

BRUNA MORAES ARAÚJO

**BIOATIVIDADES DO EXTRATO DA FOLHA DA MANGUEIRA
(*Mangifera indica*, VARIEDADE UBÁ) E DA MANGIFERINA EM
CAMUNDONGOS APOE^{-/-}**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2012**

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

T

A663b
2012

Araújo, Bruna Moraes, 1978-
Bioatividades do extrato da folha da mangueira
(*Mangifera indica*, variedade Ubá) e da mangiferina em
camundongos ApoE-/- / Bruna Moraes Araújo. – Viçosa, MG,
2012.
xi, 83f. : il. ; (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: José Humberto Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 64-83.

1. Bioquímica -Análise. 2. Aterosclerose. 3. Histopatologia.
4. *Mangifera indica*. 5. Xantona. 6. Camundongos como
animal de laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa
de Pós-Graduação Bioquímica agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 572

BRUNA MORAES ARAÚJO

**BIOATIVIDADES DO EXTRATO DA FOLHA DA MANGUEIRA
(*Mangifera indica*, VARIEDADE UBÁ) E DA MANGIFERINA EM
CAMUNDONGOS APOE^{-/-}**

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

Aprovada: 04 de setembro de 2012.

João Paulo Viana Leite

Sérgio Luís Pinto da Matta

Maria Lucia Pedrosa

Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Coorientadora)

José Humberto de Queiroz
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela oportunidade concedida para meu aprimoramento profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento deste projeto;

Ao meu orientador, José Humberto de Queiroz, por todo suporte oferecido ao longo da realização deste trabalho;

À co-orientadora Maria do Carmo Gouveia Peluzio pela imensurável colaboração para a realização do ensaio biológico, em especial pela cessão dos camundongos, pela participação imprescindível no término dos experimentos, pelo acolhimento em seu laboratório e pelas orientações;

À co-orientadora Sônia Machado Rocha Ribeiro pelas valiosas sugestões, especialmente durante a minha qualificação;

Ao professor João Paulo Viana Leite pelo envolvimento neste trabalho, pelas valiosas sugestões e pela imprescindível contribuição nos processos de obtenção dos extratos, isolamento da mangiferina e nas análises fitoquímicas;

Ao professor Sérgio Luís Pinto da Matta pela cessão de gaiolas para acomodação dos camundongos, pela cessão do laboratório e equipamentos para processamentos histológicos e pela participação como membro da banca examinadora;

À professora Maria Lucia Pedrosa do Laboratório de Nutrição Experimental da UFOP por aceitar prontamente o convite para composição da banca examinadora na defesa desta tese;

Aos professores Luciano Gomes Fietto e Andréia Barros Ribon do Laboratório de Biotecnologia Molecular e professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, pela cessão de laboratórios e equipamentos para realização das análises moleculares;

À professora Hércia Stampini Duarte Martino do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, pela cessão do laboratório e equipamentos para realização do ensaio biológico;

À professora Josefina Bressan do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Nutrição e Saúde, pela cessão do laboratório e equipamentos para realização das análises sanguíneas;

À professora Luzimar Campos da Silva do Laboratório de Anatomia Vegetal pela cessão do laboratório e equipamentos para captura das imagens histológicas;

Aos estagiários Cibele Miranda, Gepoliano Chaves e Silvia Lopes pelo auxílio e empenho nas diversas etapas desta pesquisa;

À Reggiani Gonçalves e à Daniella Moraes, pela amizade e participação neste trabalho;

Aos colegas do laboratório, Filippe, Fernando, Hugo, Izabela, Larissa e Wilton e aos estagiários Paula e Samuel, pela agradável convivência e pelo apoio mútuo;

Aos demais colegas da pós-graduação, em especial ao Raphael Klein, pelo auxílio fundamental nas análises moleculares, e à amiga Luciana Cardoso, pelo compartilhamento de dúvidas, anseios e soluções;

À amiga Vanessa Joia, pelo auxílio na realização das gavagens e pelas valiosas sugestões;

À farmacêutica-bioquímica da Divisão de Saúde, Gleide Gatti Fontes, pelo auxílio nas análises bioquímicas sanguíneas;

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Eduardo Monteiro, pela eficiência, paciência, boa vontade e bom humor;

Aos funcionários do Biotério Central, Sr. Adão e Juliano, pela receptividade;

Ao Sr. Toninho, do Laboratório de Bioquímica Nutricional, pela prestatividade;

Aos meus familiares, amigos e “peludos”, por amenizarem minhas angústias frente às dificuldades ao longo da realização deste trabalho;

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão do meu doutorado, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1. <i>Mangifera indica</i>	3
1.2. Mangiferina	5
1.2.1. Potencial antihiperglicemiante	7
1.2.2. Potencial hipolipemiante	8
1.2.3. Potencial antioxidante	9
1.2.4. Potencial anti-inflamatório e imunomodulatório	11
1.3. Aterosclerose	12
1.4. Camundongos deficientes em apoproteína E	14
1. JUSTIFICATIVA	18
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS	20
5.1. Coleta da matéria-prima	20
5.2. Obtenção dos extratos da folha e da casca de <i>M. indica</i>	20
5.3. Isolamento da mangiferina	20
5.4. Caracterização dos extratos da folha e da casca de <i>M. indica</i>	21
5.4.1. Prospecção fitoquímica	21
5.4.2. Quantificação de fenóis totais	22
5.4.3. Quantificação de flavonoides	23
5.4.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	24
5.4.5. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	25
5.5. Ensaio biológico	26
5.5.1. Animais e dieta	26
5.5.2. Desenho experimental	27
5.5.3. Coleta do material biológico	28
5.5.4. Análises de metabólitos e enzimas séricos	28
5.5.5. Análise quantitativa da lesão aterosclerótica	29
5.5.6. Avaliação das atividades das enzimas antioxidantes hepáticas e	

renais	30
5.5.6.1. Preparo das amostras	30
5.5.6.2. Ensaio da atividade da catalase	31
5.5.6.3. Ensaio da atividade da superóxido dismutase	31
5.5.6.4 Quantificação de proteínas totais	34
5.5.7. Análise da expressão gênica hepática da <i>fat-specific protein</i> 27(FSP-27)	36
5.5.7.1. Extração, quantificação e avaliação da integridade do RNA	36
5.5.7.2. Síntese do DNA complementar	37
5.5.7.3. Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real	37
5.5.8. Análises histomorfométricas dos tecidos hepático e renal	38
5.6. Análises estatísticas	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1. Isolamento da mangiferina e confirmação estrutural	42
6.2. Caracterização dos extratos da folha e da casca de <i>M. indica</i>	42
6.3 Bioatividade do extrato da folha de <i>M. indica</i> e da mangiferina em camundongos ApoE ^{-/-}	46
6.3.1. Parâmetros biométricos e consumo alimentar médio	46
6.3.2. Metabólitos e enzimas séricos	47
6.3.2.1. Atividade das aminotransferases	47
6.3.2.2. Glicemia e lipídemia	48
6.6.3. Lesão aterosclerótica	50
6.3.4. Atividade das enzimas antioxidantes hepáticas e renais	52
6.3.5. Expressão gênica da <i>fat-specific protein</i> 27 (FSP-27)	55
6.3.6. Histomorfometria hepática	56
6.3.7. Histomorfometria renal	60
7. CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

ARAÚJO, Bruna Moraes, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2012, **Bioatividades do extrato da folha da mangueira (*Mangifera indica*, variedade Ubá) e da mangiferina em camundongos ApoE^{-/-}**. Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadoras: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Sônia Machado Rocha Ribeiro.

Extratos da folha de *Mangifera indica* L. são importante fonte de compostos fenólicos, especialmente mangiferina, composto que apresenta propriedades antidiabética, hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatória. O estudo teve como objetivo caracterizar o extrato da folha de *M. indica*, comparando-o com o extrato da casca, e avaliar as bioatividades do extrato etanólico da folha de *M. indica* e da mangiferina isolada em camundongos ApoE^{-/-}. Extratos secos da folha e da casca de *M. indica* foram obtidos por processo de percolação com etanol. Mangiferina foi obtida após processo de extração e purificação realizado a partir das folhas de *M. indica*, sendo identificada por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) e por espectro UV obtido por arranjo diodo. Detecção de classes de metabólitos secundários nos extratos da folha e da casca de *M. indica* foi realizada por cromatografia em camada delgada. Teores de fenóis totais e de flavonoides em ambos os extratos foram estimados por espectrofotometria, respectivamente, a 760 nm, utilizando-se como reagente a solução de Folin–Ciocalteu, e a 420 nm, utilizando-se a solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado. As atividades antioxidantes *in vitro* de ambos os extratos foram determinadas pelo método colorimétrico do radical livre estável orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). A quantificação de mangiferina no extrato da folha de *M. indica* foi realizada por CLAE. Camundongos ApoE^{-/-} com 15 semanas de idade foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de acordo com o tratamento recebido: controle -veículo DMSO; E200 – 200 mg/kg/dia de extrato da folha de *M. indica*, E400 – 400 mg/kg/dia de extrato da folha de *M. indica*; M40 - 40 mg/kg/dia de mangiferina. Administrações diárias do veículo, dos extratos e da mangiferina foram realizadas por gavagem durante 8 semanas. Metabólitos e enzimas séricos foram dosados utilizando-se kits enzimáticos. Lesões ateroscleróticas foram quantificadas

pelo método *en face*, mensurando-se a área de deposição lipídica corada por Sudan IV. A atividade da catalase (CAT) hepática e renal foi mensurada pela taxa de decomposição de H₂O₂, a partir da leitura das absorvâncias a 240 nm. A atividade da superóxido dismutase (SOD) hepática e renal foi mensurada pelo método que envolve a geração de superóxido por autooxidação do pirogalol e a redução dependente de superóxido do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A expressão gênica hepática da *fat-specific protein 27* (FSP-27) foi quantificada por PCR em tempo real. Fragmentos de fígado e de rins foram fixados em solução de Karnowsky e submetidos à rotina de processamento histológico para inclusão em resina e obtenção de secções de 3 µm, as quais foram coradas com hematoxilina/eosina. No tecido hepático, mensurou-se a densidade volumétrica de micro e macrovesículas lipídicas, de macrófagos, de necrose. No tecido renal, mensurou-se a densidade volumétrica e área média dos glomérulos. Para análises estatísticas foi realizado o teste Neuman-Keuls para múltiplas comparações (p<0.05). O extrato da folha de *M. indica* apresentou teores de fenóis totais, flavonoides e de mangiferina equivalentes a 212,7 ± 10,0 mg EAG/ g de extrato seco, 90,3 ± 1,32 mg ERT/ g e de 120 mg/ g de extrato seco, respectivamente. No ensaio do DPPH, o extrato da folha de *M. indica* apresentou um IC₅₀ de 5,2. No ensaio biológico utilizando os camundongos apoE^{-/-}, os tratamentos com extrato da folha de *M. indica* e com a mangiferina isolada não afetaram os níveis sanguíneos de glicose, colesterol total, colesterol HDL, triacilgliceróis e alanina aminotransferase, bem como o percentual de deposição lipídica no arco aórtico, as atividades antioxidantes das SOD e da CAT hepáticas e renais e a expressão hepática da FSP-27. Apenas o tratamento com mangiferina promoveu aumento dos níveis séricos da aspartato aminotransferase e aumentou a densidade volumétrica e área média dos glomérulos. Tanto o tratamento com mangiferina como os tratamentos com ambas as doses do extrato da folha de *M. indica* promoveram redução da densidade volumétrica de macrogotículas, de macrófagos, de necrose no tecido hepático. Concluiu-se que, os tratamentos com extrato de *M. indica* e mangiferina, na presente condição experimental, foram ineficazes em retardar a progressão da lesão aterosclerótica, mas capazes de minimizar

as alterações histopatológicas hepáticas, independentemente de alterações nas atividades de enzimas antioxidantes e da expressão da FSP-27.

ABSTRACT

ARAÚJO, Bruna Moraes, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, september, 2012, **Bioactivities of mango leaf extract (*Mangifera indica*, variedade Ubá) and mangiferin in ApoE^{-/-} mice**. Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-advisers: Maria do Carmo Gouveia Peluzio and Sônia Machado Rocha Ribeiro.

Mangifera indica L. leaf extracts are an important source of phenolic compounds, especially mangiferin, a compound that exhibits antidiabetic, hypolipidemic, anti-oxidant and anti-inflammatory activities. This study aimed to characterize *M. indica* leaf extract, comparing it with stem bark extract and to evaluate the bioactivities of mangiferin and ethanolic extract of *M. indica* leaf in ApoE^{-/-} mice. Dried extracts of *M. indica* leaf and stem bark were obtained by percolation with ethanol. Mangiferin was obtained by extraction and purification process carried out from *M. indica* leaves, been identified by HPLC and diode array spectroscopy. The detection of secondary metabolites classes in *M. indica* leaf and stem bark extracts were performed by thin layer chromatography. Total phenols and flavonoids contents were estimated by spectrophotometry, respectively, at 760 nm, using Folin-Ciocalteu reagent, and at 420 nm, using metanolic solution of aluminium chloride hexahydrate. The both extracts antioxidant activities *in vitro* were determined by colorimetric method of free stable radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). The quantification of mangiferin in the *M. indica* leaf extract were performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Fifteen-week old ApoE^{-/-} mice were divided in 4 groups according to the treatment: control - vehicle (dimethyl sulfoxide); E200 - 200 mg/kg/day *M. indica* leaf extract; E400 - 400 mg/kg/day *M. indica* leaf extract, M40 - 40 mg/kg/day mangiferin. Administrations of vehicle, extracts and mangiferin were performed every day by gavage during 8 weeks. Blood parameters were measured using enzymatic kits and atherosclerotic lesions were evaluated by *en face* method, measuring the lipid deposition area stained with Sudan IV. Hepatic and renal catalase activities were evaluated by H₂O₂ decomposition rate measured spectrophotometrically from changes in absorbance at 240 nm. Hepatic and renal superoxide dismutase activities

were measured by the method that involves generation of superoxide by pyrogallol autoxidation and the inhibition of superoxide-dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Hepatic gene expression of fat-specific protein 27 (FSP-27) were quantified by RT-PCR. Liver and renal fragments were fixed in Karnowsky solution and submitted to a routine histologic processing and 3µm-sections were stained with hematoxylin and eosin. Volumetric density of micro and macrovesicular steatosis, macrophages and necrosis were measured in liver. Volumetric density of glomerulus and average glomerular area were measured in kidney. Statistical analysis were performed using Neuman-Keuls multiple comparisons test ($p < 0.05$). The *M. indica* leaf extract presented the following values of total phenols, flavonoids and mangiferin: $212,7 \pm 10,0$ mg EAG/ g dry extract, $90,3 \pm 1,32$ mg ERT/ g dry extract and 120 mg/ dry extract, respectively. In the DPPH assay, the *M. indica* leaf extract presented a IC_{50} 5,2. In the bioassay using apoE^{-/-} mice, *M. indica* leaf extract and isolated mangiferin treatments had no effect on blood levels of glucose, total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and alanine aminotransferase, as well as on the percentage of aortic lipid deposition, on SOD and CAT activities and on FSP-27 hepatic gene expression. Only the isolated mangiferin treatment increased the serum levels of aspartate aminotransferase and increased the glomerular volumetric density and the average area of the glomeruli. Mangiferin and *M. indica* leaf extract treatments promoted reduction in volumetric density of macro-lipid droplets, macrophages and necrosis in liver. It was concluded that the *M. indica* and mangiferin treatments, in this experimental condition, were ineffective in retarding the progression of atherosclerotic lesions, but they could minimize liver histopathological features, regardless of changes in the antioxidant enzymes activities and in the FSP-27 hepatic gene expression.

INTRODUÇÃO

A *Mangifera indica* L. (mangueira) tem grande importância econômica na comercialização das frutas e é comumente explorada como planta medicinal em Cuba, Índia e África. Em Cuba, a casca de *M. indica* é utilizada na produção, em escala industrial, de um extrato comercializado como suplemento nutricional (Vimang®) que apresenta propriedades antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias e imunomodulatórias atribuídas em parte ao seu alto conteúdo de compostos fenólicos, em especial, à mangiferina. As folhas de *M. indica* também são importante fonte destes compostos, embora estudos da bioatividade de extratos obtidos das folhas ainda sejam pouco documentados.

O interesse pelo estudo dos potenciais terapêuticos de compostos fenólicos tem crescido, de acordo com as evidências epidemiológicas que apontam uma correlação inversa entre o consumo de alimentos e bebidas ricos em tais compostos e a incidência de doenças crônicas não-transmissíveis, dentre elas as desordens cardiovasculares, que representam a principal causa de morte mundialmente.

A aterosclerose, principal alteração envolvida nas desordens cardiovasculares, compreende um processo inflamatório progressivo das artérias de grande e médio calibre, primariamente relacionado ao acúmulo subendotelial de lipídios, que envolve uma complexa interação entre estresse oxidativo, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) e estímulos proinflamatórios que desencadeiam disfunção endotelial. Inúmeros estudos *in vivo* têm evidenciado o potencial antiaterosclerótico de alguns compostos fenólicos, relacionado a mecanismos hipolipemiantes, antioxidantes e anti-inflamatórios.

Embora estudos *in vivo* tenham demonstrado que a mangiferina atua benéficamente sobre fatores de risco cardiovasculares, como a hiperglicemia e dislipidemia e, ainda, minimiza o estresse oxidativo e regula a expressão de fatores pró e anti-inflamatórios, o seu potencial antiaterosclerótico ainda não foi investigado.

Dentre os modelos experimentais para estudo da aterosclerose, os camundongos deficientes em apoproteína E (camundongos ApoE^{-/-}) têm

sido amplamente utilizados. Estes animais apresentam hipercolesterolemia severa devido à deficiente remoção das lipoproteínas remanescentes no plasma e desenvolvem lesões ateroscleróticas muito similares às observadas em humanos. Adicionalmente, foi demonstrado que estes animais apresentaram alterações degenerativas hepáticas e renais.

O presente estudo teve por objetivo investigar a bioatividade do extrato da folha de *M. indica*, variedade Ubá e da mangiferina em camundongos ApoE^{-/-}, avaliando seus efeitos sobre a lesão aterosclerótica, sobre metabólitos e enzimas séricos relacionados e sobre possíveis alterações nos tecidos hepático e renal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Mangifera indica* L. (mangueira)

A *M. indica* é uma espécie pertencente à família *Anacardiaceae*, nativa do sudeste asiático, mais precisamente da Índia, sendo cultivada há mais de quatro mil anos nesta região. Foi introduzida no século XVI, pelos portugueses, nas costas leste e oeste da África, e depois, na América, chegando ao Brasil em 1700 (Camargo-Filho, 2004).

O seu fruto (manga) tem grande valor econômico nos mercados brasileiro e internacional (Martim, 2006). A manga é a sexta mais importante fruta brasileira em área colhida, com 75,2 mil hectares, e a terceira em volume de exportação com 124,6 mil toneladas em 2010 (MAPA, 2011). O Brasil ocupa o sétimo lugar entre os produtores mundiais de manga (EMBRAPA, 2012). A produção concentra-se no nordeste e sudeste brasileiro, com destaque, nesta ordem de importância, para os estados da Bahia, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais (IBGE, 2012).

A principal variedade comercializada no mercado interno brasileiro é a norte-americana Tommy Atkins, que representa 79% da área plantada no País (Galli, 2008). No Estado de Minas Gerais, as variedades para consumo *in natura* mais cultivadas são: Tommy Atkins, Haden e Palmer. Essas variedades são produzidas em plantios planejados e, em grande parte das plantações, através da técnica de indução floral, que permite a produção da fruta durante o ano todo (Araújo, 2004). A variedade Ubá, por sua vez, tem sido utilizada especialmente na agroindústria da Zona da Mata mineira para fabricação de sucos e polpas (Ramos *et al.*, 2005).

Em paralelo à expansão do comércio de manga *in natura*, verifica-se, em nível mundial, o aumento da demanda pela manga processada (FAO, 2009). No Brasil, a agroindústria de suco apresenta taxa de expansão anual superior a 15% (Vilela *et al.*, 2006). Estes dados aumentam a perspectiva de expansão do cultivo da manga Ubá na Zona da Mata mineira, já que é uma variedade adequada para industrialização.

A manga é considerada uma importante fonte de ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos (Shieber *et al.*, 2000), os quais têm sido

relacionados à baixa incidência de doenças crônicas, especialmente câncer e doenças cardiovasculares (Slavin e Lloyd, 2012). Foi relatado que a manga Ubá apresenta altos teores destes componentes, superando outras variedades cultivadas em Minas Gerais (Ribeiro *et al.*, 2007). Esta informação agrega valor à variedade Ubá, podendo constituir fator de incentivo à expansão do seu cultivo na Zona da Mata Mineira.

Além da sua importância econômica na comercialização de frutas, a *M. indica* tem sido amplamente utilizada como planta medicinal. O uso tradicional de diferentes partes da mangueira foi relatado no tratamento de disenteria, diarreia, asma, verminoses, diabetes, etc (Nadkarni, 1954; Singh, 1986; Shankar e Vankataramn, 2003). Em Cuba, o extrato aquoso da casca de *M. indica* é produzido em escala industrial e comercializado como suplemento nutricional (Vimang®) com propriedades antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias e imunomodulatórias, evidenciadas em inúmeros estudos pré-clínicos e em alguns ensaios clínicos. O uso do Vimang® foi documentado em mais de 7000 pacientes, como adjuvante no tratamento de pacientes cancerosos, diabéticos, portadores de hiperplasia benigna de próstata, de dermatites ou lúpus eritematoso (Núñez-Selléz *et al.*, 2007). O Vimang® apresenta elevados teores de compostos fenólicos, principalmente mangiferina. Há indicações de que a mangiferina isolada reproduz várias das atividades farmacológicas do Vimang®, embora não com a mesma intensidade que o próprio suplemento, mostrando um sinergismo entre os seus diversos componentes: compostos fenólicos, terpenóides, sesquiterpenos e microelementos (Masibo *et al.*, 2010).

