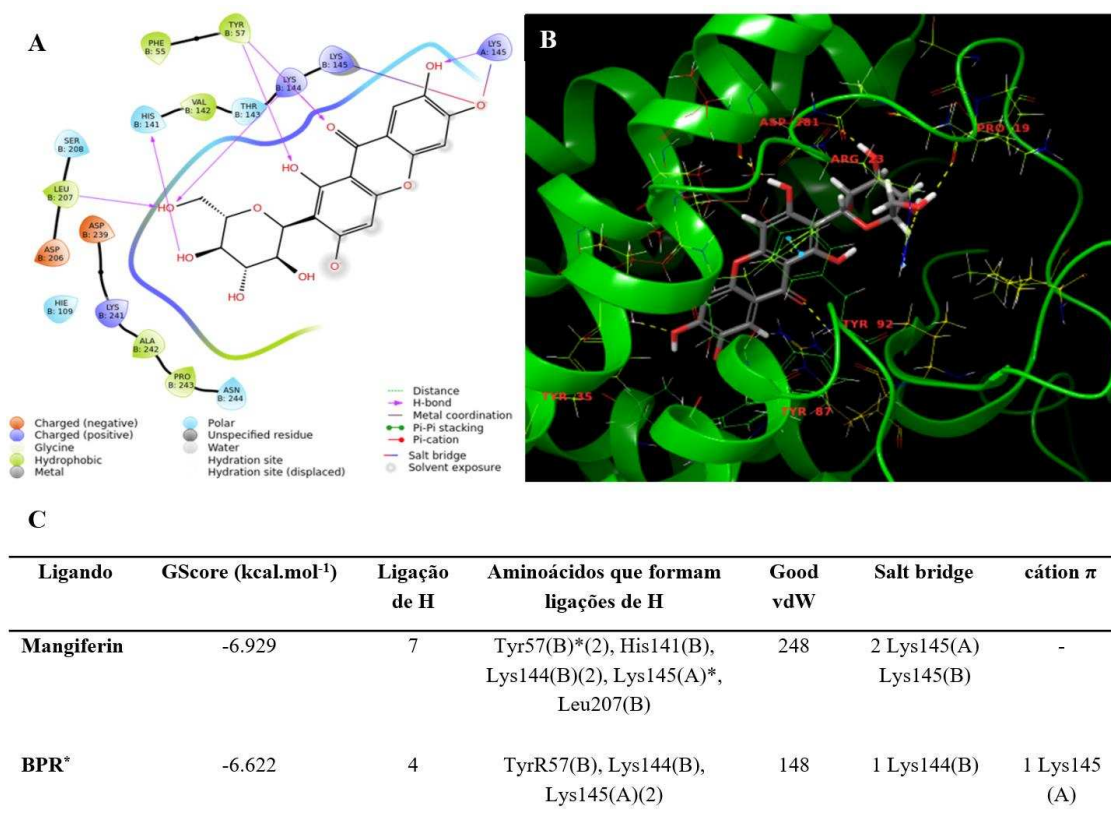
Este estudo avaliou o efeito do chá de folhas de manga nos marcadores do estresse oxidativo, da inflamação associada à obesidade e da disfunção endotelial, no coração e rins de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Nossos resultados indicam que a bebida

modula positivamente as alterações causadas pela dieta hiperlipídica em ambos os tecidos pela regulação dos marcadores associados. Recentemente foi demonstrado que o chá de folhas de manga inibiu o acúmulo de gordura visceral e hepática, suprimiu o ganho de peso corporal, estimulou a expressão de marcadores anti-inflamatórios e inibiu os pro-inflamatórios, suprimiu o estresse oxidativo, e reduziu o grau de esteatose hepática em ratos com obesidade induzida por HFD, mostrando efeitos anti-obesidade, anti-inflamatório e hepatoprotetor <sup>13; 14</sup>.