Dentre as diferentes partes de *M. indica*, a folha representa uma das mais importantes fontes de compostos fenólicos e mangiferina, inclusive superando a casca, segundo investigação fitoquímica de diferentes cultivares produzidos no Brasil (Barreto *et al.*, 2008). Apesar do seu alto conteúdo de mangiferina e outros compostos fenólicos, estudos da bioatividade do extrato da folha *M. indica* ainda são pouco documentados, restringindo-se a pesquisas *in vitro* evidenciando suas propriedades antioxidantes, anti-apoptótica e antibacteriana (Bbosa *et al.*, 2007; Olabinri *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2009; Badmus *et al.*, 2011) e a pesquisas *in vivo*

evidenciando atividades gastroprotetora (Severi *et al.*, 2009) e hipoglicemiante (Sharma *et al.*, 1997; Aderibigbe *et al.*, 1999 e 2001; Bhowmik *et al.*, 2009). Vale destacar que, em estudos de toxicidade aguda, não houve morte ou sinais e sintomas aparentes de toxicidade em ratos saudáveis que receberam doses únicas de 464 a 4640 mg/kg do extrato etanólico de folhas de *M. indica*, administradas por gavagem (Sharma *et al.*, 1997) ou que receberam dose oral de 5 mg/kg, única ou repetida (14 dias), de decocção aquosa das folhas de *M. indica* (Severi *et al.*, 2009).

2.2. Mangiferina

A mangiferina é um composto fenólico da classe das xantonas, quimicamente denominada 1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-beta-D-glicosídeo (Fig .1) (Aritomi e Kawasaki, 1969). Este composto está amplamente distribuído em vegetais superiores das famílias Gentianaceae e Anacardiaceae (Pardo-Andreu *et al.*, 2005). De acordo com Smith and Harborne (1971) e Sutanbawa (1980), a distribuição e biogênese da mangiferina está mais relacionada aos flavonóides do que às demais xantonas.

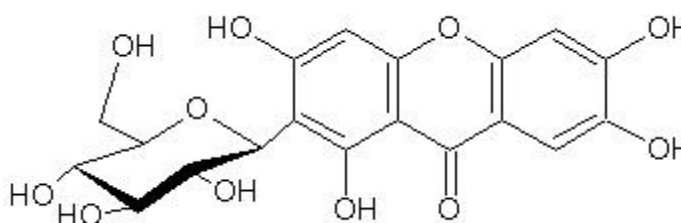


Figura 1. Estrutura da mangiferina, 1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-beta-D-glicosídeo

As bioatividades da mangiferina têm sido amplamente documentada (Tabela 1). De acordo com os estudos *in vivo* as faixas terapêuticas da mangiferina variaram de 10 a 250 mg/kg, dependendo do modelo experimental e dos parâmetros avaliados. Em estudo preliminar de toxicidade aguda em ratos saudáveis, a administração intraperitoneal de doses únicas (100-1000 mg/kg) de mangiferina, por 60 dias, não produziu

efeitos letais ou sinais clínicos de toxicidade, indicando que a LD₅₀ estaria acima de 1000 mg/kg (Prabhu *et al.*, 2006).

Tabela 1 - Bioatividades da mangiferina em estudos *in vitro* e *in vivo*

Estudos <i>in vitro</i>	
Bioatividade	Referências Bibliográficas
anti-inflamatória/ imunomodulatória	García <i>et al.</i> , 2002; Garrido <i>et al.</i> , 2004; Sarkar <i>et al.</i> , 2004; Leiro <i>et al.</i> , 2004 ^a ; Leiro <i>et al.</i> , 2004 ^b ; Béltran <i>et al.</i> , 2004
Antioxidante	Sato <i>et al.</i> , 1992; Ghosal <i>et al.</i> , 1996. Dar <i>et al.</i> , 2005; Amazzal <i>et al.</i> , 2007; Rodeiro <i>et al.</i> , 2008; Lemus-Molina <i>et al.</i> 2009
Antitumoral	Shong <i>et al.</i> , 2010; Shoji <i>et al.</i> , 2011
Antiviral	Zheng and Lu, 1990; Zhu <i>et al.</i> , 1993; Yoosook <i>et al.</i> , 2000
Citoprotetora	Amazzal <i>et al.</i> , 2007; Rao <i>et al.</i> , 2009. Das <i>et al.</i> , 2011; Kaivalya <i>et al.</i> 2011
Hepatoprotetora	Rodeiro <i>et al.</i> , 2008
Neuroprotetora	Lemus-Molina <i>et al.</i> , 2009
Estudos <i>in vivo</i>	
Bioatividade	Referências Bibliográficas
Analgésica	Dar <i>et al.</i> , 2005
antidiabética	Ichiki <i>et al.</i> , 1998; Miura <i>et al.</i> , 2001 ^a ; Muruganandan <i>et al.</i> , 2005; Dineshkumar <i>et al.</i> , 2010
anti-inflamatória/ imunomodulatória	García <i>et al.</i> , 2002; Garrido <i>et al.</i> , 2004; Prabhu <i>et al.</i> , 2009; Carvalho <i>et al.</i> , 2009
anti-oxidante	Sánchez <i>et al.</i> , 2000; Muruganandan <i>et al.</i> , 2002; Prabhu <i>et al.</i> , 2006; Pardo-Andreu <i>et al.</i> , 2008; Roderio <i>et al.</i> , 2008; Lemus-Molina <i>et al.</i> , 2009; Li <i>et al.</i> , 2010; Viswanadhet <i>et al.</i> , 2010
cardioprotetora	Nair e Shyamala Devi, 2006; Prabhu <i>et al.</i> , 2006; Prabhu <i>et al.</i> , 2009; Muruganandan <i>et al.</i> , 2002
Gastroprotetora	Carvalho <i>et al.</i> , 2007
hepatoprotetora	Pardo-Andreu <i>et al.</i> , 2008 Das <i>et al.</i> , 2012
hipolipidemiante	Miura <i>et al.</i> , 2001b; Muruganandan <i>et al.</i> , 2005; Nair e Shyamala Devi, 2006; Pardo-Andreu <i>et al.</i> , 2008; Guo <i>et al.</i> , 2011; Niu <i>et al.</i> , 2012
nefroprotetora	Muruganandan <i>et al.</i> , 2002; Hu <i>et al.</i> , 2010; Li <i>et al.</i> , 2010; Ghosh <i>et al.</i> , 2012
neuroprotetora	Gottlieb <i>et al.</i> , 2006; Campos-Esparza <i>et al.</i> , 2009; Lemus-Molina <i>et al.</i> , 2009

A seguir serão descritas as evidências dos potenciais antidiabético, hipolipidemiante, antioxidante, anti-inflamatório e imunomodulatório da

mangiferina, tendo em vista a relevância destas propriedades no contexto das desordens cardiovasculares.

2.2.1. Potencial antidiabético

A diabetes, desordem metabólica associada à hiperglicemia, cuja patogênese envolve alterações na secreção de insulina ou nas ações da insulina (Dinneen, 2006), representa um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Indivíduos diabéticos apresentam um risco para doença coronariana de 4 a 10 vezes maior do que indivíduos não diabéticos. Há evidências de que o controle da glicemia no paciente diabético reduz a incidência de eventos cardiovasculares (Mazzone *et al.*, 2010).

Os efeitos antidiabéticos e hipoglicemiantes da mangiferina têm sido investigados em animais diabéticos e animais saudáveis (normoglicêmicos). Em camundongos KK-Ay geneticamente diabéticos (tipo II) ou ratos com diabetes (tipo II) induzida por estreptozotocina, as administrações de mangiferina em doses única (Ichiki *et al.*, 1998) ou repetida (Miura *et al.*, 2001^a; Muruganandan *et al.*, 2005; Dineshkumar *et al.*, 2010), variando de 10 a 90mg/kg, apresentaram consideráveis efeitos antihiperglicemiantes. Estes efeitos foram acompanhados de redução da insulinemia (Ichiki *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2001^a) e de melhora da tolerância à insulina (Miura *et al.*, 2001^a). Por outro lado, em ratos com diabetes tipo I camundongos ou ratos saudáveis, a mangiferina não afetou a glicemia de jejum (Ichiki *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2001^a; Muruganandan *et al.*, 2005; Dineshkumar *et al.*, 2010), embora sua administração repetida tenha melhorado a tolerância à glicose (Muruganandan *et al.*, 2005).

As terapias convencionais para o tratamento da diabetes tipo II incluem estimulação endógena da secreção de insulina, indução da ação da insulina sobre os tecidos-alvo e inibição da atividade das enzimas digestivas α -amilases e α -glicosidases (Rang *et al.*, 2003). De acordo com estudos *in vitro*, pelo menos dois mecanismos poderiam explicar os efeitos antihiperglicemiantes da mangiferina anteriormente relatados. Um deles seria a inibição da atividade das α -glicosidases que resultaria em retardo na

absorção intestinal de glicose (Dineshkumar *et al.*; 2010). O outro seria a indução da expressão e translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) relacionada à ativação da proteína quinase ativada por 5'-AMP e doPPAR- γ , promovendo aumento da captação periférica de glicose (Girón *et al.*, 2009). Estudos *in vivo* devem ser conduzidos para confirmação destes mecanismos extrapancreáticos de regulação da glicemia pela mangiferina. Possíveis mecanismos pancreáticos, até então não documentados, também devem ser investigados.

2.2.2. Potencial hipolipemiante

Elevados níveis circulantes de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de triacilglicerois, assim como baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) são considerados fatores de risco cardiovascular independentes e representam alvos terapêuticos essenciais no manejo do paciente de risco cardiovascular (Czirak *et al.*, 2008)

Diversos estudos investigaram o potencial hipolipemiante da mangiferina em diferentes espécies animais e modelos de indução de dislipidemia, com doses do composto variando entre 10 a 150 mg/kg (Muruganandan *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2006; Miura *et al.*, 2001^b; Pardo-Andreuet *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2012). Em um dos estudos, baixas doses de mangiferina (10-20 mg/kg) foram suficientes para reduzir tanto os níveis séricos de triacilglicerois quanto os de colesterol total, além de aumentar os níveis de colesterol HDL (Muruganandan *et al.*, 2005). Em todos os estudos que dosaram os níveis séricos de triacilglicerois, houve alguma melhor adeste parâmetro pela administração da mangiferina. No entanto, enquanto doses mínimas de mangiferina (10-20 mg/kg) foram suficientes para produzir tal efeito em ratos com dislipidemia associada à diabetes induzida por estreptozotocina (Muruganandan *et al.*, 2005), somente doses acima de 100 mg/kg ou a partir de 150 mg/kg mostraram-se eficientes, respectivamente, em hamsters e ratos com dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica (Guo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2012). No que diz respeito aos níveis séricos de colesterol total, a mangiferina promoveu a sua redução em camundongos sob dieta hiperlipídica (Miura *et al.*, 2001^b) e em ratos com

dislipidemia associada à diabetes induzida por estreptozotocina (Muruganandan *et al.*, 2005) ou com dislipidemia associada à toxicidade por isoproterenol (Nair *et al.*, 2006), mas não em ratos (Niu *et al.*, 2012) e hamsters (Guo *et al.*, 2011) sob dieta hiperlipídica, nem em camundongos LDLr^{-/-} (Pardo-Andreuet *et al.*, 2008). Estas diferenças de efeitos da mangiferina sobre o colesterol total, não seriam explicadas pelas doses utilizadas. Ao que tudo indica o modelo de indução de dislipidemia e a espécie animal utilizada constituíram variáveis decisivas para os efeitos hipolipemiantes da mangiferina, especialmente sobre o colesterol total.

Um dos mecanismos hipolipemiantes da mangiferina parece envolver a modulação da expressão hepática de genes envolvidos na oxidação lipídica e na lipogênese, mediada em parte pela via da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), a partir do aumento da relação AMP/ATP (Guo *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2012). Outros mecanismos hepáticos ou extra-hepáticos ainda não foram estudados. Seria interessante investigar os efeitos da administração da mangiferina sobre a síntese e excreção do colesterol, como também sobre a digestão e absorção intestinal de lipídios.

2.2.3. Potencial antioxidante

Evidências crescentes apontam o papel crucial de concentrações suprafisiológicas de espécies reativas de oxigênio (ERO) no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (De Rosas *et al.*, 2010). De acordo com um estudo recente, níveis séricos elevados de ERO são preditivos de eventos cardiovasculares em pacientes com doença coronariana (Vassalee *et al.* 2012). Sendo assim, as propriedades antioxidantes da mangiferina descritas a seguir ampliam as perspectivas de um possível benefício deste composto como adjuvante na terapia antiaterogênica.

O potencial antioxidante da mangiferina tem sido amplamente investigado, como se observa na Tabela 1. Estudos *in vitro*, utilizando testes do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), da hipoxantina/xantina oxidase (HX/XO), da habilidade ferro-redutora plasmática (FRAP) e da capacidade de absorvância de radicais oxigênio (ORAC) evidenciaram que a

mangiferina apresenta potente atividade antioxidante, superando não apenas as atividades dos antioxidantes consagrados ácido ascórbico e vitamina E, como também as atividades dos compostos fenólicos quercetina, metil galato, ácido gálico e penta-O-galoil-glicosídeo (Barreto *et al.*, 2008, Stoloiva *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos utilizando diferentes culturas celulares sob estímulos nocivos variados, confirmaram o potencial antioxidante da mangiferina (Amazzal *et al.*, 2007; Rodeiro *et al.*, 2008; Lemus-Molina *et al.* 2009).

Inicialmente, a atividade antioxidante da mangiferina foi atribuída à sua porção catecol capaz de neutralizar radicais livres e formar complexos estáveis com o ferro (Sato *et al.*, 1992; Ghosal *et al.*, 1996. Dar *et al.*, 2005). No entanto, estudos recentes evidenciaram que a mangiferina apresenta baixa biodisponibilidade oral (Bok *et al.*; 2008; Han *et al.*, 2010) e que a sua glucuronidação no metabolismo de fase II resulta na alteração do arranjo na porção catecol e conseqüentemente na perda da capacidade de neutralizar radicais livres e quelar o ferro (Merwe *et al.*, 2012). Sendo assim, é improvável que os mecanismos antioxidantes diretos descritos para a mangiferina em ensaios *in vitro* possam efetivamente ocorrer no organismo animal.

Tem sido proposto que os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos, em condições de estresse oxidativo no organismo animal e humano, estejam mais ligados a um efeito antioxidante indireto relacionado à ativação do sistema antioxidante endógeno, do que a uma ação direta sobre os radicais livres e íons metálicos (Masella *et al.*, 2005). Corroborando com a premissa de que o potencial antioxidante da mangiferina no organismo animal ocorra por meio de mecanismos antioxidantes indiretos, estudos *in vivo* evidenciaram que a administração da mangiferina, em doses variando entre 10 a 100mg/kg, oferece proteção contra dano tecidual oxidativo relacionado ao aumento das atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GPT, GR) e dos níveis plasmáticos de antioxidantes não enzimáticos endógenos (ceruplasmina, vitamina C, vitamina E, glutatona) (Muruganandan *et al.*, 2002; Gottlieb *et al.*, 2006; Prabhu *et al.* 2006; Viswanadh *et al.*, 2010).

Os mecanismos moleculares pelos quais a mangiferina regula o sistema antioxidante endógeno em diferentes condições experimentais ainda não são conhecidos. Um dos mecanismos já demonstrados *in vivo* para a regulação do sistema de defesa antioxidante por alguns compostos fenólicos como ácido gálico, ácido p-cumárico e ácido ferúlico parece envolver a ativação do fator relacionado à eritróide-2 (Nrf2), que se liga aos elementos de resposta antioxidante situados na região promotora de genes codificantes de enzimas antioxidantes (Crozier *et al.*, 2009).Recentemente, foi demonstrado, *in vitro*, que a mangiferina também é capaz de induzir a expressão protéica e a translocação do Nrf2 (Das *et al.*, 2012), embora este mecanismo precise ser confirmado *in vivo*.

2.2.4. Potencial anti-inflamatório e imunomodulatório

O potencial anti-inflamatório e imunomodulatório da mangiferina tem sido investigado em diversas condições experimentais. De acordo com estudos *in vitro*, a mangiferina é capaz de inibir a proliferação e ativação de macrófagos e de células T e de modular a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), inibindo a expressão de fatores pro-inflamatórios [fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α),o receptor-1 do fator de necrose tumoral (TNF-R1),as enzimas ciclooxigenase-2 (COX₂) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), as interleucinas 1, 6 e 12 (IL-1, IL-6, IL-12) , as moléculas de adesão vascular-1 e intercelular-1 (VCAM-1, ICAM-1) e os fatores estimuladores de colônias de granulócitos, de macrófagos e de macrófagos-granulóticos (G-CSF, M-CSF, GM-CSF)] e aumentando a expressão fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), que tem papel anti-inflamatório(Leiro *et al.*, 2004^a; Garrido *et al.* 2004; Leiro *et al.*, 2004^b; Sarkar *et al.* 2004; Garrido *et al.*, 2005).

Das respostas acima, várias foram reproduzidas em diferentes condições experimentais *in vivo*. A mangiferina inibiu a migração, proliferação e ativação de macrófagos no exsudato peritoneal induzido previamente por tioglicolato (García *et al.*, 2002) e reduziu os níveis plasmáticos de TNF- α em ratos submetidos a choque séptico (Garrido *et al.*, 2004) ou com lesão do miocárdio induzida por isoproterenol (Prabhu *et al.*, 2009). Em ratos com dano cerebral, a mangiferina promoveu, de maneira

dose-dependente, redução dos níveis plasmáticos de IL-1 β e, no tecido cerebral, a inibição da ativação da via NF- κ B e redução da expressão de TNF- α , TNF-R1, COX₂ e iNOS (Márquez *et al.*, 2011). Adicionalmente, em ratos com dano renal induzido por D-galactosamina, a mangiferina reduziu a expressão renal de TNF- α , interferon-gama (IFN- γ), IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e aumentou a de IL-10 (Das *et al.*, 2012).

A inflamação é um evento chave no desenvolvimento e progressão da aterosclerose, sendo assim, os efeitos anti-inflamatórios da mangiferina acima relatados talvez representem os mecanismos de ação de maior relevância em uma hipotética ação adjuvante na terapia antiaterogênica.

2.3. Aterosclerose

As desordens cardiovasculares representam a principal causa de morte mundialmente (WHO, 2012). Aproximadamente, três quartos de todas as mortes por desordens cardio-cerebro-vasculares são devido a ataque cardíaco ou acidente vascular encefálico decorrentes do processo aterosclerótico (Mestas e Ley, 2008).

A aterosclerose é uma condição patológica inflamatória crônica caracterizada primordialmente pelo acúmulo subendotelial de lipídios nas médias e grandes artérias (Ross, 1999b), o qual ocorre preferencialmente em locais de fluxo sanguíneo turbulento (bifurcações ou curvaturas nas artérias), uma vez que nestas regiões as células endoteliais apresentam forma e orientação que contribuem para a permeabilidade às lipoproteínas circulantes (Lusis, 2000). A patologia está associada a uma série de fatores de risco como idade, tabagismo, obesidade, hipertensão, diabetes e dislipidemia (Stocker e Keaney, 2004). Níveis circulantes de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas remanescentes ricas em triacilgliceróis são decididamente proaterogênicos, ao passo que níveis circulantes de lipoproteínas de alta densidade (HDL) são fortemente ateroprotetores (Bartner, 2005).

As lesões ateroscleróticas iniciais, denominadas estrias gordurosas, caracterizam-se essencialmente pelo acúmulo de macrófagos ricos em

lipídios (células espumosas) na túnica íntima. À medida que a doença progride, são observados aumento das áreas das lesões, caracterizado por espessamento da íntima e estreitamento do lúmen, bem como, alteração da composição das lesões. Lesões intermediárias apresentam tanto células espumosas como células musculares lisas oriundas da camada média, as quais se proliferam e secretam colágeno. Lesões avançadas apresentam um centro necrótico rico em lipídios envolvido por uma capa fibrosa, podendo também envolver calcificação e angiogênese (Lusis, 2000). A composição da placa aterosclerótica influi na sua susceptibilidade à ruptura. Placas caracterizadas por células musculares lisas envoltas por densa matriz de colágeno, com baixo conteúdo de células inflamatórias e de lipídios no centro necrótico, são relativamente estáveis. Por outro lado, placas com volumoso centro necrótico e um grande infiltrado de células espumosas, capa fibrosa frágil e fina, com pouca quantidade de colágeno, são instáveis e, portanto susceptíveis à ruptura, a qual leva à formação de trombos sobrejacentes que determinam as manifestações clínicas da aterosclerose (Lee *et al.*, 1997).

A patogênese da aterosclerose envolve uma complexa interação entre estresse oxidativo, acúmulo de LDL oxidadas e estímulos proinflamatórios que desencadeiam disfunção endotelial. O processo inflamatório marca todos os estágios da aterosclerose, da ativação endotelial à eventual ruptura da placa aterosclerótica (Libby, 2002). Este processo inicia-se principalmente em resposta a modificações estruturais endógenas, particularmente LDL oxidadas, que estimulam o sistema inato e adaptativo. A resposta inata é instigada pela ativação de monócitos e macrófagos e, subsequentemente, a resposta imune adaptativa se desenvolve contra antígenos potenciais apresentados aos linfócitos T. Células endoteliais e células musculares lisas oriundas da camada média participam do desenvolvimento da doença mediando o recrutamento e remodelamento vascular, assim como promovendo uma retroalimentação do processo inflamatório através da liberação de citocinas e quimiocinas proinflamatórias (Ait-Oufella *et al.*, 2011).

Evidências epidemiológicas têm apontado uma associação inversa entre o consumo de alimentos e bebidas ricos em compostos fenólicos e o

risco para doenças cardiovasculares (Manach *et al.*, 2005). Ensaios clínicos demonstraram os benefícios destes compostos na melhora da dislipidemia, na redução da oxidação de LDL e na regulação da expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com fatores de risco cardiovascular (Egert *et al.*, 2009; Broekhuizen *et al.*, 2011; Curtis *et al.*, 2012). Adicionalmente, inúmeros estudos utilizando camundongos apoE^{-/-} evidenciaram a eficácia de alguns compostos fenólicos em retardar a progressão da lesão aterosclerótica (Hayek *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 2006; Norata *et al.*, 2007; Loke *et al.*, 2010). Neste contexto, as propriedades hipolipemiantes, antioxidantes e anti-inflamatórias da mangiferina descritas anteriormente fundamentam a hipótese, até então não investigada, de um possível benefício deste composto em prevenir e/ou retardar a lesão aterosclerótica.

2.4. Camundongos deficientes em apolipoproteína E

Os camundongos são geralmente resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose, por transportarem a maior parte do colesterol em HDL e possuírem baixos níveis de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e LDL (Breslow, 1996; Plump *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992). Por outro lado, estes animais apresentam, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo das lipoproteínas em humanos (Hofker *et al.*, 1998).

O gene da apoproteína E (apoE) é um dos principais genes que controlam os níveis de lipídios no plasma de humanos e camundongos (Hofker *et al.*, 1998). A apoE é uma glicoproteína que compõe estruturalmente a superfície de quilomícrons, remanescentes de quilomícrons, VLDL, LDL e HDL (Marinetti, 1990; Plump *et al.*, 1992). Esta glicoproteína é sintetizada no fígado, cérebro, intestino e em outras células, como os macrófagos, e tecidos periféricos (Zhang *et al.*, 1992; Mazzone, 1996; Fazio *et al.*, 1997). Sua função primordial é atuar como ligante das lipoproteínas aos receptores de apoE do fígado ou receptores B/E do fígado e de tecidos periféricos, promovendo a remoção plasmática das lipoproteínas remanescentes (Marinetti, 1990; Alvarez-Leite, 1995).

A homozigose do alelo E2 para a apoE é responsável pela forma mais comum de dislipidemia em seres humanos, a do tipo III, a qual é caracterizada por elevação moderada da colesterolemia e da trigliceridemia e está associada ao acúmulo de remanescentes de quilomícrons e VLDL no plasma e ao desenvolvimento de doença coronariana aterosclerótica (Quintão e Nakandakare, 1997).

Camundongos deficientes em apoE (camundongos ApoE^{-/-}), gerados por recombinação homóloga de células tronco-embrionária, apresentam hipercolesterolemia severa devido ao comprometimento da remoção das lipoproteínas remanescentes no plasma e desenvolvem lesões ateroscleróticas muito similares às observadas em humanos (Hofker *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 1994).

O desenvolvimento da lesão aterosclerótica nesses animais inicia-se preferencialmente na raiz da aorta e na curvatura menor do arco aórtico, continuando nos ramos da artéria braquiocefálica, carótida comum direita, ramos da artéria mesentérica superior e renal, artéria pulmonar e principais ramos da aorta abdominal (Figura 1) (Nakashima *et al.*, 1994).

Em animais alimentados com dieta comercial, as estrias gordurosas aparecem em torno da décima semana de idade e a placa fibrosa por volta da vigésima semana. O desenvolvimento do centro necrótico e a formação de depósitos de cálcio ocorrem em animais mais velhos, especialmente acima de 32 semanas de idade (Nakashima *et al.*, 1994, Redick *et al.*, 1994). Sob dieta aterogênica, as lesões são mais extensas e progridem de forma mais acelerada. Nesta condição, as estrias gordurosas podem ser visualizadas já na oitava semana de idade e placa fibrosa na décima quinta (Nakashima *et al.*, 1994).

Em adição à hipercolesterolemia e ao desenvolvimento espontâneo de lesões ateroscleróticas, os camundongos ApoE^{-/-} desenvolvem esteatose hepática devido ao comprometimento da secreção de VLDL-triacilgliceróis pelo fígado (Kuipers *et al.*, 1996; Mesenkamp *et al.*, 2001). Recentemente, foi demonstrado que, além de acumular lipídios, o fígado desses animais apresentam alterações degenerativas progressivas caracterizadas por desorganização do parênquima hepático, edema celular generalizado, congestão de sinusóides, fibrose intersticial e acúmulo de lipofucsina nos

hepatócitos. Estas alterações foram associadas ao aumento da expressão de fatores pro-inflamatórios (IL-6, iNOS) e à redução da atividade de enzimas superóxido dismutase e catalase (SOD e CAT) (Bonomini *et al.*, 2010).

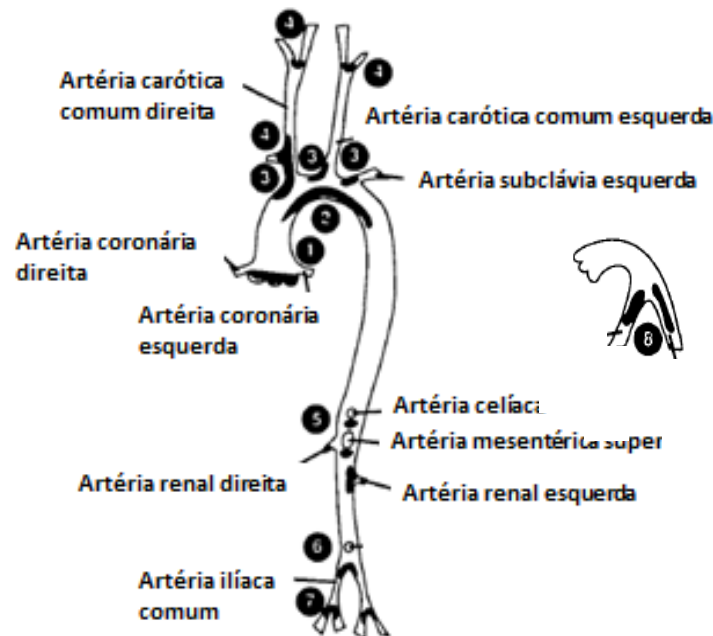


Figura 1– Sítios de predileção para desenvolvimento das lesões ateroscleróticas em camundongos ApoE^{-/-} destacados em preto. (1) raiz aórtica, na base das valvas; (2) curvatura menor do arco aórtico; (3) ramos principais do arco aórtico; (4) artéria carótida; (5) principais ramos da aorta abdominal; (6) bifurcação da aorta; (7) artéria ilíaca; (8) artéria pulmonar. Adaptado de Nakashima *et al.*, 1994.

Também foram descritas, nos camundongos ApoE^{-/-}, alterações histopatológicas renais caracterizadas por glomeruloesclerose, atrofia tubular, fibrose intersticial e formação de células espumosas, as quais foram associadas à ativação endotelial, redução da atividade da SOD e da CAT e aumento da expressão de IL-6, iNOS, TNF- α e NF- κ B (Bruneval *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2002; Bonomini *et al.*, 2010; Bonomini *et al.*, 2011).

A escolha dos camundongos ApoE^{-/-} como modelo experimental no estudo das bioatividades do extrato da folha de *M. indica* e da mangiferina, se deu considerando os seguintes fatores: validade e popularidade destes animais para estudo da aterosclerose, tendo em vista as similaridades da suas lesões com aquelas observadas em humanos; redução de custos com

dieta, tendo em vista o pequeno porte do animal e o fato de dispensarem o uso de dieta aterogênica, já que desenvolvem as lesões ateroscleróticas espontaneamente; quantidade mínima de extrato e de mangiferina demandada no experimento, também em função do pequeno porte destes animais. Por outro lado, é importante mencionar que esses animais apresentam como importante desvantagem o baixo volume sanguíneo e a pequena quantidade de amostra tecidual possíveis de serem coletados, os quais limitam consideravelmente a investigação de parâmetros bioquímicos e moleculares em um mesmo animal.

3. JUSTIFICATIVA

A escolha do estudo das bioatividades do extrato da folha de *Mangifera indica* L (Ubá) e da mangiferina em camundongos ApoE^{-/-}, se justifica pelos seguintes fatores:

- ✓ Facilidade de se obter a matéria-prima, visto que a *M. indica*(Ubá) é cultivada na Zona da Mata Mineira;
- ✓ Aprofundamento das pesquisas com a espécie *M. indica*, dando continuidade aos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Metabolismo e Fermentação por nosso grupo de pesquisa;
- ✓ Escassez de estudos das bioatividades do extrato da folha de *M. indica*, a despeito de seus elevados teores de compostos fenólicos e de mangiferina;
- ✓ Importância da confirmação de propriedades terapêuticas de *M. indica* para agregação de valor ao seu cultivo na Zona da Mata Mineira.
- ✓ Relevância de se investigar o potencial antiaterosclerótico da mangiferina, tendo em vista as suas atividades hipolipemiante, anti-inflamatória e antioxidante já documentadas;
- ✓ O interesse crescente pelo desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos e a constante busca por adjuvantes no controle dos fatores de risco cardiovasculares e no retardo do desenvolvimento da aterosclerose;

4. OBJETIVOS DO ESTUDO

O presente estudo teve por objetivo geral verificar a bioatividade do extrato da folha de *Mangifera indica* L (Ubá) e de mangiferina em camundongos ApoE^{-/-}.

Foram objetivos específicos:

- ✓ Obter os extratos etanólicos da folha e da casca de *M. indica*;
- ✓ Caracterizar fitoquimicamente o extrato da folha de *M. indica*;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato da folha de *M. indica*, comparando-o com o extrato da casca;
- ✓ Quantificar a mangiferina no extrato da folha de *M. indica*
- ✓ Isolar a mangiferina a partir das folhas de *M. indica*;
- ✓ Analisar, através de ensaio biológico, os efeitos da administração do extrato etanólico de folhas de manga Ubá e da mangiferina, sobre:
 - Metabólitos e enzimas séricos;
 - Extensão da lesão aterosclerótica;
 - Parâmetros histomorfométricos hepáticos e renais;
 - Atividade de enzimas antioxidantes hepáticas e renais;
 - Expressão gênica do marcador relacionado à esteatose hepática FSP-27

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Coleta da matéria-prima

Foram coletadas folhas e cascas de *M. indica* (Ubá) em cultivar comercial, localizado no município de Visconde do Rio Branco, MG, no mês de setembro de 2009. Folhas (2000g) e cascas (615,8 g) frescas foram submetidas à secagem em sala ventilada, em temperatura ambiente, por aproximadamente 48 horas, e trituradas em moinhos de faca.

5.2. Obtenção dos extratos da folha e da casca de *M. indica*

Os materiais vegetais secos e triturados, correspondendo a 905 g de folhas e 240 g de cascas, foram submetidos à extração exaustiva por percolação com etanol 90% P.A. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo (MA120®, Marconi, São Paulo), na temperatura máxima de 65 °C e, posteriormente, liofilizados.

5.3. Isolamento e purificação da mangiferina

O isolamento da mangiferina foi realizado de acordo com Murunganandan *et al.* (2002), com pequenas modificações. Folhas de *M. indica* secas e trituradas (406,7 g) foram desengorduradas com éter de petróleo P.A, durante 12 horas, em bateria de extração de Soxhlet (MA-188/S®, Marconi, São Paulo) e, posteriormente, submetidas à extração com etanol 98% P.A. durante 16 horas, no mesmo equipamento. O extrato etanólico obtido foi concentrado em evaporador rotativo (MA120®, Marconi, São Paulo) até completa evaporação do solvente, ressuspenso em acetato de etila, armazenado por 1 semana em geladeira até a decantação de um sólido amarelado, o qual foi separado por filtração à vácuo e lavado com éter etílico. Realizaram-se sucessivas etapas de recristalização em acetato de etila e posteriores lavagens dos sólidos retidos. O grau de pureza da mangiferina foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(CLAE), comparando-se tempo de retenção com padrão de mangiferina nas condições descritas no tópico 5.7.

5.4. Caracterização dos extratos da folha e da casca de *M. indica*

5.4.1. Prospeção fitoquímica

As análises fitoquímicas dos extratos etanólicos da folha e da casca de *M. indica* foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) com o propósito de se investigar a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: cumarinas, flavonóides, antraquinonas, taninos, alcalóides, triterpenos/esteróides e heterosídeos cardiotônicos. Para a fase estacionária, utilizaram-se placas de vidro 10x5cm e sílica gel 60GF. As fases móveis e os reveladores específicos para cada classe de metabólitos secundários, definidos de acordo com Wagner *et al.*, (1984), e os padrões de referência utilizados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Fases móveis, reveladores e padrões utilizados para detecção das diferentes classes de metabólitos secundários

Classe	Fase móvel	Revelador	Padrão
Cumarinas	Ácido acético-tolueno-éter dietílico-água (50:25:25:5)	Solução KOH 5% em etanol	Benzopirona
Flavonóides	acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético-água (55:5:5:1)	Solução AlCl ₃ 5% em etanol	Rutina
Antraquinonas	acetato de etila-metanol-água (100:17: 13)	Solução KOH 5% em etanol	1,8-diidroxiantraquina
Taninos	tolueno-butanol-ácido acético (80:40:16)	Reagente de Barton	Ácido pirogálico
Alcalóides	acetato de etila-metanol-água (100:14: 10)	Reagente de Dragendorff	Quinina

Saponinas	clorofórmio-metanol- tolueno (40:30:50)	Anisaldeído sulfúrico	18-β- glicirretínico
Heterosídeos Cardiotônicos	acetato de etila- metanol-água (81:11:8)	Reagente de Kedde	Digitoxina
Triterpenos e Esteroides	acetato de etila- metanol-água (77:15:8)	Reagente de Lieberman-Buchard	β-sistoterol

5.4.2. Quantificação de fenóis totais

A quantificação de fenóis totais nos extratos etanólicos da folha e da casca de *M. indica* foram feitas por espectrofotometria na região do visível, utilizando como reagente colorimétrico a solução de Folin–Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999).

Os extratos (1mg) foram ressuspensos em metanol até completa solubilização e transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 20mL e o volume final foi completado com água. Após homogeneização da amostra, uma alíquota de 1mL desta foi transferida para um tubo de ensaio e adicionaram-se 0,5mL do reagente de Folin- Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, Alemanha), 7,5mL de água destilada e 1 mL de Na₂CO₃ 15%, agitando-se ao final. O “branco” foi preparado de forma similar, contudo sem a adição do extrato. Após 1 hora, a absorvância das amostras foi mensurada a 760nm em espectrofotômetro (T70 UV/VIS®, PG Instruments, Inglaterra). Os teores de fenóis totais foram calculados a partir da equação da curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (1 a 3,5 µg/mL) (Figura 3) e expressos como miligrama de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

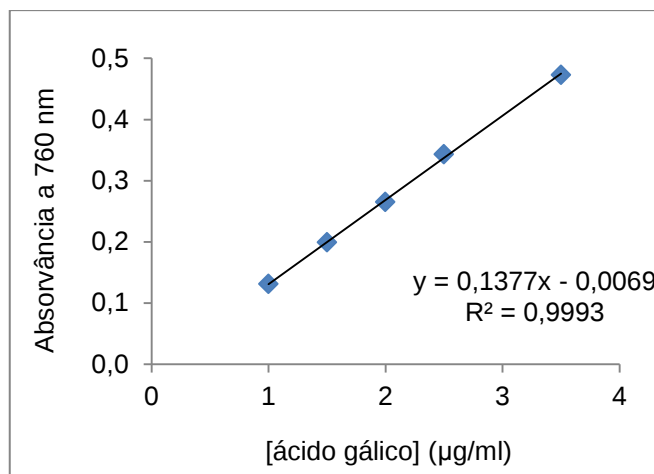


Figura3 - Curva de calibração de ácido gálico.

5.4.3. Quantificação de flavonóides totais

A quantificação de flavonóides totais nos extratos da folha e da casca de *M. indica* foram feitas por espectrofotometria na região do visível, utilizando-se o método colorimétrico com solução metanólica de cloreto de alumínio hexahidratado ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) (Vennatet *al.*, 1992). O método baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonoides em metanol, ocasionando, na análise espectrofotométrica, um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de suas absorções a 420 nm (Wollenweberet *al.*, 2008).

Os extratos (11,5 mg) foram inicialmente dissolvidos em metanol, transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 20 mL e o volume final completado com metanol. Uma alíquota de 1mL desta solução foi agitada com 0,5 mL do reagente de ácido acético, 2,5 mL de solução de cloreto de alumínio e 6 mL de metanol. O “branco” foi preparado de forma similar, contudo sem a adição do extrato. Após 15 minutos, fez-se a leitura de absorvância das amostras a 420nm em espectrofotômetro (T70 UV/VIS®, PG Instruments, Inglaterra). Os teores de flavonóides totais foram calculados a partir da equação da curva de calibração construída com padrões de rutina (2 a 40µg/mL) (Figura4) e expressos como miligrama de equivalente de rutina (ERT) por grama de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

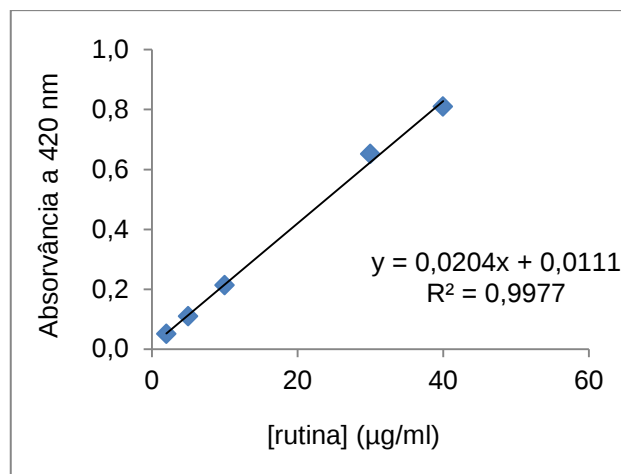


Figura 4 - Curva de calibração de rutina.

5.4.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

Tabela 3 – Volumes e massas do padrão mangiferina injetados no HPLC e áreas de picos obtidas

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

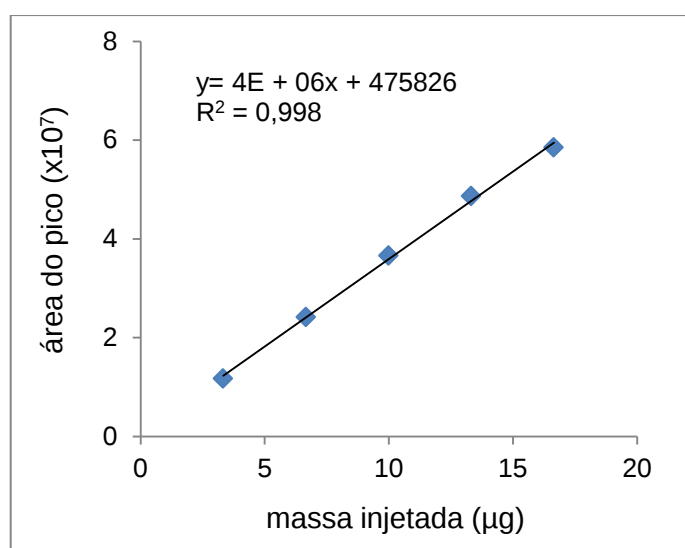


Figura 5 – Curva padrão da mangiferina e equação obtida a partir da injeção no HPLC de diferentes massas de mangiferina

5.4.5. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

As atividades antioxidantes *in vitro* dos extratos da folha e da casca de *M. indica* foram determinadas pelo método fotolorimétrico do radical livre estável orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil(DPPH), descrito por Brand-Wiliams *et al.* (1995), que se baseia na redução do radical DPPH por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm.

Em balão de 100mL, foram ressuspensos 2,4 mg do reagente de DPPH (Sigma-Aldrich®, Alemanha), com metanol PA, para obtenção de uma solução com concentração de 60 µM, utilizada no mesmo dia do seu preparo. Foram preparadas soluções a partir dos extratos liofilizados das folhas e da casca de *M. indica* de diferentes concentrações: 0,4, 0,2, 0,1,

0,05, 0,025, 0,0125 mg/mL. Uma alíquota de 50 µl de cada solução foi adicionada a 1950 µl da solução de DPPH (60µM), obtendo-se concentrações finais de extrato equivalentes a 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62 e 0,31 µg/ml. Para controle negativo, os 50 µl de solução de extrato foram substituídos por metanol e para o branco os 1950 µl da solução de DPPH foram substituídos por metanol. O meio da reação foi mantido ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, e após 30 minutos, as absorvâncias das amostras foram mensuradas à 515 nm em espectrofotômetro (T70 UV/VIS®, PG Instruments, Inglaterra). Os testes foram realizados em triplicata. A atividade antioxidante da amostra, em porcentagem de captação do DPPH (%AA), foi calculada através da equação seguinte:

$$\%AA = \frac{\text{ABS do controle} - (\text{ABS da amostra} - \text{ABS do branco})}{\text{ABS do controle}} \times 100$$

(Onde ABS representam a média das absorvâncias analisadas em triplicata)

5.5. Ensaio biológico

5.5.1. Animais e dieta

Camundongos apoE^{-/-} de ambos os sexos, com 13 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, foram mantidos no laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, em ambiente climatizado (temperatura média de 22 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram dispostos em gaiolas coletivas, separando-se machos e fêmeas. Até a décima quinta semana de idade os animais receberam ração comercial. A partir de então, a ração comercial foi substituída por dieta AIN-93M (Tabela 4) (Reeves *et al.*, 1993), confeccionadas manualmente e mantidas sob refrigeração, protegidas da luz, até o momento da utilização.

Tabela 4 – Composição da Dieta experimental

Dieta AIN-93M formulada para manutenção de roedores adultos	
Ingrediente	Quantidade (g/kg dieta)
Amido de milho	465,7
Caseína	140,0
Maltodextrina	155,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja	40,0
Celulose	50,0
Mistura mineral	35,0
Mistura vitamínica	10,0
L-cistina	1,8
Bitartarato de colina	2,5

5.5.2. Desenho experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CETEA), da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo número 3/2010.

Ao completarem 15 semanas de idade, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais cada qual com 12 animais (Tabela 5). O veículo utilizado para administração dos extratos e da mangiferina foi o dimetilsulfóxido (DMSO) (50 µl). Os tratamentos dos 4 grupos foram realizados por meio de gavagem. A escolha da dose da mangiferina foi baseada na concentração de mangiferina encontrada nos 250 mg/kg do suplemento Vimang®, frequentemente utilizados em ensaios com modelos animais.

Tabela 5 – Grupos experimentais e respectivos tratamentos

Grupos	Tratamentos
Controle	Dieta AIN-93M + veículo (DMSO)
E200	Dieta AIN-93M + 200 mg/kg de extrato de folha de <i>M. indica</i>
E400	Dieta AIN-93M + 400 mg/kg de extrato de folha de <i>M. indica</i>
M40	Dieta AIN-93M + 40 mg/kg de mangiferina

Semanalmente, foi mensurada a massa corporal e avaliada a ingestão alimentar dos animais, sendo esta cuidadosamente monitorada durante todo o período experimental por meio da mensuração da diferença entre a ração ofertada ao animal e a sobra da mesma no comedouro. Após 8 semanas de tratamento, respeitando jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados através de sangria sob anestesia com solução de xilazina (10 mg/ml) e quetamina (2 mg/ml).

5.5.3. Coleta do material biológico

Foram coletados sangue, aorta, fígados e rins. O sangue foi coletado por punção cardíaca, transferido para microtubos e centrifugado a 2400 *g*, por 10 minutos a 4 °C, para separação do soro. As aortas destinadas às análises *en face* foram fixadas em formalina de Carson. Um dos rins e o lobo caudado do fígado de cada animal foram fixados em solução de Karnovsky (1965), para análises histomorfométricas, enquanto o rim contralateral e o restante do fígado foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, para análises bioquímicas e moleculares.