O TNF- $\alpha$  é produzido pelos adipócitos e macrófagos principalmente, sendo altamente expresso em indivíduos obesos. Foi reportado que o TNF- $\alpha$  induz a expressão do NF- $\kappa$ B, que desempenha um papel importante na inflamação crônica já que ativa a produção de substâncias pro-inflamatórias como a IL-6 e inibe as anti-inflamatórias como o PPAR- $\alpha$  <sup>22; 23</sup>. No nosso estudo, foi observado que o chá de folhas de manga inibiu a expressão do TNF- $\alpha$ , podendo bloquear também a expressão do NF- $\kappa$ B p65 e da IL-6 (no coração). Também observamos que as baixas concentrações de MDA e NO, e o aumento das enzimas antioxidantes poderiam estar associadas com a redução da formação de ROS, o que poderia ter levado à supressão da expressão do NF- $\kappa$ B p65 no grupo tratado com a bebida. A inativação do NF- $\kappa$ B também poderia estar relacionado ao aumento do PPAR- $\alpha$  no grupo tratado com o chá de folhas de manga <sup>24</sup>.



**Figura - 6.** (A) Interações entre os aminoácidos do receptor de Angiotensina II e a mangiferina, (B) representação da melhor posição do acoplamento molecular, (C) valores Glide Score (GScore), e número de interações por ligações de hidrogênio, por forças de Van der Waals (good vdW), por empilhamento  $\pi$ - $\pi$  ( $\pi$ - $\pi$  stacking) e por cátions  $\pi$ . O ligante padrão foi o medicamento Olmersartan. Foi usado o software “Induced Fit Docking Program, Schrödinger Suite” para a análise.



**Figura - 7.** (A) Interações entre os aminoácidos do fator de transcrição NF-κB e a mangiferina, (B) representação da melhor posição do acoplamento molecular, (C) valores Glide Score (GScore), e número de interações por ligações de hidrogênio, por forças de Van der Waals (good vdW), por pontes salinas (salt bridge) e por cátions π. O ligante padrão foi o reagente Vermelho de Bromopirogalol (BPR). Foi usado o software “Induced Fit Docking Program, Schrödinger Suite” para a análise.

O NF-κB também estimula a adesão molecular (de monócitos, linfócitos e leucócitos) no endotélio na forma vascular ou intercelular pela expressão dos genes VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente <sup>25</sup>. A adesão celular na matriz endotelial é essencial na regulação dos processos celulares como a sobrevivência celular, proliferação e migração. Um desequilíbrio no processo de adesão celular pode levar ao desenvolvimento de várias doenças, incluindo a disfunção endotelial. A disfunção de células endoteliais tem uma função importante na iniciação de doenças como a aterosclerose e hipertensão, principalmente <sup>8</sup>. Durante este mecanismo há um aumento das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, favorecendo a adesão de monócitos inflamatórios dentro da parede vascular, patologia importante na aterosclerose <sup>9</sup>. A expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pode inibir a ativação destas moléculas de adesão celular <sup>7</sup>. A eNOS é um importante regulador do NO, e tem a função principal de manter a homeostases vascular. Assim, um aumento na concentração de eNOS, leva à modulação positiva do estresse oxidativo e da disfunção endotelial <sup>26</sup>.

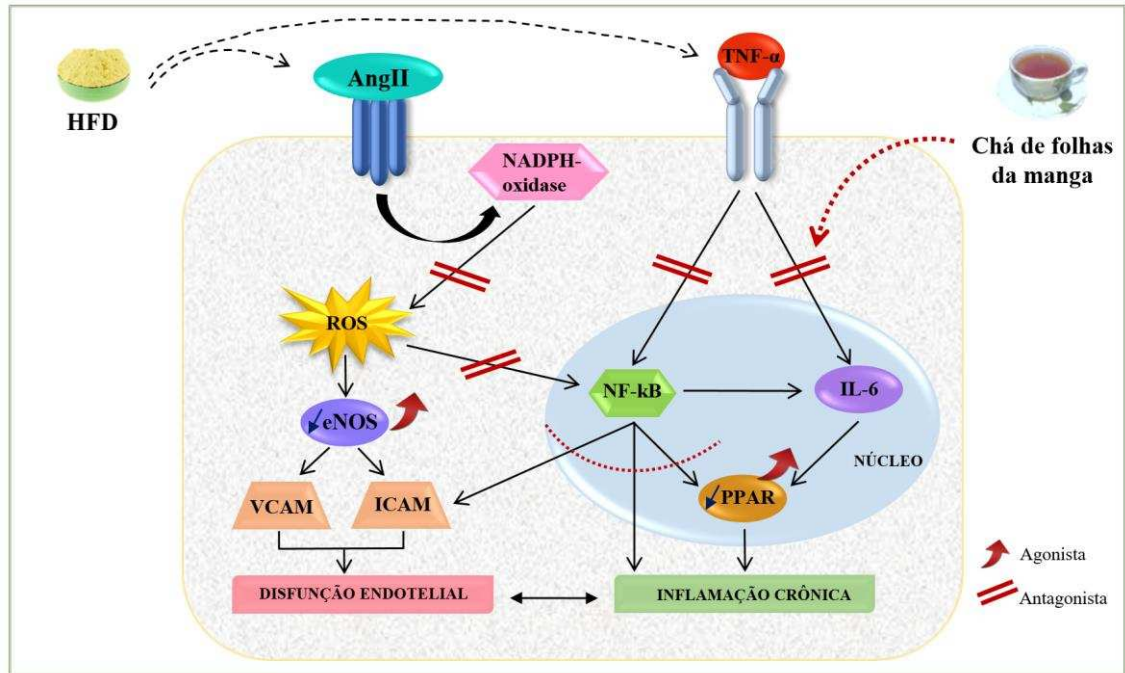
Nossos resultados também demonstraram que o chá de folhas de manga tem efeito antioxidante no coração e nos rins, já que estimula a produção das enzimas antioxidantes SOD e CAT e suprime a formação dos produtos da peroxidação lipídica e do óxido