5.5.4. Análise de metabólitos e enzimas séricos

Para dosagem dos parâmetros sanguíneos, foi necessário diluir o soro em solução fisiológica até completar o volume de 500 µl requerido no analisador automático. Foram dosados os seguintes parâmetros sanguíneos: colesterol total (método enzimático-colorimétrico, peroxidase), colesterol HDL (método enzimático-colorimétrico, direto), triacilgliceróis (método enzimático-colorimétrico, peroxidase), glicose (método enzimático-

colorimétrico, glicose oxidase), aspartato aminotransferase – AST (método cinético UV), alanina aminotransferase – ALP (método cinético UV). As análises foram realizadas no analisador bioquímico automático (BS200®, Mindray, China), utilizando os kits comerciais (Bioclin®, Brasil). Os valores obtidos foram corrigidos pelos fatores de diluição de cada amostra.

5.5.5. Análise quantitativa da lesão aterosclerótica

A análise quantitativa da lesão aterosclerótica nas aortas dos camundongos foi feita por mensuração do percentual de deposição lipídica segundo o método *en face* com a coloração de Sudan IV (Palinski *et al.*, 1994). As aortas previamente fixadas em formalina de Carson foram submersas em álcool a 70% por 5 minutos. Em seguida, foram coradas em solução de Sudan IV (0,5% de Sudan IV, 35% de etanol e 50% de acetona) durante 10 minutos, sob agitação constante. O excesso de solução corante foi eliminado das aortas submergindo-as em etanol 80% durante 5 minutos, sob agitação constante. As aortas foram colocadas em tampão fosfato e mantidas na geladeira, enquanto, uma por uma, foi dissecada, cortada longitudinalmente, estendida sobre uma superfície de isopor e fixada com alfinetes e fotografadas. Para captura das imagens, utilizou-se câmera digital (DSC-W55®, Sony, Japão) em posição fixa, com 7,0 mega-pixels de definição e função macro ativada. As imagens capturadas foram analisadas no programa Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, USA), utilizando-se a ferramenta *create a polygon feature* para mensuração das áreas de deposição lipídica (Figura 6). Os resultados foram expressos como percentual de deposição lipídica em relação à área total avaliada. A área total das aortas, mensurada com a mesma ferramenta, compreendeu o arco aórtico e parte da aorta descendente, abrangendo uma área de 0,3 cm².

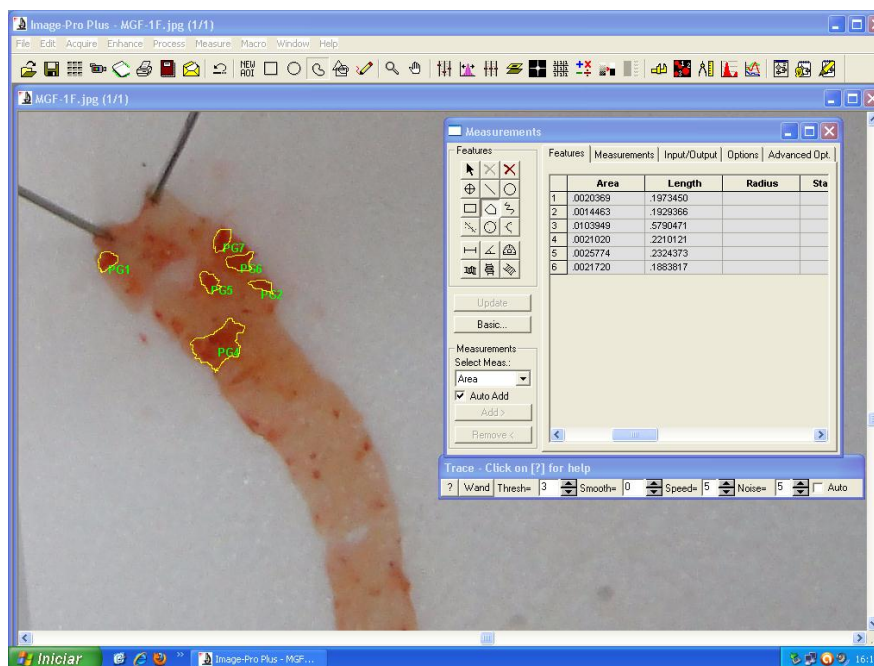


Figura 6 – Mensuração, através do programa Image Pro Plus, das áreas de deposição lipídica no tecido aórtico evidenciadas pelo corante Sudan IV.

5.5.6. Avaliação das atividades das enzimas antioxidantes hepáticas e renais

5.5.6.1. Preparo das amostras

As amostras de fígado e rim congeladas a -80°C foram utilizadas para determinação quantitativa da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. Para análises do tecido hepático, utilizaram-se 100 mg de fígado, já para as análises do tecido renal, utilizou-se um rim inteiro. Cada uma das amostras foi homogeneizada em 1 ml de tampão fosfato. Os homogeneizados foram centrifugados à 4°C por 10 minutos a 2400 g. Do sobrenadante obtido, reservou-se 300 μl para análise da atividade da SOD, e 100 μl para análise da atividade da CAT. Estas alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento das análises. O que restou das alíquotas após as análises, foi armazenado a -20°C , para posterior dosagem de proteínas totais.

5.5.6.2. Ensaio da atividade da catalase

A análise da atividade da CAT foi feita conforme método descrito por Aebi (1974), mensurando-se a taxa de decomposição de H_2O_2 , a partir da leitura das absorvâncias a 240 nm em espectrofotômetro (T70 UV/VIS®, PG Instruments, Inglaterra), utilizando-se cubetas de quartzo com volume correspondente a 1 ml. Pipetaram-se, na cubeta, 10 μ L do sobrenadante e acrescentou-se 1 mL do tampão fosfato 25 mM pH 7,4 contendo 0,16% (V/V) de H_2O_2 (30%). Registrou-se a leitura das absorvâncias nos tempos 0 e 60 segundos. Para cada amostra analisada, a etapa acima foi precedida da leitura da absorvância do branco (10 μ L do sobrenadante e 1 mL do tampão fosfato 25 mM pH 7,4 sem adição de H_2O_2), zerando-se a leitura do espectrofotômetro. As análises foram feitas em triplicata.

A diferença entre as absorvâncias médias nos tempos 0" e 60" por unidade de tempo ($\Delta A_{240}/\text{seg}$) foi definida como a unidade de CAT. Os valores obtidos foram normalizados em relação à quantidade de proteínas totais (mg) contida na alíquota (10 μ L) de amostra pipetada no ensaio, determinada pelo método de Bradford. A atividade da CAT foi determinada então da seguinte forma:

$$U_{\text{CAT}} / \text{mg ptn} = \frac{\text{abs } 0'' - \text{abs } 60''}{60 * \text{quantidade de proteínas totais na amostra}}$$

(Onde abs 0" e abs 60" representam a média das absorvâncias analisadas em triplicata nos tempos 0 e 60 segundos, respectivamente).

5.5.6.3. Ensaio da atividade da superóxido dismutase

A atividade de SOD foi determinada com base em Madesh e Balasubramanian (1998), com pequena adaptação (aumentando-se a concentração do pirogalol em 10x). O método envolve a geração de superóxido pela autooxidação do pirogalol e a redução dependente de superóxido do corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A presença de SOD no meio resulta na diminuição

dos níveis de superóxido gerados pela auto-oxidação do pirogalol. Consequentemente, a formação do sal de formazan a partir da redução do MTT pelo superóxido é inibida. Mensurando-se a absorvância do sal de formazan a 570 nm, observa-se a sua correlação inversa com a atividade da SOD. Definiu-se uma unidade de SOD ($1U_{SOD}$) como a quantidade de enzima necessária para reduzir a máxima absorvância a 570 nm do sal de formazan em 50%.

A Tabela 7 apresenta a relação dos componentes utilizados no ensaio da atividade da SOD nas condições de controle negativo, branco, padrão e meio reacional completo. No controle negativo não há qualquer redução do MTT, portanto a absorvância do meio é mínima. No padrão, ocorre redução de MTT pelos superóxidos gerados pelo pirogalol sem a presença da SOD tecidual, obtendo-se, então, a absorvância máxima do sal de formazan. No branco, evidencia-se a interferência de compostos da amostra sobre a absorvância do meio na ausência do pirogalol. No meio reacional completo, observa-se a inibição, pela SOD tecidual, da redução do MTT dependente de superóxidos gerados pelo pirogalol.

Tabela 7 – Componentes do ensaio da medida da atividade da SOD

	PBS 25 mM pH 7.4 (μl)	amostra (μl)	MTT a 1.25 mM (μl)	Pirogalol a 1 mM (μl)	DMSO (μl)
Controle negativo	144	-	6	-	200
Branco	114	30	6	-	200
Padrão	129	-	6	15	200
Meio reacional completo	99	30	6	15	200

Antes de se iniciar o ensaio, fez-se a leitura das absorvâncias dos poços da placa vazios, em leitora de microplaca (Asys UVM 340®, Biochrom, Inglaterra) a 570 nm, para descontar a interferência da própria placa. O ensaio foi, então, iniciado com a pipetagem do tampão e, depois, das amostras. Em seguida, acionando um cronômetro e utilizando pipeta

multicanal, padronizou-se o tempo de pipetagem do MTT e do pirogalol. Terminada a pipetagem dos componentes como ilustrado na Figura 7, incubou-se a placa em estufa por 5 minutos a 37°C. Após o período de incubação, respeitando-se a cronometragem anterior, pipetou-se o DMSO com a multicanal, para solubilizar o sal de formazan e interromper a reação. Fez-se o registro das absorvâncias a 570 nm. De posse das absorvâncias registradas no ensaio e descontando-se as absorvâncias da leitura dos poços vazios, obtiveram-se os resultados expressos em unidades de SOD (U_{SOD}) através da seguinte equação:

$$U_{SOD} = \frac{[(abs_P - abs_C) - (abs_A - abs_B)]}{(abs_P - abs_C) / 2}$$

onde, estão representadas as absorvâncias do padrão (abs_P), do controle negativo (abs_C), da amostra (abs_A) e do branco (abs_B).

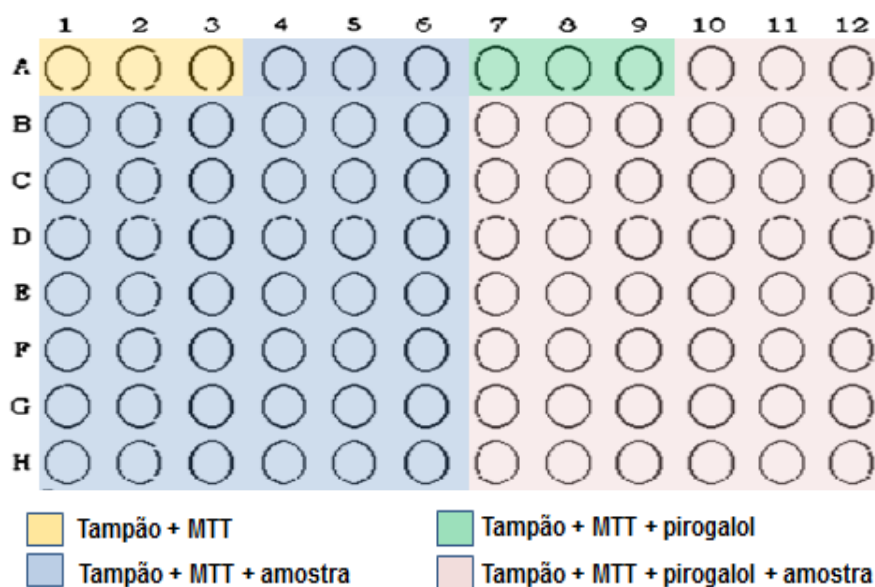


Figura 7 – Montagem da microplaca no ensaio da SOD prévia à incubação e adição do DMSO. C: controle negativo. P: controle positivo. B: branco. M: meio reacional completo

O valor encontrado a partir da equação anterior foi normalizado em relação à quantidade de proteínas totais contida na alíquota de 30 µl de amostra pipetada nos poços, obtendo-se valores expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína (U_{SOD}/mg ptn). A quantidade de proteínas totais foi determinada a partir do método de Bradford.

5.5.6.4. Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais das amostras teciduais de fígado e rim foram determinadas pelo método descrito por Bradford, utilizando como padrão albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, Alemanha) na concentração de 0,2 mg/mL (Bradford, 1976). Inicialmente preparou-se o reagente de Bradford 5X (Tabela 8), sendo este deixado em repouso por 12 horas e depois filtrado e armazenado em frasco protegido da luz. Diferentes diluições da solução de BSA (0,2mg/ml), em triplicata, foram preparadas em tubos de ensaio e acrescidas do reagente de Bradford (Tabela 9). Após 15 minutos de preparo desta solução final, fez-se a leitura das absorvâncias a 595nm em espectrofotômetro (T70 UV/VIS®, PG Instruments, Inglaterra) para obtenção de uma curva padrão (Figura 8). Partindo-se para a determinação da concentração de proteínas totais nas amostras, primeiramente diluiu-se 10 µL das amostras em 90 µL de água destilada. Desta diluição, coletou-se 20 µL, acrescentou-se 80 µL de água e finalizou-se com 900 µL de reagente de Bradford. Este procedimento foi feito em triplicata. As soluções finais foram então levadas ao espectrofotômetro para análises. O tempo transcorrido entre a pipetagem do reagente de Bradford e a leitura espectrofotométrica foi de 15 minutos.

De posse da absorvância média de cada amostra, a concentração de proteínas totais foi calculada a partir da equação $y = 4,1044x + 0,1018$, obtida a partir da curva padrão de BSA, onde y representa o valor da absorvância e x o valor da concentração protéica da amostra. O valor encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição (10x) das amostras. Tendo a concentração proteica (mg/ml) das amostras de tecido hepático e renais, calculou-se a quantidade de proteínas contidas nos volumes correspondentes às alíquotas utilizadas nas análises de SOD e CAT.

Tabela 8 - Valores para preparação de 200 mL do reagente de Bradford 5X.

Componentes	Quantidade
Cromassie Blue G-250	100 mg
Etanol95%	50ml
Ácido Fosfórico 85%	100ml
Água q.s.q	200ml

Tabela 9- Diluições da solução de BSA para preparo da curva padrão.

Solução de BSA a 0,2mg/ml (µl)	Água destilada (µl)	Reagente de Bradford (µl)	Concentração de proteína (mg/ml)
20	80	900	0,04
30	70	900	0,06
40	60	900	0,08
60	40	900	0,12
70	30	900	0,14
80	20	900	0,16
90	10	900	0,18

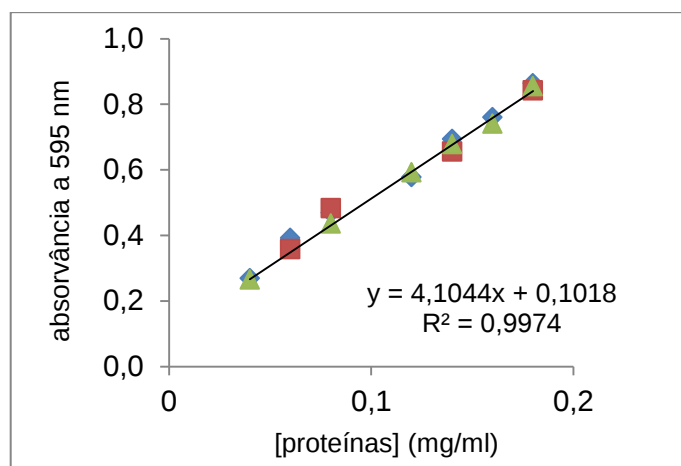


Figura 8- Curva padrão de BSA

5.5.7. Análise da expressão gênica hepática da *fat-specific protein-27* (FSP-27)

5.5.7.1. Extração, quantificação e avaliação da integridade do RNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando o sistema Trizol (Invitrogen Brasil Ltda). As amostras de fígado (cerca de 100 mg) foram maceradas com pistilo em almofariz adicionando-se nitrogênio líquido e 1 mL de trizol. O homogenato obtido foi transferido para um microtubo, o qual foi incubado no gelo por 5 minutos. Após a lise das células, o RNA foi extraído com 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) e centrifugado a 12.000g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi então coletada e transferida para outro microtubo. Adicionaram-se 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), agitou-se à temperatura ambiente por cerca de 3 minutos e armazenou-se a -20 °C por 1 hora. O RNA foi então precipitado por centrifugação a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 75% e centrifugado a 9.500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento incubado a temperatura ambiente para evaporação do etanol residual. O sedimento foi ressuscitado em 20µL de água deionizada tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato e autoclavada (água DEPC). Os microtubos foram armazenados a -80 °C para uso posterior.

A integridade dos RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1%, de acordo com o aparecimento das bandas 18S e 28S. Foram aplicados em cada canaleta 2 µL de amostra de RNA, 1 µL de tampão de carregamento (5x) e 2 µL de água DPEC (0,01%) autoclavada, deixando correr a 90V por 90min em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x. A quantificação do RNA foi feita automaticamente pipetando-se 1µl de amostra no espectrofotômetro Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

5.5.7.2. Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Brasil Ltda.). Inicialmente 2 µg de RNA pipetados em microtubos foram tratados com 2 µL de DNase I (Invitrogen, Brasil Ltda) e 1 µL de tampão completando o volume com água DEPC (0,01%) autoclavada até 10 µL. Os microtubos foram levados ao banho-maria a 37 °C por 30 minutos para ação da enzima DNase. Em seguida, adicionou-se aos microtubos 1 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para interrupção da atividade da enzima, levando-os ao banho-maria a 65 °C por 8 minutos. A seguir, acrescentou-se 1 µL de oligo dT a 100 µM e 1 µL de dNTPs a 10 µM (Invitrogen Brasil Ltda) e levaram-se os microtubos novamente ao banho-maria a 65 °C por 5 minutos. Acrescentaram-se 7 µL do mix (4 µL tampão 5x FF, 2 µL de ditioneitol (DTT) 0,1M e 1 µL de RNase Out (Invitrogen Brasil Ltda) e 1 µL de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen Brasil Ltda). Colocaram-se os microtubos em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Para inativação da enzima, levaram-se os microtubos ao banho-maria a 70 °C durante 10 minutos. Os microtubos foram armazenados a -20 °C para uso posterior.

5.5.7.3. Quantificação dos transcritos por PCR em tempo real

Utilizou-se o aparelho AB Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) para realização do ensaio. Baseado nos valores de Ct (*Cycle threshold*), que corresponde ao ponto em que a fluorescência aumenta apreciavelmente acima da fluorescência do ruído, foi realizada a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta Ct}$. A detecção foi realizada pelo sistema SYBR® Green JumpStart™ TaqReadyMix™ (Sigma-Aldrich). O gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle interno e normalização para quantificação dos transcritos alvos da proteína FSP-27.

Foram analisadas 4 amostras por grupo, quantificadas em corridas independentes, sendo cada amostra analisada em duplicata em cada placa de reação.

O meio reacional consistiu de: 2 µl do cDNA, 1,5µl da mistura dos iniciadores a 0,6µM (senso e antisenso) e 5µl do reagente SYBR® Green JumpStart™Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich), adicionou-se água deionizada autoclavada para completar o volume final de 10µl. Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras de cDNA pelo mesmo volume de água deionizada autoclavada na reação. Os iniciadores utilizados nesta reação estão listados na Tabela 10.

Tabela 10 - Iniciadores utilizados no RT-PCR

	Iniciador 5'-3'Senso	Iniciador 5'-3'Antisenso
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
FSP-27	GACTTTATTGGCTGCCTGAACG	ATCTCCTTCACGATGCGCTT

As condições de amplificação para todos os sistemas foram 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 seg e anelamento e extensão a 60°C durante 30 seg. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30 segundos, partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C.

5.5.8. Análises histomorfométricas do tecido hepático e renal

Fragmentos de fígado e de rim previamente fixados em solução de Karnowsky foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70°, 80°, 95° e 100° GL) com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, cada fragmento foi incluído em historesina (Historesin®, Leica, Alemanha), sendo posteriormente seccionados em intervalos de 10 cortes, na espessura de 3 µm, em micrótomo automático (Leica Multicut 2045®, Reichert-Jung Products, Alemanha) com navalhas de vidro. As secções obtidas foram

coradas em H&E, montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e visualizadas usando microscópio de luz (BX60®, Olympus, Japão) conectado a uma câmara digital (QColor-3®, Olympus, Japão). Usando a objetiva de 20x e zoom de 1.5 (para análises do tecido hepático) e de 1.0 (para análises do tecido renal) foram selecionados aleatoriamente 10 campos histológicos para cada animal para análises histomorfométricas. As imagens obtidas do tecido hepático tiveram como pontos de referências as veias centrilobulares, e as obtidas do tecido renal focalizaram a região cortical.

Para as análises histomorfométricas do tecido hepático, utilizou-se o software Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, USA), a partir do qual obteve-se uma grade contendo 300 intersecções que foi sobreposta a cada imagem histológica (Figura 9). Os parâmetros morfométricos de densidade volumétrica (Vv) foram calculados por meio da contagem de intersecções da grade que ocorreram sobre micro e macrogotículas de gordura, sobre macrófagos e sobre áreas de necrose, usando a razão: $Vv (\%) = PP * 100 / PT$, onde PP é o número de intersecções ocorrendo sobre o parâmetro de interesse e PT é o total de intersecções no sistema testado (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

Para as análises histomorfométricas do tecido renal, utilizou-se o mesmo software e quantificou-se a densidade volumétrica dos glomérulos a partir de uma grade contendo 266 intersecções. Adicionalmente, utilizando-se a ferramenta *create a polygon feature*, mensurou-se a área de cada glomérulo com contorno aproximadamente circular, presente nos 10 campos histológicos obtidos para cada animal (Figura 10).

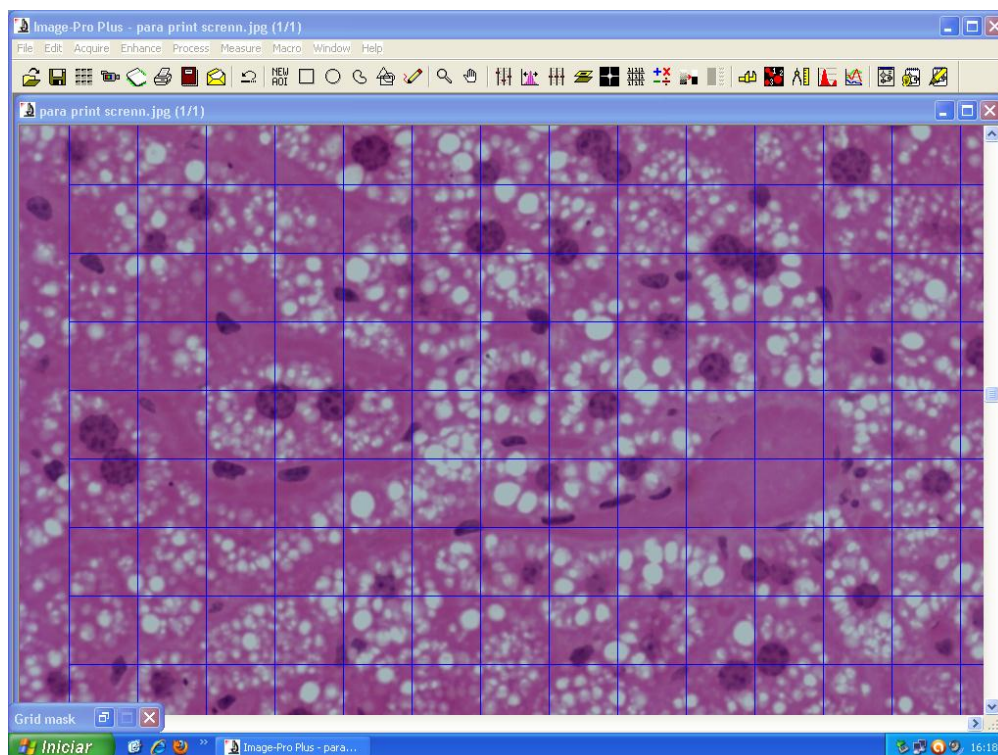


Figura 9 – Sobreposição de grade em imagem histológica para contagem de intersecções sobre os elementos de interesse

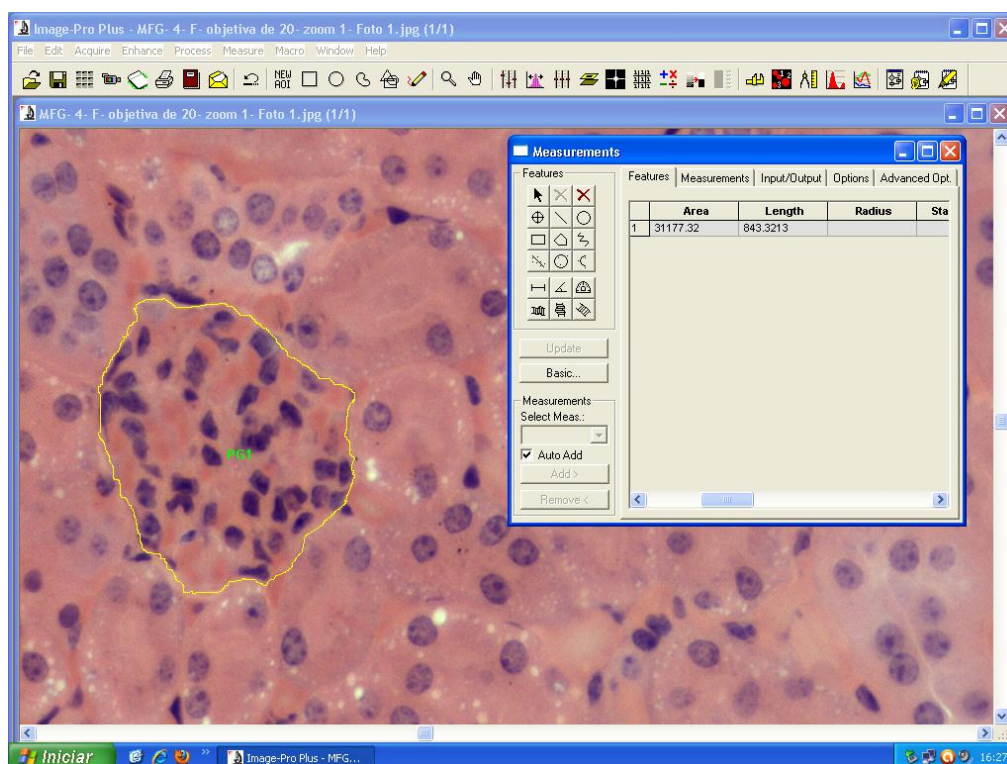


Figura 10 - Mensuração das áreas de glomerúlos, utilizando a ferramenta *create a polygon feature* do programa Image Pro Plus.

5.6. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e desvio-padrão (média±DV). Os resultados fitoquímicos foram submetidos ao teste t e aqueles obtidos no ensaio biológico foram submetidas ao teste Student Newman-Keulls (SNK), adotando-se níveis de significância de 5%. Os testes foram executados utilizando o software Graph Pad Prism 5.0® (GraphPad Software, Inc, USA).

6. RESULTADOSE DISCUSSÃO

6.1. Isolamento da mangiferina e confirmação estrutural

O processo de purificação do extrato etanólico obtido das folhas de *M. indica* forneceu 2g de mangiferina, com um rendimento de 0,5% (p/p) em relação à droga vegetal (folhas secas e trituradas). O composto apresentou cromatograma no HPLC com pico único (TR 8.2 min) e espectro UV obtido por arranjo fotodiodo compatível com padrão (Figura 9). O grau de pureza correspondeu a 73,85%.

O rendimento aqui relatado foi próximo dos rendimentos observados por Jutiviboonsuk e Sardsaengjun (2010) no processo de purificação de extratos etanólicos das folhas de 3 diferentes cultivares tailandeses de *M. indica*, os quais variaram entre 0,3 a 1% (p/p) em relação à droga vegetal.

6.2. Caracterização dos extratos da folha e da casca de *M. indica*

Os extratos liofilizados da folha (170 g) e da casca (40,6 g) de *M. indica* obtidos por percolação exaustiva com etanol 90% apresentaram, respectivamente, rendimentos de 18,8% (p/p) e 16% (p/p) em relação à droga vegetal.

Os resultados da prospecção fitoquímica dos extratos estão apresentados na Tabela 11, observando-se que as mesmas classes de metabólitos secundários foram detectadas em ambos os extratos. Cardiotônicos, saponinas e alcaloides não foram detectados, contrariando estudos prévios em que a presença destes três metabólitos secundários foi confirmada em extratos etanólicos da casca de *M. indica* (Abubakar, 2009) e a presença dos dois últimos em extratos etanólicos da folha (Bbosa *et al.*, 2007). Inúmeros fatores podem alterar a produção ou concentração de metabólitos secundários nas plantas, tais como sazonalidade, idade da planta, temperatura, disponibilidade de água, radiação UV, nutrientes do solo, altitude, composição atmosférica e dano tecidual (Gobbo-Neto *et al.*, 2007). Possivelmente, estes fatores justificam as diferenças entre os achados do presente estudo e dos estudos anteriores.

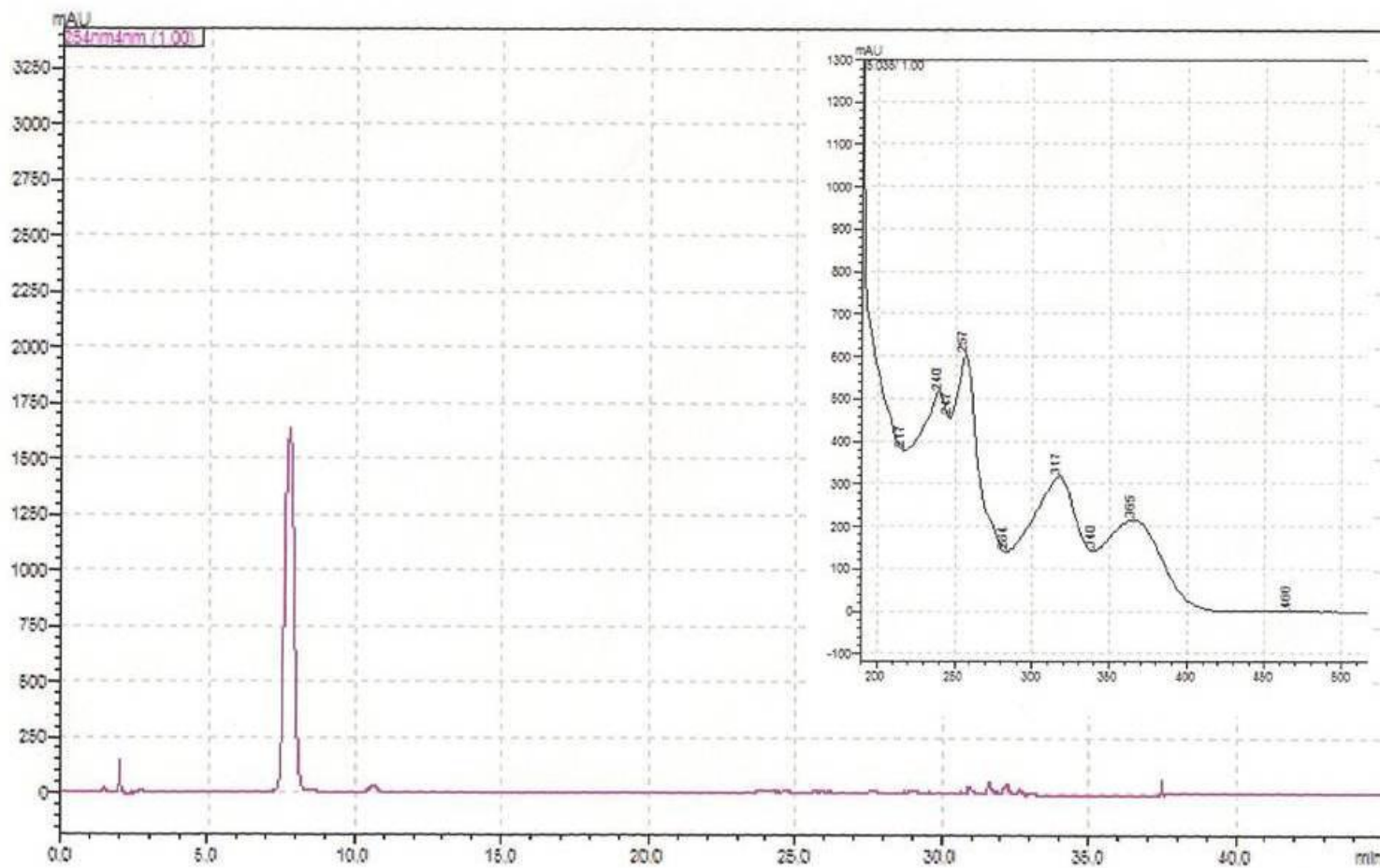


Figura 9 – Cromatograma e espectro UV da mangiferina purificada a partir de folhas de *M. indica*. Condições: detector de arranjo diodo; coluna C18; fase móvel: solvente A 0,3 % ácido acético P.A. e solvente B acetonitrila grau HPLC; gradiente: 10% de B por 5 min, 20% de B por 15, 100% de B por 15 min, 10% de B por 10 min; fluxo: 1ml/min, volume injetado: 50 µl

Tabela 11 – Prospecção fitoquímica dos extratos da folha e da casca de *M. indica*.

Classe de metabólito	Folha	Casca
Taninos	+	+
Flavonóides	+	+
Cumarinas	+	+
Cardiotônicos	-	-
Antraquinonas	+	+
Triterpenos	+	+
Saponinas	-	-
Alcalóides	-	-

Nota : (+) presente; (-) ausente.

Os teores de fenóis totais, flavonóides e mangiferina dos extratos etanólicos da casca e da folha de *M. indica*, assim como as suas atividades antioxidantes *in vitro* representadas pelos IC₅₀ (concentração do extrato necessária para reduzir em 50% a absorvância inicial do DPPH a 515 nm), são apresentados na tabela 12. As curvas de concentração dos extratos (µg/ml) versus percentual de captura do radical do DPPH são apresentadas na Figura 10.

Observou-se que o teor de flavonoides no extrato da folha de *M.indica* foi superior ao extrato da casca, por outro lado, este último apresentou maior teor de fenóis totais e maior atividade antioxidante (menor IC₅₀). Olabinri *et al.* (2009) verificaram correlação positiva entre os conteúdos de fenóis totais em extratos da folha e da casca de *M. indica* e as suas atividades antioxidantes *in vitro*. Sendo assim, a menor atividade antioxidante *in vitro* observada no extrato da folha em relação ao da casca no presente estudo possivelmente está relacionada ao seu menor conteúdo de fenóis totais.

No estudo conduzido por Barreto *et al.* (2008), dentre os 14 cultivares de *M. indica* investigados, apenas 1 deles (Embrapa-142-alfa) apresentou maior teor de fenóis totais na casca do que nas folhas, assim como aqui verificado para o cultivar Ubá. Estes pesquisadores encontraram variações

de 59,03 a 356,34 mg/g de extrato seco (média de 190,17 mg/g de extrato seco) nos teores de fenóis totais das folhas dos 14 cultivares investigados. Comparando-se estes achados com o do presente estudo, observa-se que o teor de fenóis totais das folhas da variedade Ubá (212, 7 mg/g de extrato seco) superou a média verificada para aqueles 14 cultivares, confirmando a sua importância como fonte destes compostos. Adicionalmente, as folhas de *M. indica* (Ubá) apresentaram elevado conteúdo de mangiferina (12%) quando comparado aos conteúdos nas folhas dos cultivares investigados por Barreto *et al.* (2008) que variaram de 0,6 a 12%.

Tabela 12 - Conteúdo dos fenóis totais, flavonoides totais, mangiferina e atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos da folha e da casca de *M. indica*

	Fenóis totais mg EAG/g extrato seco	Flavonóides mg ERT/g extrato seco	Mangiferina mg/g extrato seco	IC50
Folha	212,7 ± 10,0 *	90,3 ± 1,32 *	120,0	5,2 *
Casca	230,0 ± 2,0	70,26 ± 1,9	-	3,4

(*): diferença significativa em relação ao extrato da casca ($p < 0,05$), segundo teste t.

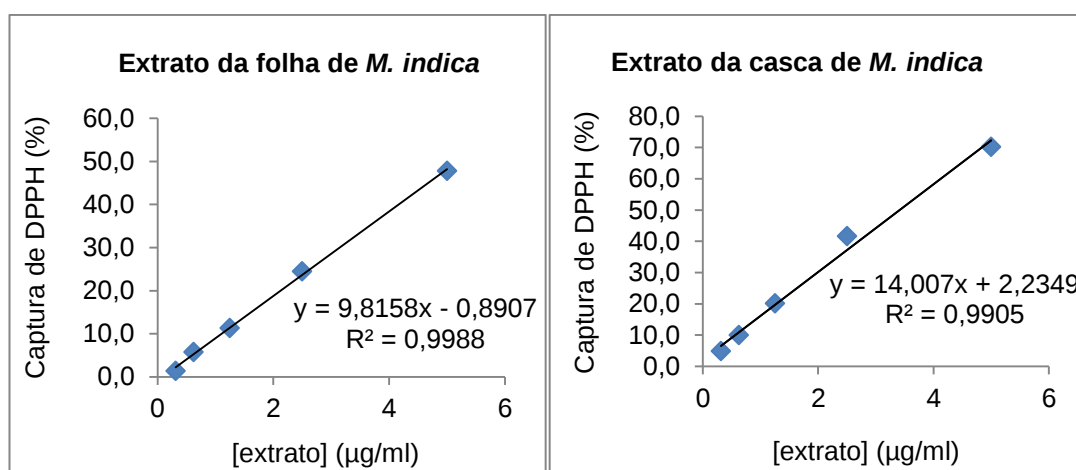


Figura 10 – Curvas de concentrações dos extratos liofilizado da folhae da casca de *M. indica* versus percentuais de captura de DPPH.

6.3. Bioatividade do extrato da folha de *M. indica* e mangiferina em camundongos ApoE^{-/-}

6.3.1. Parâmetros biométricos e consumo alimentar médio

Após um período de 8 semanas de tratamento com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina, a variação da massa corporal (entre o início e término do experimento), o consumo alimentar médio, a massa do fígado e o índice hepatossomático dos camundongos ApoE^{-/-} foram comparados entre os grupos. Conforme representado na Tabela 13, não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados ($p > 0,05$).

Dados biométricos e consumo alimentar constituem parâmetros úteis na investigação preliminar de possível toxicidade por drogas e outros produtos de consumo. Os resultados aqui apresentados, não apontam indícios de toxicidade pelos tratamentos com extrato da folha de *M. indica* e com a mangiferina.

Tabela 13 – Variação da massa corporal, consumo alimentar diário, massa do fígado e índice hepatossomático dos camundongos ApoE^{-/-} submetidos a 8 semanas de tratamento com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina

	Controle	E200	E400	M40
VMC (g)	1,4 ± 1,5	1,6 ± 2,5	1,4 ± 1,8	1,8 ± 1,0
CAM (g)	3,3 ± 0,7	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,7	3,6 ± 0,6
MF (g)	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,1
IHS (%)	6,2 ± 0,7	6,7 ± 1,4	6,9 ± 1,9	6,8 ± 0,6

Valores expressos em Média ± DP. $n = 8$ a 9 . VMC: variação da massa corporal (entre início e término do experimento); CAM: consumo alimentar médio. MF: massa do fígado. IHS: índice hepatossomático (ao término do experimento). Controle: veículo DMSO; E200: 200mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; E400: 400 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; M40: 40 mg/kg de mangiferina. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

6.3.2. Metabólitos e enzimas séricos

6.3.2.1.1. Atividades das aminotransferases

As atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) de camundongos ApoE^{-/-} estão representadas na Figura 11. Os tratamentos com extratos de *M. indica* e mangiferina não afetaram significativamente os níveis de ALT. Por outro lado, observou-se aumento significativo dos níveis de AST no grupo tratado com mangiferina. Possivelmente, outros metabólitos secundários presentes no extrato atuaram de modo antagônico à mangiferina, impedindo aumentos significativos nos níveis de AST.

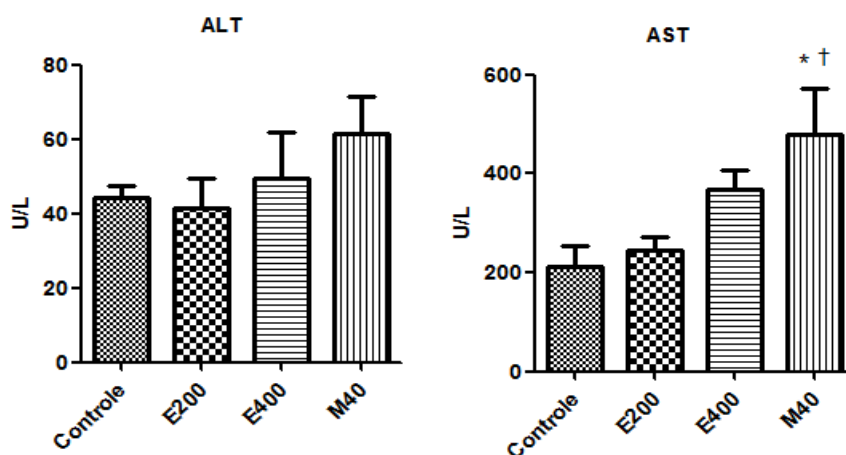


Figura 11– Níveis séricos das enzimas ALT e AST em camundongos ApoE^{-/-} submetidos a 8 semanas de tratamento com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina. Valores expressos em Média (U/L) ± DP. $n = 7$ a 9 . Controle: veículo DMSO; E200: 200 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; E400: 400 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; M40: 40 mg/kg de mangiferina. (*): diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); (†): diferença significativa em relação ao grupo E200 ($p < 0,05$) segundo teste SNK.

As aminotransferases ALT e AST estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos e gliconeogênese. Estas enzimas catalisam a transferência de um grupo amino da alanina e do aspartato, respectivamente, ao alfa-cetoglutarato, originando, nesta ordem, glutamato e piruvato ou oxaloacetato. A ALT é localizada primariamente no fígado, enquanto a AST

é encontrada também no coração, cérebro, e tecido muscular (Ozer *et al.*, 2008).

Danos nos hepatócitos promovem liberação do conteúdo de AST e ALT no espaço extracelular e aumento dos seus níveis séricos. Injúrias em tecidos extra-hepáticos, particularmente tecido muscular, também contribuem para o aumento dos níveis séricos destas enzimas (Ozer *et al.* 2008). Por outro lado, a avaliação isolada dos níveis séricos destas enzimas como preditoras de injúria tecidual podem indicar resultados falso-positivos. Kostrubsky *et al.* (1997) observaram aumento dos níveis séricos da AST associado a tratamento experimental que melhorou o aspecto histomorfológico hepático. Adicionalmente, um estudo utilizando 3 diferentes modelos experimentais evidenciou que aumentos dos níveis séricos da AST podem ocorrer mesmo na ausência de sinais de lesão hepática ou do tecido muscular esquelético, quando associados à redução da população de células de Kupffer (Radi *et al.*; 2011).

Na presente condição experimental, esperávamos que os tratamentos com extratos de *M. indica* e mangiferina causassem redução dos níveis séricos da AST e ALT, por meio de efeitos benéficos sobre alterações degenerativas hepáticas observadas em camundongos ApoE^{-/-}. Contrariamente, o tratamento com mangiferina isolada promoveu aumento dos níveis da AST. Este aumento não foi relacionado a efeitos hepatotóxicos, uma vez que observamos melhora do aspecto histomorfológico hepático. A redução na população de células de Kupffer no grupo tratado com mangiferina, observada neste estudo, não poderia explicar o aumento significativo da AST apenas neste grupo, uma vez que a redução desta população celular foi verificada também nos tratamentos com o extrato da folha de *M. indica*. Sendo assim, outros mecanismos não elucidados contribuíram para as alterações da AST verificadas neste estudo.