nítrico, nesses órgãos. Na formação de ROS as enzimas antioxidantes SOD e CAT são ativadas para gerar o equilíbrio. Isto explicaria o porquê não houve diferenças significativas entre os valores destas enzimas no grupo não-obeso comparado ao grupo obeso. As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), são importantes antioxidantes que auxiliam a dismutação e catalise do ânion superóxido das ROS, portanto inibem o estresse oxidativo <sup>27</sup>. Baixos níveis das enzimas antioxidantes, geram um aumento das ROS, favorecendo a peroxidação lipídica, portanto levando ao estresse oxidativo. Devido a que o malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO) são produtos da peroxidação lipídica, estes representam os maiores indicadores do estresse oxidativo <sup>28</sup>; <sup>29</sup>. O estresse oxidativo, resulta do desequilíbrio entre a formação e eliminação das ROS, o qual pode ser provocado por diversos fatores que alteram o sistema antioxidante no organismo. Esses fatores podem ser, uma alimentação inadequada (dieta alta em gordura e açúcares), sedentarismo ou em alguns casos problemas genéticos. No desenvolvimento do estresse oxidativo, enzimas antioxidantes diminuem substancialmente, reduzindo a possibilidade do sistema equilibrar as espécies oxidantes livres <sup>30</sup>; <sup>31</sup>. Estudos demonstraram que o estresse oxidativo está associado à inflamação crônica, mecanismo fortemente relacionado ao desenvolvimento de doenças altamente prevalentes como as cardiovasculares e a obesidade <sup>32-35</sup>.

Foi relatado que a ativação da Angiotensina II (AngII) pode resultar no estresse oxidativo, na inflamação e na disfunção endotelial, representando um risco para desenvolver eventos cardiovasculares <sup>36</sup>. A AngII aumenta a formação de ROS, favorecendo o estresse oxidativo que inativa a eNOS, o que pode levar ao aumento da adesão molecular tanto intercelular (ICAM-1) como vascular (VCAM-1), desenvolvendo a disfunção endotelial <sup>7</sup>. Nossos resultados demonstraram que a HFD poderia ter induzido a disfunção endotelial, ativando a via da AngII, na qual houve redução da expressão de eNOS e aumento das moléculas VCAM-1 e ICAM-1 no coração e rins do grupo obeso. O chá de folhas de manga reverteu essas alterações, estimulando a expressão de eNOS e suprimindo a expressão de mRNA de AngII, VCAM-1, e ICAM-1, sugerindo que a bebida pode modular positivamente os marcadores envolvidos na disfunção endotelial. A figura 8 mostra o efeito da ingestão da HFD e do tratamento com o chá de folhas de manga nas interações entre os marcadores moleculares descritos anteriormente.

Estes efeitos foram observados na dose de 240 mL/dia do chá de folhas de manga, contendo 2,9 mg. Kg<sup>-1</sup> de mangiferina e 6,5 mg. Kg<sup>-1</sup> de fenólicos totais (valores extrapolados a humanos, considerando um adulto com peso corporal de 60 kg) <sup>37</sup>.