6.3.2.2. Glicemia e lipidemia

A glicemia e lipidemia dos camundongos ApoE^{-/-} tratados durante 8 semanas com extrato de *M. indica* e mangiferina estão representadas na

Tabela 14. Os níveis séricos de glicose, colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis não variaram entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 14 – Glicemia e lipidemia avaliadas nos camundongos ApoE^{-/-} submetidos a 8 semanas de tratamento com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina

	Controle	E200	E400	M40
Glicose <i>n</i> = 8 a 9	150 ± 48,8	177,8 ± 62,2	132,4 ± 23,2	137,2 ± 26,2
Colesterol total <i>n</i> = 8 a 9	328,3 ± 72,8	368,5 ± 89,2	350,4 ± 81,5	328,2 ± 54,3
HDL <i>n</i> = 7 a 9	10,5 ± 3,5	12,5 ± 4,7	11,2 ± 5,5	9,9 ± 2,5
Triacilgliceróis <i>n</i> = 8 a 9	68,2 ± 25,8	82,2 ± 20,6	73,8 ± 17,2	56,5 ± 10,8

Valores expressos em Média (mg/dL) ± DP. Controle: veículo DMSO; E200: 200 mg/kgdo extrato da folha de *M. indica*; E400: 400 mg/kgdo extrato da folha de *M. indica*; M40: 40 mg/kgde mangiferina.

Doses únicas ou repetidas de mangiferina variando de 10 a 90mg/kg exerceram efeitos antihiperglicemiantes em modelos animais com diabetes tipo II, mas não afetaram a glicemia em animais normoglicêmicos (Ichiki *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2001^a, Muruganandan *et al.*, 2005; Dineshkumar *et al.* 2010). Por outro lado, doses únicas ou repetidas (100-500 mg/kg) de extrato da folha de *M. indica* reduziram a glicemia de jejum tanto em ratos com diabetes tipo II quanto em ratos normoglicêmicos (Sharma *et al.*, 1997). No presente estudo, as administrações repetidas de mangiferina ou do extrato da folha de *M. indica* não afetaram a glicemia de jejum nos camundongos ApoE^{-/-}. Considerando que os camundongos ApoE^{-/-} apresentaram glicemia normal assim como seu controle selvagem (Kawashima *et al.*, 1994), o resultado do presente estudo parece coerente com os estudos nos quais a mangiferina não afetou a glicemia em animais normoglicêmicos. Por outro lado, a ausência de efeitos hipoglicemiantes do extrato da folha de *M. indica* nos camundongos ApoE^{-/-} contraria os achados relatados por Sharma *et al.* (1997). Possivelmente, esta contradição pode ser explicada por variáveis como tipo cultivar de *M. indica* utilizado e método de extração empregado, já

que ambos os fatores podem influenciar significativamente no conteúdo de metabólitos secundários nos extratos de *M. indica* (Ling *et al.* 2009; Barreto *et al.*, 2008).

Efeitos hipolipemiantes da mangiferina relatados em alguns estudos parecem ser influenciados por fatores como modelo experimental e espécie animal utilizados. Comparando-se, por exemplo, as ações da mangiferina em estudos com ratos, pôde-se observar que os seus efeitos hipolipemiantes foram mais expressivos nas dislipidemias induzidas por toxicidade com isoproterenol (Nair e Davi, 2006) ou por estreptozotocina (Dineshkumar *et al.* 2010) do que por dieta hipercolesterolêmica (Niu *et al.*, 2012), destacando-se que as doses utilizadas neste último modelo foram intermediárias àquelas utilizadas nos outros dois modelos. Comparando-se, ainda, os efeitos da mangiferina na dislipidemia induzida por dieta hiperlipídica, verificou-se que este composto afetou o colesterol total em camundongos (Miura *et al.*, 2001^b), mas não em ratos (Niu *et al.*, 2012) ou hamsters (Guo *et al.* 2011), mesmo que as doses administradas nestas duas últimas espécies tenham sido similares ou superiores àquelas administradas em camundongos. A ausência de efeitos da mangiferina sobre o colesterol total também foi relatada em camundongos LDLr^{-/-} (Pardo-Andreu *et al.*, 2008). Dessa forma, o modelo de indução de dislipidemia e a espécie animal utilizada parecem constituir fatores determinantes das respostas aos tratamentos com mangiferina. Possivelmente estas variáveis expliquem por que no presente estudo a administração da mangiferina e do extrato de *M. indica* não promoveram alterações na lipidemia nos camundongos ApoE^{-/-}.

6.3.3. Lesão aterosclerótica

A extensão da lesão aterosclerótica no arco aórtico e aorta torácica, quantificada pelo método *en face* com a coloração de Sudan IV e expressa como área percentual de deposição lipídica, correspondeu a $5,55 \pm 2,61$ no grupo controle; $3,45 \pm 3,27$ no grupo E200; $4,67 \pm 3,53$ no grupo E400 e $4,55 \pm 2,02$ no grupo M40. Não houve variação significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 12).

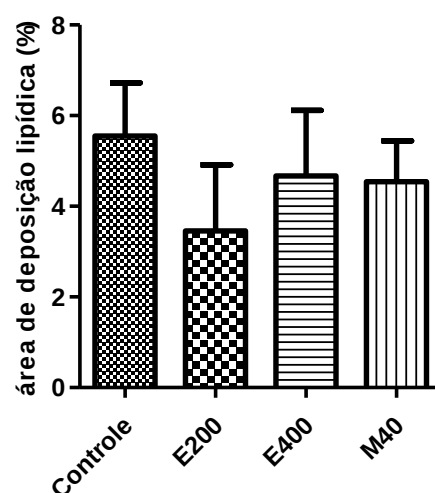


Figura 12 – Área percentual de deposição lipídica no tecido aórtico de camundongos ApoE^{-/-} submetidos a 8 semanas de tratamento com extratos de *M. indica* e mangiferina. Médias $\pm$ DP são apresentados. $n = 5$ a 6. Controle: veículo DMSO; E200: 200 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; E400: 400 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; M40: 40 mg/kg de mangiferina. Não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$).

O presente estudo investigou pela primeira vez os efeitos do extrato da folha de *M. indica* e da mangiferina sobre o processo aterosclerótico, baseando-se especialmente nas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias deste composto previamente relatadas. Os tratamentos com duração de 8 semanas iniciados em camundongos ApoE^{-/-} com 15 semanas de idade não ofereceram proteção contra o aumento do tamanho das lesões ateroscleróticas. Fatores como doses utilizadas, momento da intervenção e tempo de tratamento talvez não tenham sido adequados para se produzir resultados significativos.

Grande parte dos benefícios antiaterogênicos de compostos fenólicos em camundongos ApoE^{-/-} têm sido relacionados a intervenções terapêuticas iniciadas em animais muito jovens (4-6 semanas de idade) (Hayek *et al.*, 1997; Norata *et al.*, 2007; Loke *et al.*, 2010). Nesta faixa etária, os animais sequer desenvolveram estrias gordurosas, ao passo que animais com 15 semanas de idade, como os utilizados no nosso estudo, já apresentam estrias gordurosas bem desenvolvidas. Ainda que, na presente condição experimental, os extratos de *M. indica* e a mangiferina não tenham retardado a progressão de lesões ateroscleróticas pré-existentes, não se pode excluir

um possível efeito antiaterosclerótico a partir de uma intervenção precoce, visto que outros tipos de tratamentos testados em camundongos ApoE^{-/-} foram ineficazes quando iniciados entre a 10^a e 12^a semana de idade, mas retardaram o desenvolvimento e progressão das lesões quando iniciados entre a 5^a e 6^a semana de idade (Murayama *et al.*, 1999; Hasty *et al.*, 1999).

Xia *et al.* (2006) relataram benefícios antiateroscleróticos de extratos ricos em antocianinas mesmo em camundongos ApoE^{-/-} com lesões avançadas. No entanto, devemos levar em conta que o tempo de exposição dos animais aos extratos ricos em antocianinas foi pelo menos o dobro do tempo de exposição aos extratos da folha de *M. indica* L e à mangiferina no presente estudo, um fator que talvez explique a eficácia daquele tratamento e insucesso destes últimos. Embora os tratamentos do presente estudo não tenham alterado o tamanho da placa aterosclerótica, seria interessante investigar os seus efeitos sobre a composição das placas. A exemplo, o tratamento com N-acetilcisteína, derivado da L-cisteína com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, também durante 8 semanas, não reduziu a extensão das lesões ateroscleróticas em camundongos ApoE^{-/-}, mas promoveu alterações na composição das placas condizentes com a melhora da estabilidade das mesmas (Lu *et al.*, 2011), o que teria relevância clínica já que as complicações da aterosclerose, em geral, provêm da ruptura de placas instáveis com consequente formação de trombos (Lusis, 2000).

6.3.4. Atividade das enzimas antioxidantes hepáticas e renais

A atividade da SOD e a atividade da CAT, tanto no fígado quanto nos rins dos camundongos ApoE^{-/-} submetidos aos tratamentos com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina não variaram significativamente entre os diferentes grupos ($p > 0,05$) (Figura 13).

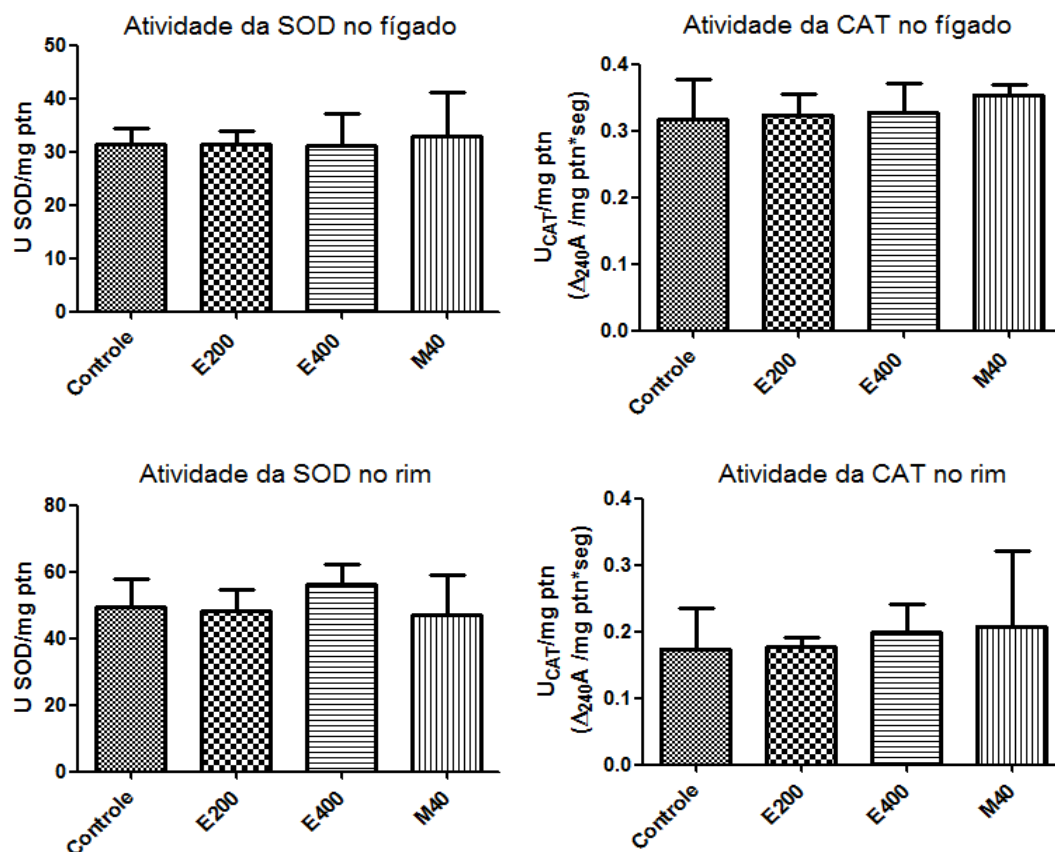


Figura 13 – Atividade da SOD e da CAT nos tecidos hepático e renal de camundongos ApoE^{-/-} submetidos aos tratamentos com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina. Médias ± DP são apresentados. *n* = 6. Controle: veículo DMSO; E200: 200mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; E400: 400 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; M40: 40mg/kg de mangiferina.

A homeostase redox celular é crucial em vários processos biológicos e a primeira linha de defesa contra estímulos diversos. Espécies reativas de oxigênio (EROs), subproduto de inúmeros eventos celulares, exercem importante papel como moléculas de sinalização na regulação de processos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose. Concentrações suprafisiológicas de EROs são deletérias, dando origem a lesões celulares que caracterizam a condição denominada estresse oxidativo que, por sua vez, tem sido correlacionado a inúmeros processos degenerativos (Zang *et al.*, 2011). Mecanismos celulares críticos para a homeostase celular e controle do estresse oxidativo incluem as atividades das enzimas antioxidantes SOD e a CAT. A SOD catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e a CAT decompõe o

peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, o que reduz a toxicidade pelo excesso destas EROs (Mates *et al.*, 2000).

Recentemente foi demonstrado que os camundongos ApoE^{-/-} desenvolvem alterações degenerativas no fígado e nos rins associadas a reduçãoda expressão das enzimas antioxidantes SOD e CAT (Bonomini *et al.*, 2010). Partindo-se do pressuposto que qualquer influência, positiva ou negativa, dos tratamentos com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina sobre as alterações degenerativas observadas nestes animais tivessem relação com mecanismos antioxidantes, propôs-se a investigação dos efeitos destes tratamentos sobre as atividades destas enzimas no fígado e nos rins. Entretanto, foi observado que estes tratamentos não afetaram as atividades da SOD e da CAT, embora tenham alterado alguns parâmetros histomorfométricos hepáticos e renais.

Estes resultados parecem intrigantes visto que o tratamento com mangiferina foi capaz de afetar as atividades da SOD e da CAT em modelos experimentais de toxicidade hepática e renal. Viswanadh *et al.* (2010), por exemplo, verificaram que a mangiferina atenuou a redução da atividade da SOD e da CAT no fígado de ratos associada a estresse hepático induzido por cádmio. A aparente contradição entre os nossos resultados e os achados de Viswanadh *et al.* (2010) pode estar relacionada ao fato de que, enquanto nós investigamos os efeitos dos tratamentos com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina sobre a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas em um processo patológico já instalado, aqueles pesquisadores avaliaram o efeito preventivo da mangiferina, administrando-a previamente à indução de toxicidade hepática aguda induzida por dose única de cádmio. No que diz respeito a alterações de SOD e CAT renal, Muruganandan *et al.* (2002) observaram que a administração de mangiferina durante 28 dias atenuou a redução da atividade destas enzimas associada a danos renais relacionados à diabetes induzida por estreptozotocina. Mesmo que neste caso, os efeitos da mangiferina tenham sido investigados em condição patológica também já instalada, uma possível explicação para a divergência entre os resultados deste estudo e o nosso pode estar relacionada à cronicidade dos tratamentos. Neste sentido, pode-se supor que possíveis efeitos dos tratamentos com extratos da folha de *M. indica* e da mangiferina

sobre as atividades destas enzimas seriam, ao longo de um tratamento muito prolongado, mascarados pelo retorno das atividades das enzimas às suas condições pré-tratamento após período de adaptação do organismo.

Finalmente, vale destacar que a ausência de efeitos dos tratamentos com extratos de *M. indica* e mangiferina sobre as enzimas antioxidantes SOD e CAT não implica necessariamente em ausência de alteração do status oxidativo, visto que outros marcadores de danos oxidativos (proteína carbonilada, isopropanos, malondialdeído, antioxidantes não-enzimáticos e outras enzimas antioxidantes) não foram avaliados.

6.3.5. Expressão gênica hepática da *fat-specific protein 27* (FSP-27)

A FSP-27, identificada como uma das inúmeras proteínas constituintes das gotículas lipídicas que se formam em adipócitos e hepatócitos (Okomura *et al.*, 2011), tem sido relacionada à fisiopatologia da doença hepática gordurosa. Foi demonstrado que a indução da expressão da FSP-27 *in vivo* e *in vitro* promove a formação de gotículas lipídicas em hepatócitos através do acúmulo de triacilgliceróis, já o silenciamento da sua expressão protéica resulta em diminuição da esteatose em camundongos deficientes em leptina (Matsusue *et al.*, 2008). Adicionalmente, a expressão gênica da FSP-27 foi correlacionada positivamente com a esteatose em camundongos com hiper-homocisteinemia ou camundongos deficientes em ApoE^{-/-} submetidos a dietas com diferentes composições lipídicas (Guillén *et al.*, 2009).

Embora tenha sido documentado que a administração da mangiferina afeta o acúmulo de lipídios hepáticos em hamsters submetidos a dieta hiperlipídica (Guo *et al.*, 2011), seus efeitos sobre a expressão da FSP-27 em fígados esteatóticos até então não foram investigados. Sendo assim, o presente estudo avaliou os efeitos dos tratamentos com extratos de *M. indica* e da mangiferina sobre a expressão hepática desta proteína no fígado esteatótico de camundongos ApoE^{-/-}. Conforme apresentado na Figura 14, não foram observadas diferenças significativas na expressão hepática da FSP-27 entre os diferentes grupos. Sendo assim, possíveis alterações no

acúmulo lipídico hepático nesta presente condição experimental seriam decorrentes de outros mecanismos moleculares que devem ser investigados.

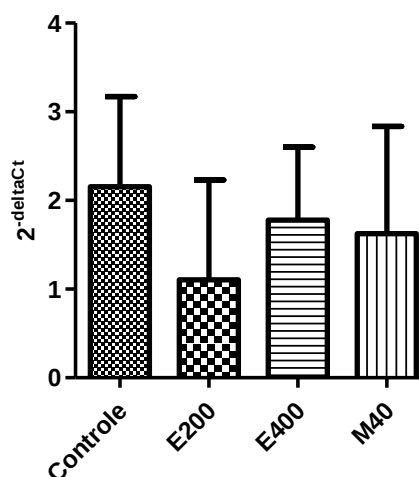


Figura 14 – Expressão hepática da *fat-specific protein* (FSP-27) nos camundongos ApoE^{-/-} submetidos aos tratamentos com extratos da folha de *M. indica* e mangiferina. Valores expressos em Média ± DP. *n* = 4. Controle: veículo DMSO; E200: 200 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; E400: 400 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; M40: 40 mg/kg de mangiferina.

6.3.6. Histomorfometria hepática

Os efeitos dos tratamentos com extrato de *M. indica* e mangiferina sobre parâmetros hepáticos histomorfométricos (densidades volumétricas de micro e macro gotículas lipídicas, de macrófagos e de necrose) estão representados na Figura 15. Fotomicrografias representativas das secções histológicas encontram-se na Figura 16. Verificou-se que a densidade volumétrica de microgotículas lipídicas não variou entre os diferentes grupos. Por outro lado, as densidades volumétricas de macrogotículas lipídicas, de macrófagos e de necrose reduziram em todos os tratamentos em relação ao controle.

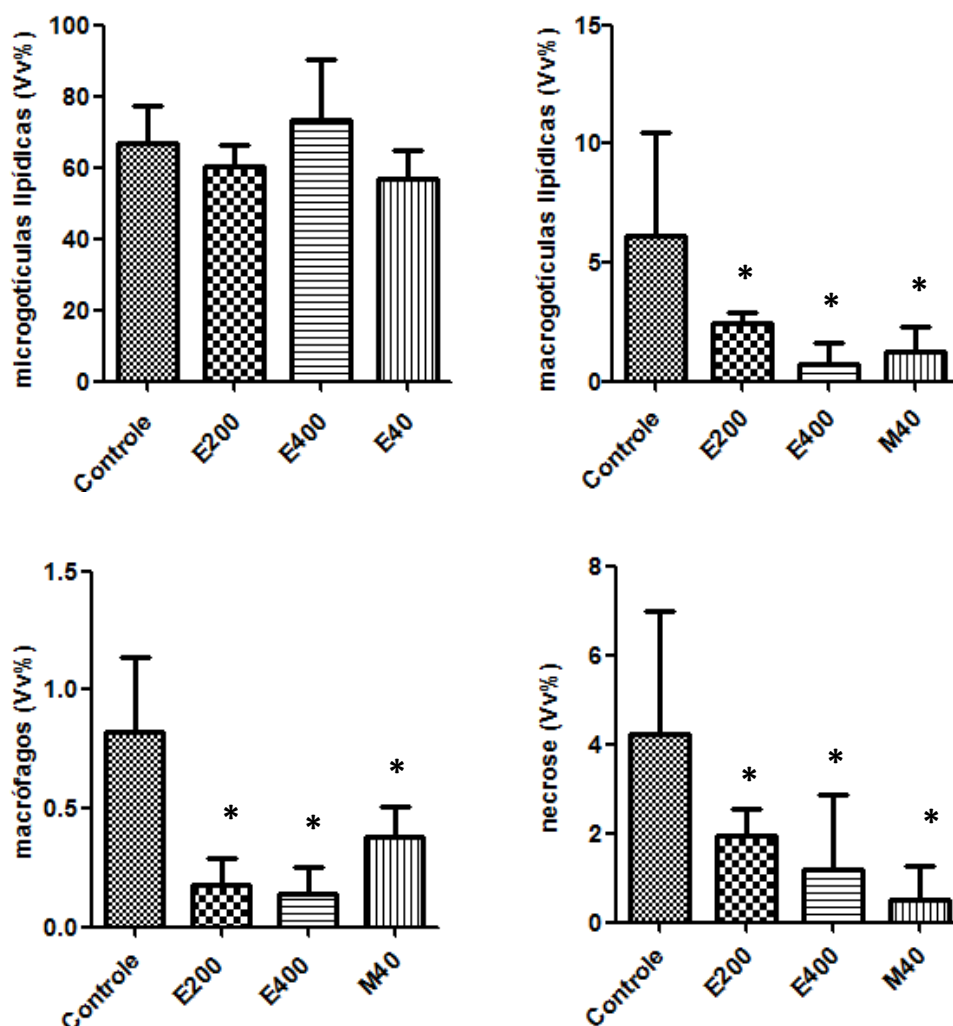


Figura 15 – Densidade volumétrica (Vv%) de macro gotículas lipídicas, de macrófagos e de necrose no tecido hepático de camundongos ApoE^{-/-}. Valores expressos em Média ± DP. $n = 5$ a 6 . Controle: veículo DMSO; E200: 200mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; E400: 400mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; M40: 40 mg/kg de mangiferina. * diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), segundo o teste SNK.

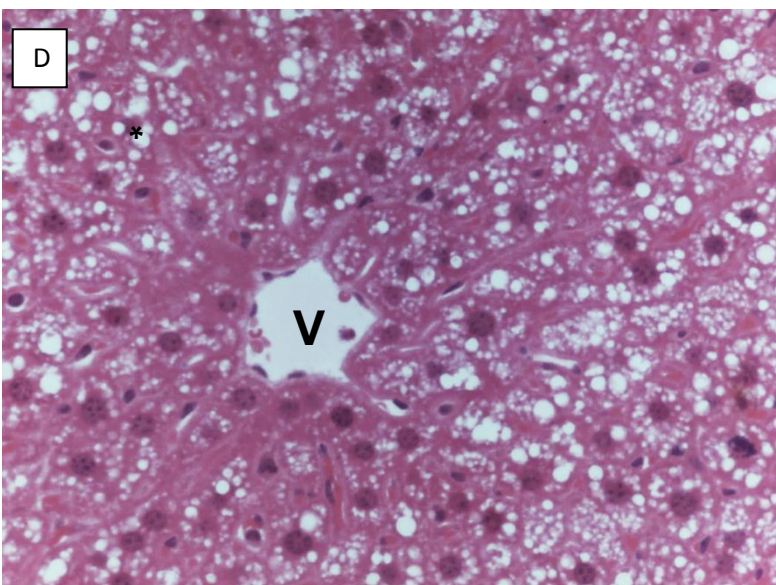
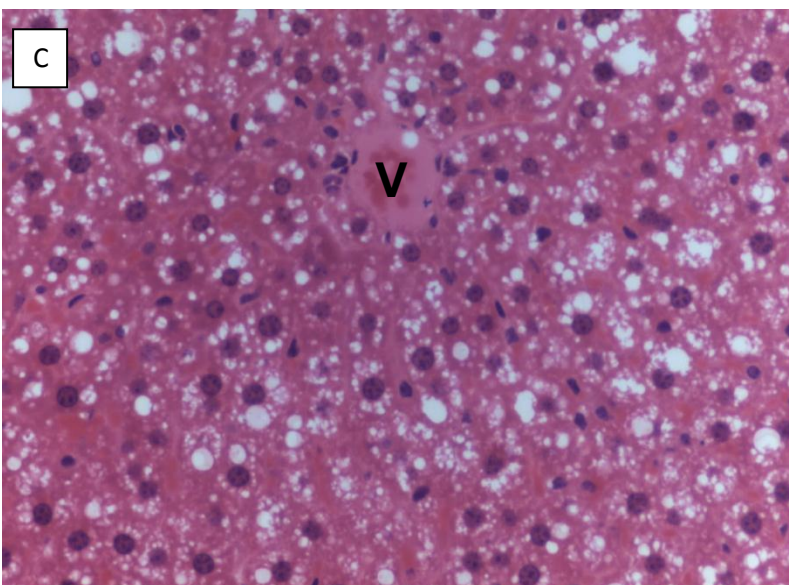
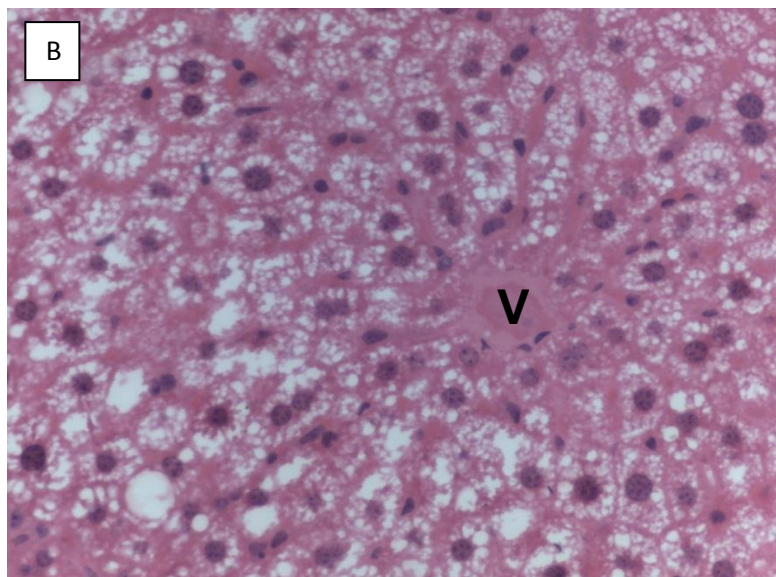
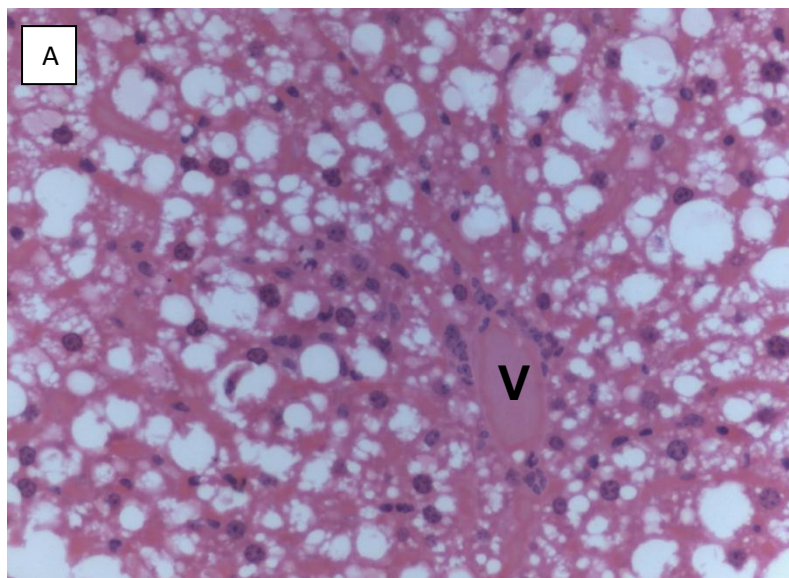


Figura 16 – Fotomicrografias representativas das secções histológicas de fígado corados com H&E e observados à microscopia de luz. A: Controle, veículo DMSO; B: E200, 200 mg/kg de extrato de folhas de *M. indica*; C: E400, 400 mg/kg de extrato da folha de *M. indica*; D: M40, 40 mg/kg de mangiferina. (V): veia centrilobular

Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado uma correlação entre os diferentes genótipos da apoE e a incidência de doença hepática gordurosa não alcohólica (Yang *et al.*, 2005; Demirag *et al.*, 2007; Sazci *et al.*, 2008; Feo *et al.*, 2012). Foi demonstrado que os camundongos ApoE^{-/-} desenvolvem esteatose (Kuipers *et al.*, 1996; Mesenkamp *et al.*, 1999; Bonomini *et al.*, 2010) e alterações degenerativas hepáticas associadas ao aumento da expressão de fatores pro-inflamatórios e à redução da atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT (Bonomini *et al.*, 2010).

Neste estudo, propôs-se a investigação dos efeitos dos tratamentos com extrato da folha de *M. indica* e mangiferina sobre o fígado de camundongos ApoE^{-/-}, partindo-se da hipótese de que estes tratamentos pudessem minimizar a esteatose e outras alterações histopatológicas hepáticas nestes animais, já que, em estudos prévios, a mangiferina reduziu o acúmulo de triacilgliceróis no fígado de hamsters submetidos à dieta hiperlipídica (Guo *et al.*, 2011) e, ainda, exerceu efeito hepatoprotetor associado a mecanismos antioxidantes em diferentes modelos experimentais de dano hepático (Pardo-Andreu *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2012). Vimos que os tratamentos com extrato de folhas de *M. indica* e mangiferina neste trabalho efetivamente minimizaram as alterações histopatológicas hepáticas observadas nestes animais, porém independentemente de alterações nas atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Vimos também que as reduções no acúmulo de lipídios hepáticos não tiveram qualquer relação com a expressão da proteína FSP-27, recentemente relatada como possível marcador da esteatose.

Um mecanismo molecular plausível para a redução do acúmulo de lipídios hepático na presente condição experimental seria a modulação de genes envolvidos na oxidação lipídica e na lipogênese, como já observada em animais dislipidêmicos com esteatose tratados com mangiferina (Guo *et al.*, 2011). Outro fator que pode ter constituído mecanismo adicional para a redução da esteatose neste estudo seria a própria diminuição da população de macrófagos aqui observada, visto que, em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica, a depleção de células de Kupffer promoveu aumento da atividade dos fatores de transcrição PPAR α , envolvidos na oxidação lipídica e, conseqüentemente, atenuou a esteatose (Stienstra *et al.*, 2010). Não foi

possível inferir se a redução da população de macrófagos neste estudo foi decorrente de interferência na proliferação ou apoptose de macrófagos residentes ou no recrutamento de monócitos circulantes. De todo modo, a segunda hipótese poderia estar relacionada às propriedades da mangiferina, previamente relatadas em outras condições experimentais *in vivo*, em inibir a quimiotaxia para monócitos (García *et al.*, 2002) e reduzir os níveis da molécula de adesão ICAM-1, envolvida na adesão e transmigração de monócitos no endotélio (Wei *et al.*, 2011).

Na doença gordurosa do fígado, o acúmulo lipídico intracelular contribui para o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, suscetibilizando os hepatócitos à injúria por estresse oxidativo e induzindo as células de Kupffer a produzirem citocinas próinflamatórias que exarcebam o dano hepático (Angulo, 2002). Sendo assim, a redução, tanto da esteatose quanto da população de células de Kupffer, pode ter contribuído direta ou indiretamente para a redução da necrose no fígado dos camundongos ApoE^{-/-} tratados com extrato de *M. indica* e com a mangiferina.

6.3.7. Histomorfometria renal

Conforme apresentado na Figura 17, tanto a densidade volumétrica de glomérulo como a área glomerular média diferiram significativamente no grupo tratado com mangiferina em relação aos demais grupos. Ao que tudo indica, outros compostos também presentes no extrato da folha de *M. indica* atuaram de modo antagônico, contrabalanceando os efeitos promovidos pela mangiferina.

A apoE tem sido relacionada à patogênese e progressão de uma variedade de nefropatias e apontada como regulador autócrino da função mesangial e glomerular (Liberopoulos *et al.*, 2004). Camundongos ApoE^{-/-} apresentaram alterações histopatológicas renais caracterizadas por glomeruloesclerose, atrofia tubular, fibrose intersticial e formação de células espumosas, associadas à ativação endotelial, aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios e redução da atividade da SOD e da CAT (Bruneval *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2002; Bonomini *et al.*, 2010; Bonomini *et al.*, 2011).

As alterações histopatológicas observadas nos rins dos camundongos ApoE^{-/-} foram associadas ao aumento do volume e do diâmetro glomerular (Bonomini *et al.*, 2010).

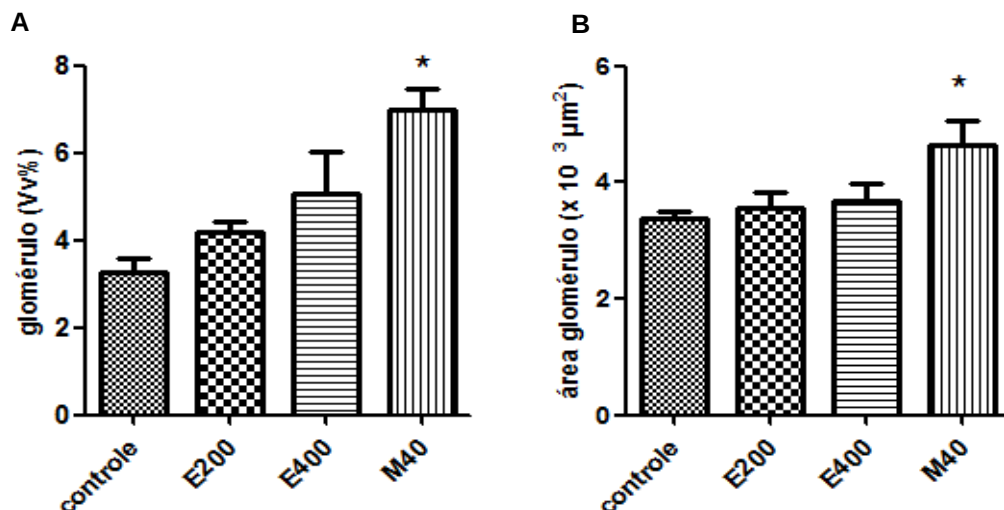


Figura 17 – (A) Densidade volumétrica (Vv%) de glomérulos e (B) área glomerular média (μm²) em camundongos ApoE^{-/-}. Valores expressos em Média ± DP. *n* = 5 a 6. Controle: veículo DMSO; E200: 200 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; E400: 400 mg/kg do extrato da folha de *M. indica*; M40: 40mg/kg de mangiferina. (*) diferença significativa em relação aos demais grupos (*p*<0,05), segundo o teste SNK.

Na presente condição experimental, independentemente de alterações nas atividades da SOD e da CAT, a administração de mangiferina isolada promoveu aumento da densidade volumétrica e da área média dos glomérulos em camundongos ApoE^{-/-}. Considerando que o aumento da área glomerular pode ser decorrente da proliferação de células mesangiais e da produção de matriz extracelular por estas células, um achado histopatológico frequentemente observado em inúmeras formas de glomerulonefrites (Stockand and Sanson 1997; Grond and Weening, 1990) suspeita-se que o tratamento com mangiferina isolada possa ter sido deletério aos rins.

Este efeito supostamente nefrotóxico da mangiferina seria inesperado, visto que, em estudos recentes, a mangiferina foi relatada como nefroprotetora em ratos diabéticos (Muruganandan *et al.*, 2002; Li *et al.*,

2010) ou sob estresse oxidativo e nitrosativo renal induzido por D(+)galactosamina (Ghosh *et al.*, 2012). Destaca-se, ainda, que o efeito nefroprotetor da mangifeirina observado por Li *et al.* (2010) foi promovido pela administração de 15 e 45mg/kg do composto durante 12 semanas. No presente estudo, a dose de mangiferina foi de 40 mg/kg e o tempo de tratamento foi de 8 semanas. Sendo assim, a dose e o tempo de exposição à mangiferina não poderiam explicar um suposto efeito nefrotóxico. Outros parâmetros morfométricos como, por exemplo, a quantificação de fibras de colágeno para estimativa de fibrose, devem ser investigados para elucidação do real efeito do tratamento com mangiferina sobre os rins dos camundongos ApoE^{-/-}.

7. CONCLUSÕES

- Os extratos da folha e da casca de *M. indica* (Ubá) apresentaram as mesmas classes de metabólitos secundários, porém, o extrato da folha apresentou maior conteúdo de flavonoides e menor conteúdo de fenóis totais;
- Os tratamentos com extratos de *M. indica* e mangiferina não afetaram a lipidemia, a glicemia e a progressão da lesão aterosclerótica;
- O tratamento com a mangiferina aumentou os níveis séricos da AST sem correlacionar-se com as alterações histomorfométricas hepáticas;
- Todos os tratamentos melhoram o aspecto histopatológico do fígado gorduroso, independentemente das atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT ou da expressão da FSP-27;
- Somente o tratamento com mangiferina afetou a densidade volumétrica e a área dos glomérulos;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aderibigbe, A.O.; Emudianughe, T.S.; Lawal, B.A.S. Antihyperglycaemic Effect of *Mangifera indica* in Rat. *Phytotherapy Research*, 1999;13: 504–507.

Abubakar. M.E. Antibacterial efficacy of stem bark extracts of *Mangifera indica* against some bacteria associated with respiratory tract infections. *Scientific Research and Essay*, 2009; 4 (10): 1031-7.

Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, 1984;105:121-6.

Ait-Oufella, H.; Taleb, S.; Mallat, Z.; Tedgu, A. Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2011; 31:969-79.

Alvarez-Leite, J.I. Lipoproteínas e transporte de lipídios no organismo. In: Vieira, E.C.; Figueiredo, E.A. Alvarez-Leite, J.I.; Gomes, M.V. *Química fisiológica*. 2ª ed., São Paulo: Atheneu, 1995; 17–31.

Amazzal, L.; Lapôtre, A.; Quignon, F.; Bagrel, D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. *Neuroscience Letters*, 2007; 418: 159–64.

Angulo, P. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine*, 2002; 346: 1221–31.

Araújo, J.L.P. Cultivo da mangueira: mercado e comercialização de manga. Embrapa Seminário, versão eletrônica – julho de 2004. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/socioeconomia.htm>. Acessado em dezembro de 2009.

Aritomi, M.; Kawasaki, T. A new xanthone c-glucoside, position isomer of mangiferin, from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Tetrahedron Letters*, 1969; 12: 941–4.

Badmus, J.A.; Adedosu, T.O.; Fatoki, J.O.; Adegbite, V.A.; Adaramoye, O.A.; Odunola, O.A. Lipid peroxidation inhibition and antiradical activities of some leaf fractions of *Mangifera indica*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2011, 68(1):23-9.

Barreto, J.C.; Trevisan, M.S.T.; Hull, W.E.; Erben, G.; De Brito, E.S.; Pfundstein, B.; Würtele, G.; Spiegelhalder, B.; Owen, R.W. Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008; 56: 5599–610.

Barter P. The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atherosclerosis Supplements*, 2005; 6: 15–20.

Bbosa, G.S.; Lubega, A.; Musisi, N.; Kyegombe, D.B.; Waako, P.; Ogwal-Okeng, J.; Odyek, O. The activity of *Mangifera indica* L. leaf extracts against the tetanus causing bacterium, *Clostridium tetani*. *African Journal of Ecology*, 2007; 45 (3): 54–8.

Béltran, A.E.; Alvarez, Y.; Xavier, F.E.; Hernanz, R.; Rodriguez, J.; Núñez, A.J.; Alonso, M.J.; Salaices, M. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). *European Journal of Pharmacology*, 2004; 499: 297-305.

Bhowmik, A.; Khan, L.A.; Akhter, M.; Rokeya, B. Studies on the antidiabetic effects of *Mangifera indica* stem-barks and leaves on nondiabetic, type 1 and type 2 diabetic models rats. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2009; 4: 110-14.

Bok, C.; Waldmann, K.H.; Ternes, W. Mangiferin and hesperidin metabolites are absorbed from gastrointestinal tract of pigs after oral ingestion of a *Cyclopia genistoides* (honeybush tea) extract. *Nutrition research*, 2008; 28: 879-91.

Bonomini, F.; Filippini, F.; Hayek, T.; Aviram, M.; Keidar, S.; Rodella, L.F.; Coleman, R.; Rezzani, R. Apolipoprotein E and its role in aging and survival. *Experimental Gerontology*, 2010; 45: 149-57.

Bonomini, F.; Rodella, L.F.; Moghadasian, M.; Lonati, C.; Coleman, R.; Rezzani, R. Role of apolipoprotein e in renal damage protection. *Histochemistry and Cell Biology*, 2011; 135: 571-79.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72: 248-54.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72: 248–54.

Brand-Williams, W; Cuvelier, ME.; Berst, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 1995; 28: 25-30.
Breslow, J.L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 1996, 272: 685–88.

Broekhuizen, L.N.; van Wijk, D.F.; Vink, H.; Stalmach, A.; Crozier, A.; Hutten B.A.; Kastelein, J.J.; Hugenholtz, P.G.; Koenig, W.; Stroes, E.S. Reduction of monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage migration inhibitory factor by a polyphenol-rich extract in subjects with clustered cardiometabolic risk factors. *British Journal of Nutrition*, 2011; 106(9): 1416-22.

Bruneval, P.; Bariéty, J.; Bélair, M.F.; Mandet, C.; Heudes, D.; Nicoletti, A. Mesangial expansion associated with glomerular endothelial cell activation and macrophage recruitment is developing in hyperlipidaemic apoe null mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2002; 17: 2099-2107.

Campos-Esparza, M.R.; Sánchez-Gómez, M.V.; Matute, C. Food and Chemical Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidantpolyphenols. *Cell Calcium*, 2009; 45: 358–368.

Carvalho, A.C.; Guedes, M.M.; de Souza, A.L.; Trevisan, M.T.; Lima, A.F.; Santos, F.A.; Rao, V.S. Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. *Planta Medica*, 2007; 73(13):1372-6.

Carvalho, R.R.; Pellizzon, C.H.; Justulin, L.Jr; Felisbino, S.L.; Vilegas, W.; Bruni, F.; Lopes-Ferreira, M.; Hiruma-Lima, C.A. Effect of mangiferin on the development of periodontal disease: involvement of lipoxin A4, anti-chemotactic action in leukocyte rolling. *Chemical-Biological Interactions*, 2009; 179(2-3):344-50.

Coe, F.G.; Anderson, G.J. Screening of medicinal plants used by the Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 1996; 53: 29–50.

Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 2009; 26(8):1001-43.

Curtis, P.J.; Sampson, M.; Potter, J.; Dhatariya, K.; Kroon, P.A.; Cassidy, A. Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes: a 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care*, 2012; 35(2): 226-32.

Cziraky, M.J.; Watson, K.E.; Talbert, R.L. Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. *Journal of Manage Care Pharmacy*, 2008; 14(8):S3-28; quiz S30-1.

Dar, A.; Faizi S; Naqvi, S.; Roome, T.; Zikr-ur-rehman, S.; Ali, M.; Firdous, S.; Moin, S.T. Analgesic and Antioxidant Activity of Mangiferin and Its Derivatives: the Structure Activity Relationship. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005; 28(4): 596–600.

Das, J.; Ghosh, J.; Roy, A.; Sil, P.C. Mangiferin exerts hepatoprotective activity against D-galactosamine induced acute toxicity and oxidative/nitrosative stress via Nrf2–NFκB pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012; 260: 35–47.

Das, S.; Nageshwar Rao, B.; Satish Rao, B.S. Mangiferin attenuates methylmercury induced cytotoxicity against IMR-32, human neuroblastoma cells by the inhibition of oxidative stress and free radical scavenging potential. *Chemical-Biological Interactions*, 2011; 193(2):129-40.

De Rosa, S.; Cirillo, P.; Paglia, A.; Sasso, L.; Di Palma, V.; Chiariello, M. Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach? *Current Vascular Pharmacology*, 2010; 8(2):259-75.

Demirag, M.D.; Onen, H.I.; Karaoguz, M.Y.; Dogan, I.; Karakan, T.; Ekmekci, A.; Guz, G. Apolipoprotein E Gene Polymorphism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Digestive Disease and Science*, 2007; 52:3399–403.

Dineshkumar, B.; Mitra, A.; Manjunatha, M. Studies on the antidiabetic and hypolipidemic potentials of mangiferin (xanthone glucoside) in streptozotocin-induced type1 and 2 diabetic models rats. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Science*, 2010; 1:75-85.

Dinneen, S.F. What is diabetes? *Med*, 2006; 34: 45–46.

Egert, S.; Bosy-Westphal, A.; Seiberl, J.; Kürbitz, C.; Settler, U.; Plachta-Danielzik, S.; Wagner, A.E.; Frank, J.; Schrezenmeir, J.; Rimbach, G.; Wolffram, S.; Müller, M.J. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition*, 2009; 102(7):1065-74.