O estudo de acoplamento molecular foi realizado para analisar a afinidade entre a mangiferina, principal composto bioativo no chá de folhas de manga, e o receptor da AngII e o fator de transcrição NF-κB. Nossos resultados indicaram que a mangiferina tem uma ótima afinidade com o Olmesartan (medicamento padrão usado como representante do receptor AngII) e o vermelho de pirogalol (medicamento padrão usado como representante do NF-κB). Observando os resultados dos valores Gscore, das ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos, as interações hidrofóbicas e as demais interações favoráveis, podemos estabelecer que a mangiferina é antagonista, ou seja é



**Figura - 8.** Representação gráfica das interações entre moléculas sinalizadoras envolvidas na inflamação crônica e na disfunção endotelial, associadas ao consumo de dieta hiperlipídica (HFD). A HFD pode aumentar a expressão da AngII quem estimula a formação de ROS, aumentando a expressão do NF- $\kappa$ B e reduzindo a eNOS. A inativação da eNOS e ativação do NF- $\kappa$ B pode levar ao aumento na adesão molecular tanto intercelular (ICAM) como da vascular (VCAM), desenvolvendo a disfunção endotelial. A HFD também pode causar a inflamação crônica, que estimula a expressão do TNF- $\alpha$ , IL-6 e do NF- $\kappa$ B, reduzindo a atividade do PPAR- $\alpha$ . O chá de folhas de manga pode inativar a via do TNF- $\alpha$  e da AngII, o que pode aumentar a eNOS e o PPAR- $\alpha$ , modulando a inflamação e a disfunção endotelial. As setas e os traços vermelhos representam o efeito agonista e antagonista, respetivamente, do chá de folhas de manga nos marcadores.

inibidora, tanto da AngII quanto do NF- $\kappa$ B. Estes resultados são coerentes com os valores encontrados na expressão de mRNA da AngII e NF- $\kappa$ B no grupo tratado com o chá de folhas de manga. No entanto, para verificar os efeitos da mangiferina e dos compostos fenólicos presentes na bebida sobre estes marcadores moleculares, é necessário estudar outros possíveis metabolitos secundários envolvidos nestas interações.

Em conclusão, o chá de folhas de manga suprime o estresse oxidativo, a inflamação e a disfunção endotelial, no coração e rins de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica, via modulação positiva do TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, AngII, eNOS, VCAM-1, e ICAM-1, biomarcadores fortemente associados a estas doenças. Adicionalmente, a mangiferina tem um efeito antagonista da AngII e do NF- $\kappa$ B. Mas estudos são necessários para confirmar estes efeitos.

## Referências

<sup>1</sup> WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**: WHO 2018.

- <sup>2</sup> EMANUELA, F. et al. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, 2012. ISSN 2090-0724.
- <sup>3</sup> GRAUPERA, M.; CLARET, M. Endothelial Cells: New Players in Obesity and Related Metabolic Disorders. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 781-794, 2018/11/01/ 2018. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276018301644> >.
- <sup>4</sup> AVOGARO, A.; DE KREUTZENBERG, S. V. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 360, n. 1, p. 9-26, 2005/10/01/ 2005. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898105002822> >.
- <sup>5</sup> MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFkappaB system. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 8, n. 3, p. 227-41, May 2016. ISSN 1939-005x.
- <sup>6</sup> CHU, W.-M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 222-225, 1/28/ 2013. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383512006027> >.
- <sup>7</sup> ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 8, p. 1983-1992, 2004. ISSN 1046-6673.
- <sup>8</sup> STEYERS, C. M.; MILLER, F. J. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 11324-11349, 2014.
- <sup>9</sup> MESTAS, J.; LEY, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 18, n. 6, p. 228-232, 2008. ISSN 1050-1738.
- <sup>10</sup> BARRETO, J. C. et al. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 14, p. 5599-610, Jul 23 2008. ISSN 0021-8561.
- <sup>11</sup> BENARD, O.; CHI, Y. Medicinal properties of mangiferin, structural features, derivative synthesis, pharmacokinetics and biological activities. **Mini Rev Med Chem**, v. 15, n. 7, p. 582-94, 2015. ISSN 1389-5575.

- <sup>12</sup> SHAH, K. A. et al. Mangifera Indica (Mango). **Pharmacognosy Reviews**, India, v. 4, n. 7, p. 42-48, 2010. ISSN 0973-7847 0976-2787. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249901/> >.
- <sup>13</sup> MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Mango leaf tea promotes hepatoprotective effects in obese rats. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 437-446, 2018. ISSN 1756-4646.
- <sup>14</sup> MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Anti-obesity effects of tea from Mangifera indica L. leaves of the Ubá variety in high-fat diet-induced obese rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, n. Supplement C, p. 938-945, 2017/07/01/ 2017. ISSN 0753-3322. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217312179> >.
- <sup>15</sup> MEDINA RAMÍREZ, N. et al. Extraction of Mangiferin and Chemical Characterization and Sensorial Analysis of Teas from Mangifera indica L. Leaves of the Ubá Variety. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 33, 2016. ISSN 2306-5710. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2306-5710/2/4/33> >.
- <sup>16</sup> GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen” □. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426-428, 1879. ISSN 0365-9496.
- <sup>17</sup> GUEVARA, I. et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n. 2, p. 177-188, 1998. ISSN 0009-8981.
- <sup>18</sup> ZHANG, H. et al. Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor. **J Biol Chem**, v. 290, n. 49, p. 29127-39, Dec 4 2015. ISSN 0021-9258.
- <sup>19</sup> GHOSH, G. et al. Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. **Nature**, v. 373, n. 6512, p. 303-10, Jan 26 1995. ISSN 0028-0836 (Print); 0028-0836.
- <sup>20</sup> PICCAGLI, L. et al. Docking of molecules identified in bioactive medicinal plants extracts into the p50 NF-kappaB transcription factor: correlation with inhibition of NF-kappaB/DNA interactions and inhibitory effects on IL-8 gene expression. **BMC Struct Biol**, v. 8, p. 38, Sep 3 2008. ISSN 1472-6807.

- 21 SHARMA, R. K. et al. Biological evaluation, chelation, and molecular modeling studies of novel metal-chelating inhibitors of NF-kappaB-DNA binding: structure activity relationships. **J Med Chem**, v. 49, n. 12, p. 3595-601, Jun 15 2006. ISSN 0022-2623 (Print); 0022-2623.
- 22 PATIAL, S.; PARAMESWARAN, N. Tumor Necrosis Factor-&alpha; Signaling in Macrophages. v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010-12-04 2010. Disponível em: < <http://dl.begellhouse.com/journals/6dbf508d3b17c437,4755276625828a95,5f80aba07ffe0f3a.html> >.
- 23 BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappaB in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 12, n. 1, p. 141-179, 1994. ISSN 0732-0582.
- 24 LEFEBVRE, P. et al. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. **J Clin Invest**, v. 116, n. 3, p. 571-80, Mar 2006. ISSN 0021-9738 (Print), 0021-9738.
- 25 COLLINS, T. et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 10, p. 899-909, 1995. ISSN 0892-6638.
- 26 FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 923-939, 2010. ISSN 0031-6768.
- 27 ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 909-950, 2014. ISSN 0031-9333.
- 28 GASPAROVIC, A. C.; ZARKOVIC, N.; BOTTARI, S. P. Biomarkers of nitro-oxidation and oxidative stress. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 73-80, 2018/02/01/ 2018. ISSN 2468-2020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468202017300669> >.
- 29 DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005/08/01/ 2005. ISSN 0939-4753. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475305001043> >.

- <sup>30</sup> RADAK, Z. et al. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 10, p. 1208-1246, 2013. ISSN 1523-0864.
- <sup>31</sup> BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 6// 2011. ISSN 1521-6934. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693410001392> >.
- <sup>32</sup> LINGAPPAN, K. NF-κB in oxidative stress. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 81-86, 2018/02/01/ 2018. ISSN 2468-2020. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468202017301195> >.
- <sup>33</sup> LIBBY, P. et al. Inflammation in Atherosclerosis: Transition From Theory to Practice. **Circulation Journal**, v. 74, n. 2, p. 213-220, 2010.
- <sup>34</sup> ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 2, p. 141-150, 8// 2014. ISSN 0168-8227. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822714001879> >.
- <sup>35</sup> TAUBE, A. et al. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 11, p. H2148-H2165, 2012.
- <sup>36</sup> MONTEZANO, A. C. et al. Angiotensin II and vascular injury. **Current hypertension reports**, v. 16, n. 6, p. 431, 2014. ISSN 1522-6417.
- <sup>37</sup> REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **Faseb j**, v. 22, n. 3, p. 659-61, Mar 2008. ISSN 0892-6638.