EMBRAPA – Cultivo da Mangueira.
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/socioeconomia.htm Acessado em 2010.

FAOSTAT. FAO statistical Database – Agriculture, 2004. <http://apps.fao.org> Acessado em 2009.

Fazio, S.; Babaev, V.R.; Murray, A.B. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 1997; 94: 4647–52.

Feo, E.; Cefalo, C.; Arzani, D.; Amore, R.; Landolfi, R.; Grieco, A.; Ricciardi, W.; Miele, L.; Boccia, S. A case–control study on the effects of the apolipoprotein E genotypes in nonalcoholic fatty liver disease. *Molecular Biology Reports*, 2012; 39:7381–8.

Camargo-Filho, W.P; Alves, H. S.; Mazzeil, A.R. Mercado de manga no Brasil: contexto mundial, variedades e estacionalidade, *Informações Econômicas*, SP, 2004, 34 (5).

Galli, J.A.; Michelotto, M.D.; Silveira, L.C.; Martins, A.L.M. Qualidade de mangas cultivadas no Estado de São Paulo. *Bragantia*, 2008; 67 (3): 791 –7.

García, D.; Delgado, R.; Ubeira, F.M.; Leiro, J. Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica* L. extracts Vimang and mangiferin. *International Immunopharmacology*, 2002; 2: 797–806.

Garrido, G.; Blanco-Molina, M.; Sancho, R.; Macho, A.; Delgado, R.; Muñoz, E. An Aqueous Stem Bark Extract of *Mangifera indica* (Vimang®) Inhibits T Cell Proliferation and TNF-induced Activation of Nuclear Transcription Factor NF- κ B. *Phytotherapy Research*, 2005; 19: 211–5.

Garrido, G.; González, D.; Lemusa, Y.; García, D.; Lodeiro, L.; Quintero, G.; Delporte, C.; Núñez-Sellés, A.J.; Delgado, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). *Pharmacological Research*, 2004; 50: 143–9.

Ghosal, G., Rao, G., Saravanan, V., Misra, S., Rana, D. A plausible chemical mechanism of the bioactivities of mangiferin. *Indian Journal of Chemistry*, 1996; 35B: 561–6.

Girón, M.D.; Sevillano, N.; Sakto, R.; Haidour, A.; Manzano, M.; Jiménez, M.L.; Rueda, R.; López-Pedrosa, J.M. Salacia oblonga extract increases glucose transporter 4-mediated glucose uptake in L6 rat myotubes: Role of mangiferin. *Clinical Nutrition*, 2009; 28: 565–74.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 2007; 30 (2): 374-81.

Gottlieb, M.; Leal-Campanario, R.; Campos-Esparza, M.R.; Sánchez-Gómez, M.V.; Alberdi, E.; Arranz, A.; Delgado-Garcia, J.M., Gruart, A.; Matutea, C. Neuroprotection by two polyphenols following excitotoxicity and experimental ischemia. *Neurobiology of Disease*, 2006; 23: 374–86.

Grond, J.; Weening, J.J. Mesangial cell injury, glomerulosclerosis and therapeutic interventions. *Contributions to Nephrology*, 1990; 81: 229-39.

Guha, S.; Ghosal, S.; Chattopadhyay, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone.. *Chemotherapy*, 1996; 42: 443–51.

Guillén, N.; Navarro, M.A.; Arnal, C.; Noone, E.; Arbonés-Mainar, J.M.; Acín, S.; Surra, J.C.; Muniesa, P.; Roche, H.M.; Osada, J. Microarray analysis of hepatic gene expression indentifies new genes involved in steatotic liver. *Physiological Genomics*, 2009; 37: 187-98.

Guo, F.; Huang, C.; Liao, X.; Wang, Y.; He, Y.; Feng, R.; Li, Y.; Sun, C. Beneficial effects of mangiferin on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011; 55(12): 1809-18.

Ham, D.; Chen, C.; Zhang, Y.; Tang, X. Determination of mangiferin in rat plasma by liquid-liquid extraction with UPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010; 51: 260-3.

Hasty, A.H.; MacRae, F.L.; Brandt, S.J.; Babaev, V.R.; Gleaves, L.A.; Fazio, S. Retroviral gene therapy in apoE-deficient mice. *Circulation*, 1999; 99: 2571–6.

Hayek, T.; Fuhrman, B.; Vaya, J.; Rosenblat, M.; Belinky, P.; Coleman, R.; Elis, A.; Aviram, M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997; 17: 2744–52.

Hofker, M.H., van Vlijmen, B.J.M.; Havekes, L.M. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1998; 137: 1–11.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Área plantada, área colhida, quantidade produzida e valor da produção da lavoura permanente em 2010:Manga. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1613&z=p&o=21&i=P> Acessado em julho de 2012.

Ichiki, H.; Miura, T.; Kubo, M.; Ishihara, E.; Komatsu, Y.; Tanigawa, K.; Okada, M. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1998; 21: 1389–90.

Jutiviboonsuk, A.;Sardsaengjun, C. Mangiferin in leaves of Three Thai Mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010; 6(3): 122-9.

Kaivalya, M.; Nageshwar Rao, B.N.; Satish Rao, B.S. Mangiferin: A xanthone attenuates mercury chlorideinduced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2011; 25(2):108-16.

Kawashima, Y.; Chen, J.; Sun, H.; Lann, D.; Hajjar, R.J.; Yakar, S.;Leroith, D. Apolipoprotein E deficiency abrogates insulin resistance in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1994;14 (1):133-40.

Kostrubsky, V.E.; Szakacs, J.G.; Jeffery, E.H.; Wood, S.G.; Bement, W.J.; Wrighton, S.A.; Sinclair, P.R.; Sinclair, J.F.. Role of CYP3A in Ethanol-Mediated Increases in Acetaminophen Hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997; 143,315–23.

Kuipers,F.; van Ree, J.M.; Hofker, M.H.; Wolters H., Wolters, H.; Veld, G.I.; Havinda, R.; Vonk, R.J.; Princen, H.M.G., Havekes, L.M. Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology*, 1996; 24: 241-7.

Lakshmi, S.V.V.; Padmaja, G.; Kuppusamy, P.; Kutala, V.K. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2009; 46: 421–40.

Lee, R.T.; Libby, P. The unstable atheroma. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997; 17: 1859-67.

Leiro, J.; Arranz, J.A.; Yáñez, M.; Ubeira, F.M.; Sanmartín, M.L.; Orallo, Francisco. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *International Immunopharmacology*, 2004a; 4: 763–78.

Leiro, J.M.; García, D.; Arranz, J.A.; Delgado, R.; Sanmartín, M.L.; Orallo, F. An Anacardiaceae preparation reduces the expression of inflammation-related genes in murine macrophages. *International Immunopharmacology*, 2004b; 4: 991– 1003.

Lemus-Molina, Y.; Sánchez-Gómez, M.V.; Delgado-Hernández, R.; Matute, C. *Mangifera indica* L. extract attenuates glutamate-induced neurotoxicity on rat cortical neurons. *Neurotoxicology*, 2009; 30(6):1053-8.

Li, X.; Cui X.; Sun, X.; Li, X., Zhu, Q., Li, W. Mangiferin prevents diabetics nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rat. *Phytotherapy Research* 2010; 24: 893-9.

Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002; 420: 868–74.

Liberopoulos, E.; Siamopoulos, K.; Elisaf, M. Apolipoprotein E and Renal Disease. *American Journal of Kidney Disease*, 2004; 43:223-33.

Ling, L.T.; Yap, S.; Radhakrishnan, A.K.; subramaniam, T.; cheng, H.M.; Palanisamy, U.D. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. *Food Chemistry*, 2009; 113: 1154–9.

Loke, W.M.; Proudfoot, J.M.; Hodgson, J.M.; McKinley, A.J.; Hime, N.; Magat, M.; Stocker, R.; Croft, K.D. Specific Dietary Polyphenols Attenuate Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice by Alleviating Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2010; 30: 749-57.

Lu, Y.; Qin, W.; Shen, T.; Dou, L.; Man, Y.; Wang, S.; Xiao, C.; Li, J. The antioxidant N-acetylcysteine promotes atherosclerotic plaque stabilization through suppression of RAGE, MMPs and NF- κ B in ApoE-deficient mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2011;18(11): 998-1008.

Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature Reviews*, 2000; 407: 233–241.

Madesh, M.; Balasubramanian, K.A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 1998; 35:184-8.

Manach, C; Mazur, A.; Scalbert, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion In Lipidology*, 2005; 16: 3–8.

Mandarim-de-Lacerda, C.A. Stereological tools in biomedical research. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 2003; 75: 469–86.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Uma década de bons frutos. *Informativo CGPCP Fruticultura*, Brasília, 2011; 5(46):1-7.

Marinetti, G.V. Disorders of lipid metabolism: dyslipoproteinemias. In: *Disorders of lipid metabolism*. Plenum Press, New York, 1990; 75–120.

Márquez, L.; García-Bueno, B.; Madrigal, J.L.; Leza, J.C. Mangiferin decreases inflammation and oxidative damage in rat brain after stress. *European Journal of Nutrition*, 2012; 51(6):729-39.

Masella, R.; Di Benedetto, R.; Varì, R.; Filesi, C.; Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005; 16(10):577-86.

Masibo, M.; He, Q. Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties - A Review. *Food Reviews International*, 2009; 25:346–70.

Matsusue, K.; Kusakabe, T.; Noguchi, T.; Takiguchi, S.; Suzuki, T.; Yamano, S.; Gonzalez, F.J. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPAR γ target gene, fat-specific protein 27. *Cell Metabolism*, 2008; 7(4): 302–11.

Mates, J.M. Effects of antioxidants enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 2000; 153: 83-104.

Mazzone, T. Apoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Current Opinion Lipides*, 1996; 7: 303-7.

Mazzone, T. Intensive glucose lowering and cardiovascular disease prevention in diabetes: reconciling the recent clinical trial data. *Circulation*, 2010;122:2201–11.

Mensenkamp, A.R.; Jong, M.C.; van Goorf, H.; van Luyn, M.J.A.; Bloks, V.; Havinga, R.; Voshol, P.J.; Hofker, M.H.; van Dijk, K.W.; Havekes, L.M.; Kuipers, F. Apolipoprotein E participates in the regulation of very low density lipoprotein-triglyceride secretion by the liver. *The journal of Biological Chemistry*, 1999; 274 (50): 35711-18.

Mestas, J.; Ley, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovascular Medicine*, 2008; 18(6):228-32.

Miura, T.; Fukuta, A.; Ichiki, H.; Iwamoto, N.; Kato, M.; Kubo, M.; Komatsu, Y.; Ishida, T.; Okada, M.; Tanigawa, K. Hypolipidemic activity of mangiferin in cholesterol-fed mice. *Journal of Traditional Medicines*, 2001b; 18: 119–21.

Miura, T.; Ichiki, H.; Hashimoto, I.; Iwamoto, N.; Kato, M.; Kubo, M.; Komatsu, Y.; Ishida, T.; Okada, M.; Tanigawa, K. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine*, 2001a; 8 (2): 85–87.

Murayama, T.; Yokode, M.; Kataoka, H.; Imabayashi, T.; Yoshida, H.; Sano, H.; Nishikawa, S.; Nishikawa, S.; Kita, T. Intraperitoneal administration of anti-c-fms monoclonal antibody prevents initial events of atherogenesis but does not reduce the size of advanced lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 1999; 99: 1740 –6.

Muruganandan, S.; Gupta, S.; Katarina, M.; Lal, J; Gupta, P.K. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology*, 2002; 176: 165–73.

Muruganandan, S.; Srinivasan, K.; Gupta, S.; Gupta, P.K.; Lal, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; 97: 497–501.

Nadkarni, A.K. *Indian Materia Medica*. 3^a Ed. Popular Prakashan, Bombay, 1954; 764–769.

Nair, P.S.; Shyamaila Devi, C.S. Efficacy of mangiferin on serum and heart tissue lipids in rats subjected to isoproterenol induced cardiotoxicity. *Toxicology*, 2006; 228: 135–139.

Nakashima, Y.; Raines, E.W.; Plump, A.S.; Breslow, J.L.; Ross, R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the apoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1998; 18:842–51.

Niu, Y.; Li, S.; Na, L.; Feng, R.; Liu, L.; Li, Y.; Sun, C. Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK. *Plos One*. 2012; 7(1): 1-8.

Norata, G.D.; Marchesi, P.; Passamonti, S.; Pirillo, A.; Violi, F.; Catapano, A.L. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. 2007; 191: 265–71.

Núñez-Sellés, A.J.; Delgado-Hernández, R.; Garrido-Garrido, R.; García-Rivera, D.; Guevara-García, M.; Pardo-Andreu, G.L. The paradox of natural products as pharmaceuticals – Experimental evidences of a mango stem bark extract. *Pharmacological Research*, 2007; 55: 351–8.

Okumura, T. Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2011; 67(4):629-36.

Olabinri, B.M.; Adebisi, J.A.; Odesomi, O.F.; Olabinri, P.F.; Adeleke, G.E. Experimental classification of the antioxidant capacity of the leaf, stem and root barks of *Mangifera indica* and *Azadirachta indica*. *African Journal of Biotechnology*, 2009; 8 (13): 2968-72.

Ozer, J.; Ratner, M.; Shawc, M.; Bailey, W.; Schomaker, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, 2008; 245: 194–205.

Palinski, W.; Ord, V.A.; Plump, A.S.; Breslow, J.L.; Steinberg, D.; Witztum, J.L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1994; 14(4): 605-16.

Pardo-Andreu, G.L.; Paim, B.A.; Castilho, R.F.; Velho, J.A.; Delgado, R.; Vercesi, A.E.; Oliveira, H.C.F. *Mangifera indica* L extract (Vimang®) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. *Pharmacological Research*, 2008; 57: 332-38.

Pardo-Andreu, G.L.; Barrios, M.F.; Curti, C.; Hernández, I.; Merino, N.; Lemusa, Y.; Martínez, J.; Riño, A.; Delgado, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacological Research*, 2008; 57: 79–86.

Pardo-Andreu, G.L.; Delgado, R.; Velho, J.A.; Curti, C.; Vercesi, A.E. Mangiferin, a natural occurring glycosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2005; 439: 184–93.

Plump, A.S.; Smith, J.D.; Hayek, T.; Aalto-Setälä, K.; Walsh, A.; Verstuyft, J.G.; Rubin, E.M.; Breslow, J.L. Severe hypercholesterolemia and

atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 1992; 71: 343–53.

Prabhu, S.; Jainu, M.; Sabitha, K.E.; Devi, S.C.S. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006; 11; 107 (1): 126–33.

Prabhu, S.; Narayan, S.; Devi, S.S.C. Mechanism of Protective Action of Mangiferin on Suppression of Inflammatory Response and Lysosomal Instability in Rat Model of Myocardial Infarction. *Phytotherapy Research*, 2009; 23: 756–60.

Quintão, E.; Nakandakare, E.R. Manual de Referência em Dislipidemias. São Paulo: Novartis, 1997.

Radi, Z.A.; Koza-Taylor, P.H.; Bell, R.R.; Obert, L.A.; Runnels, H.A.; Beebe, J.S.; Lawton, M.P.; Sadis, S. Increased serum enzyme levels associated with kupffer cell reduction with no signal of hepatic or skeletal muscle injury. *The American Journal of Pathology*, 2011; 179(1): 240-7.

Ramos, A.M., D'Araújo Couto, F.A., Rezende, P.M.; Lelis, F.M.V; Benevides, S.D.; Perez, R. Manga Ubá. Boas práticas agrícolas para produção destinada à agroindústria. Viçosa, MG: UFV, 2005, 64p.

Rao, S.B.S.; Sreedevi, M.V; Rao, B.N. Cytoprotective and antigenotoxic potential of Mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells. *Toxicology*, 2009; 47: 592–600.

Reddick, R.L.; Zhang, S.H.; Maeda, N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1994; 14: 141–7.

Ribeiro, S.M.R.; Queiroz, J.H.; Queiroz, M.E.L.R.; Campos, F.M.C.; Sant'ana, H.M.P. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2007;62: 13–17.

Rodeiro, I.; Donato, M.T.; Martínez, I.; Hernández, I.; Garrido, G.; González-Lavaut, J.A.; Menéndez, R.; Laguna, A.; Castell, J.V.; Gómez-Lechón, M.J. Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. *Toxicology in Vitro*, 2008; 1242-9.

Ross, I.A. *Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*. Humana Press: Totowa, 1999a; 197–205.

Ross, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American Heart Journal*, 1999b; 138: S419–20.

Sairam, K.; Hemalatha, S.; Kumar, A.; Srinivasan, T.; Ganesh, J.; Shankar, M.; Venkataraman, S. Evaluation of anti-diarrhoeal activity in seed extracts of *Mangifera indica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003; 84: 11–15.

Sanchez, G.M.; Re, L.; Giuliani, A.; Nunez-Selles, A.J.; Davison, G.P.; Leon-Fernandez, O.S. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacological Research*, 2000; 42: 565–73.

Sarkar A.; Sreenivasan, Y.; Ramesh, G.T.; Manna, S.K. β -D-Glucoside Suppresses Tumor Necrosis Factor-induced Activation of Nuclear Transcription Factor κ B but Potentiates Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279 [32(6)], 3768–81.

Sato, T.; Kawamoto, A.; Tamura, A.; Tatsumi, Y.; Fujii, T. Mechanism of antioxidant action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1992; 40:721–4.

Sazci, A.; Akpınar, G.; Aygun, C.; Ergul, E.; Senturk, O.; Hulagu, S. Association of Apolipoprotein E Polymorphisms in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Digestive Disease and Science*, 2008; 53:3218–24.

Severi, J.A.; Lima, Z.P.; Kushima, H.; Brito, A.R.M.S.; Santos, L.C.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, A. Polyphenols with Antiulcerogenic Action from Aqueous Decoction of Mango Leaves (*Mangifera indica* L.) *Molecules*, 2009; 14:1098–110.

Shahidi, F.; Naczk, M. Food phenolics: sources, chemistry, effect, applications. Pennsylvania: Technomic, 1995; 331p.

Sharma, L.D.; Bahga, H.S.; Srivastava, P.S. In vitro anthelmintic screening of indigenous medicinal plants against *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) Cobbold, 1998 of sheep and goats. *Indian Journal of Animal Research*, 1971; 5: 33–8.

Sharma, S.R.; Dwivedi, S.K.; Swarup, D. Hypoglycemic potential of *Mangifera indica* leaves in rats. *International Journal of Pharmacology*, 1997; 35 (2): 130–3.

Shieber, A.; Ulrich, W.; Carle, R. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 2000; 1: 161–6.

Singh, Y.N. Traditional medicine in Fiji. Some herbal folk cures used by Fiji Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 1986; 15: 57–88.

Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lammela-Ranverson, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, 1999; 299: 152–78.

Slavin, J.L.; Lloyd, L. Health Benefits of Fruits and Vegetables. American Society for Nutrition, 2012; 3: 506–16.

Smith, D. M.; Harborne, J.B. Xanthones in the Appalachian Asplenium complex. Phytochemistry, 1971; 10: 2117–19.

Stienstra, R.; Saudale, F; Duval, C; Keshtkar, S.; Groener, J.E.M.; van Roojen, N.; Staels, B.; Kersten, S.; Müller, M. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 β -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor α activity. Hepatology, 2010; 51: 511-22.

Stocker, R.; Keaney, J. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. Physiology Reviews, 2004; 84: 1381–478.

Stockand, J.D.; Sanson, S.C. Regulation of filtration rate by glomerular mesangial cells in health and diabetic renal disease. American Journal of Kidney Disease, 1997; 29: 971-81.

Stoilova, I.; Jirovetz, L.; Stoyanova, A.; Krastanov, A.; Gargova, S.; Ho, L. Antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 2008;7 (13): 2706-16.

Sultanbawa, M.U.S. Xanthonoids of tropical plants. Tetrahedron, 1980; 36: 1465–1506.

Vennat, B. *Hamamelis virginiana*: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1992; 67(1): 11-14.

Vassalle, C.; Bianchi, S.; Bianchi, F.; Landi, P.; Battaglia, D.; Carpeggiani, C. Oxidative stress as a predictor of cardiovascular events in coronary artery disease patients. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2012; 50(8):1463-8.

Vilela, P.S; Castro, W.C.; Avelar, S.O.C. Análise da oferta e da demanda de frutas selecionadas no Brasil para o decênio 2006/20015. Disponível em: www.faemg.org.br . Acessado em dezembro de 2009.

Viswanadh, E.K.; Rao, B.N.; Rao, B.S. Antigenotoxic effect of mangiferin and changes in antioxidant enzyme levels of Swiss albino mice treated with cadmiumchloride.Human and Experimental Toxicology, 2010; 29(5): 409-18.

Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 1ª ed. Berlim: Springer Verlag, 1984; 320p.

Wei, Z.; Yan, L.; Deng, J.; Deng, J. Effects of mangiferin on MAPK signaling pathway in chronic inflammation.Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2011 36(13):1798-802.

When, M.; Segerer, S.; Dantas, M.; Brown, P.A.; Hudkins, K.L.; Goodpaster, T.; Kirk, E.; Leboeuf, R.C.; Alpers, C.E. Renal injury in apolipoprotein E-deficient mice. Laboratory Investigation, 2002; 82: 999-1006.

WHO <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>. Acessado em julho de 2012.

Wollenweber, E.; Jay, M. Flavones and flavonols. IN: HARBORNE, J. B. The flavonoids: advances in research since 1980. 1ª ed. London: Chapman and Hall, 1988; 233-302.

Xia, X.; Ling, W.; Ma, J.; Xia, M.; Hou, M.; Wang, Q.;Zhu, H.; Tang, Z. An Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E–Deficient Mice. Journal of Nutrition, 2006; 136, 2220–5.

Yoosook, C.; Bunyaphrathatsara, N.; Boonyakiat, Y.; Kantasuk, C. Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants. Phytomedicine, 2000; 6: 411–9.

Zhang, S.H.; Reddick, R.L.; Piedrahita, J.A.; Maeda, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 1992; 258: 468–71.

Zheng, M.S.; Lu, Z.Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. *Chinese Medical Journal*, 1990; 103: 160–65.

Zhang, Y.; Du, Y.; Le, W.; Wang, K.; Kieffer, N.; Zhang, J. Redox control of the survival of healthy and diseased cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2011; 5(11):2867-908.

Zhu, X.M.; Song, J.X.; Huang, Z.Z.; Wu, Y.M.; Yu, M.J. Antiviral activity of mangiferin against herpes simplex virus type 2 in vitro. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1993; 14(5):452-4.