## **CONCLUSÃO GERAL**

Este estudo demonstrou que o chá de folhas de manga tem efeitos antioxidante, anti-inflamatório e hepatoprotetor, e melhora a disfunção endotelial no fígado, coração e rins de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, uma vez que aumenta a produção das enzimas SOD e CAT, reduz a formação de produtos da peroxidação lipídica, e regula a expressão gênica dos marcadores moleculares TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, PPAR- $\alpha$ , AdipoR2, Cpt1, SREBP-1c, AngII, VCAM-1, e ICAM-1. Adicionalmente, sugere-se que a mangiferina é agonista do PPAR- $\alpha$  e antagonista da AngII e do NF- $\kappa$ B.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O desenvolvimento de novos fitoterápicos utilizando produtos naturais, representa uma grande estratégia no tratamento e redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, uma vez que estes produtos geralmente apresentam diversos compostos com bioatividade potencial. Os resultados deste estudo sugerem o tratamento com chá de folhas de manga para reverter as alterações causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica. É recomendável continuar pesquisando seus efeitos no cérebro, no músculo, nos pulmões, no testículo, nas artérias, e outros órgãos, para avaliar uma possível modulação de alterações no sistema nervoso e da reparação muscular, ou seu efeito na disfunção erétil ou na fertilidade. Também é necessário realizar um perfil químico dos principais compostos bioativos presentes na bebida, para entender o mecanismo de ação da bebida.

## ANEXOS

### ANEXO I: Aprovação do estudo em animais



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

Viçosa, 25 de maio de 2016

Ilmo. Prof.  
José Humberto de Queiroz  
Coordenador do projeto  
DBB/UFV

Sr. Coordenador,

Após avaliação da Metodologia utilizada no Projeto de Pesquisa intitulado “Efeitos da suplementação com chá de folhas de *Mangifera indica* L. na expressão de marcadores associados aos fatores de risco para doenças cardiovasculares e processos inflamatórios em ratos obesos”, aqui nomeado Processo 29/2016, a CEUA/UFV emite parecer favorável ao protocolo de utilização de animais proposto, tendo como base para análise a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, bem como a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI.

Acresce a esse Parecer a exigência de Relatório Final de Atividades conforme itens a seguir:

RESUMO DOS RESULTADOS FINAIS OBTIDOS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS ENVOLVENDO A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS NO PROJETO DE PESQUISA

- 1 Número do protocolo de submissão do projeto de pesquisa à CEUA/UFV;
- 2 Metodologia completa obrigatoriamente com:
  - Local (is) Geral (is) e específico (s) oficial (is) onde ocorreu a experimentação;
  - O nome científico do animal em questão;
  - Número total de animais utilizados na pesquisa.
- 3 Resultados:
- 4 Nome do Coordenador do Projeto:  
Assinatura:
- 5 Nome do Responsável Técnico:  
Assinatura:  
Inscrição em CRMV:

  
Prof.<sup>a</sup> Átima Clemente Alves Zuanon  
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

**ANEXO II:** Composição das dietas e densidades calórica

Ingredientes (g. 100g <sup>-1</sup> )		
	AIN-93M	HFD
Caseína	14,00	19,50
Maltodextrina	15,50	10,00
Sacarose	10,00	34,10
Amido de milho	46,57	5,32
Óleo de soja (mL)	4,00	1,00
Banha de porco	0,00	20,00
Celulose	5,00	5,00
Mix Mineral	3,50	3,50
Mix Vitamínico	1,00	1,00
Bitartarato colina	0,25	0,25
L-cistina	0,18	0,18
Colesterol	0,00	0,15
Butilato de hydroxitolueno	0,0008	0,004
Total	100,00	100,00
Calorias (Kcal)		
Caseína	56,00	78,00
Maltodextrina	62,00	40,00
Sacarose	40,00	136,40
Amido de milho	186,28	21,28
Óleo de soja (mL)	36,00	9,00
Banha de porco	-	180,00
CD	3.80	4,70

CD: densidade caloria (Kcal.g<sup>-1</sup>)