

RENATA CELI LOPES TOLEDO

**AÇÃO DA MANGIFERINA E DO EXTRATO DAS FOLHAS DE MANGA UBÁ
(*Mangifera indica* L) NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA INFLAMAÇÃO EM
ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015**

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

T

Toledo, Renata Celi Lopes, 1978-
T649a Ação da mangiferina e do extrato das folhas de manga Ubá
2015 (*Mangifera indica* L) no estresse oxidativo e na inflamação em
animais alimentados com dieta de cafeteria / Renata Celi Lopes
Toledo. – Viçosa, MG, 2015.
xiii, 127f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. *Mangifera indica*. 2. Mangiferina. 3. Obesidade.
4. Estresse oxidativo. 5. Antioxidante. 6. Inflamação.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em
Bioquímica Agrícola. II. Título.


CDD 22. ed. 583.77

RENATA CELI LOPES TOLEDO

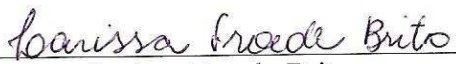
**AÇÃO DA MANGIFERINA E DO EXTRATO DAS FOLHAS DE MANGA UBÁ
(*Mangifera indica* L.) NO ESTRESSE OXIDATIVO E NA INFLAMAÇÃO EM
ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA**

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2015.



Leandro Licursi de Oliveira



Larissa Froede Brito



Maria do Carmo Gouveia Peluzio



Hercia Stampini Duarte Martino
(Coorientadora)



José Humberto de Queiroz
(Orientador)

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve. A vida é muita, para ser *insignificante.*”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por ser fonte de força e sabedoria.

Aos meus pais, Penha Lopes Toledo e José de Queiroz Toledo pelo incentivo, amor e compreensão durante todos estes anos de estudos. Em especial a minha mãe pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos pelo carinho e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos sobrinhos pela bagunça e descontração que faz cada momento ser tão especial.

Ao meu querido orientador, José Humberto de Queiroz, por todos estes anos de compreensão, ensinamentos e amizade. Estendo o agradecimento a sua esposa, Maria Eliana Lopes de Queiroz, pela receptividade, carinho e agradável convívio em todos os momentos.

A professora Hércia Stampini Duarte Martino, muito mais do que uma chefe, exemplo de competência, compreensão e companheirismo. Muito obrigada pelo carinho e apoio incondicional durante estes dois anos.

A professora Sônia Machado Rocha Ribeiro pelos ensinamentos, pelo carinho e por ter feito parte desta equipe desde o início, mestrado e doutorado, contribuindo imensamente para a minha formação.

A professora Elizabeth Pacheco Batista Fontes, pessoa responsável pelo meu ingresso na UFV, pelo apoio, aprendizado e incentivo. Com certeza você é a grande responsável por eu ter chegado até aqui. Muito obrigada.

A Universidade Federal de Viçosa pelos conhecimentos adquiridos durante todos estes anos. Sinto-me muito honrada em fazer parte desta renomada Instituição.

Ao Departamento de Nutrição e Saúde pela liberação para o término do doutorado.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelos ensinamentos, em especial aos professores Luciano Fietto e Cláudio Mafra pela participação como membros da banca de qualificação e pelas sugestões pertinentes para esse trabalho.

As professoras Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Hércia Stampini por terem feito parte da banca de qualificação e de defesa do doutorado contribuindo imensamente para a finalização deste trabalho.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira pelos ensinamentos e disposição em ajudar nas análises de citometria de fluxo e por ter aceitado compor a banca de defesa contribuindo para com o trabalho.

Aos funcionários do DBB, em especial ao secretário do Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, Eduardo Monteiro, pela agradável convivência e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo e Fermentação pela agradável convivência e companheirismo. Em especial à Mônica Magalhães Caetano, meu braço direito nesta caminhada, pessoa responsável e competente, a quem devo a realização deste trabalho. Muito obrigada!!!

As minhas queridas amigas, Izabela Montezano e Larissa Froede Brito, pelos momentos maravilhosos durante todos esses anos de convívio. Em especial a Larissa, a grande idealizadora deste projeto; este trabalho também é seu. Obrigada por tudo!!!

Aos membros do laboratório de Nutrição Experimental, onde fui presenteada por Deus a trabalhar, pelo harmonioso convívio e compreensão pelas vezes em que não pude atender a todos.

Aos colegas de outros laboratórios, Adriana, Fabrício, Paulo, Paty, Carlão, Gabriel, Igor, e em especial ao Rafael pela ajuda nas análises de RT-PCR.

Aos amigos que fizeram parte desta longa caminhada deixando os momentos difíceis mais divertidos, Camila Rocha, Carolina Rocha, Francine Pilon, Ritinha, Dudu. Vocês fazem muita falta.

A todos os meus amigos pelo apoio e incentivo durante esta jornada, em especial a minha amiga Ana responsável por ouvir as minhas lamentações, rrsrrsr.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV onde foram realizadas as análises de citometria de fluxo.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

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

Muito Obrigada a Todos!!!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | x |
| ABSTRACT | xii |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 2 |
| 3. OBJETIVOS | 12 |
| 3.1. Objetivo Geral..... | 12 |
| 3.2. Objetivos Específicos..... | 12 |
| CAPÍTULO 1: EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DA FOLHA DE Mangifera indica L E DA MANGIFERINA EM FÍGADO DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA | 13 |
| Resumo..... | 14 |
| Abstract..... | 15 |
| 1. Introdução..... | 16 |
| 2. Material e Métodos..... | 18 |
| 2.1. Obtenção do extrato e da mangiferina..... | 18 |
| 2.2. Ensaio Biológico..... | 19 |
| 2.3. Análises..... | 20 |
| 2.3.1. Peso relativo do fígado..... | 20 |
| 2.3.2. Parâmetros avaliados no homogeneizado de fígado..... | 20 |
| 2.3.3. Expressão de Gênica de HSP72, CB1, PPAR α , NF κ B, TNF- α , IL10..... | 21 |
| 2.4. Análise Estatística..... | 22 |
| 3. Resultados..... | 23 |
| 4. Discussão..... | 28 |
| 5. Conclusão..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 6. Referências Bibliográficas..... | 30 |
| CAPÍTULO 2: AÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE MANGA E MANGIFERINA NA MODULAÇÃO DE GENES ANTI-INFLAMATÓRIOS HEPÁTICOS VIA SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES CB1 E PPAR-α..... | 36 |
| Resumo..... | 37 |
| Abstract..... | 38 |
| 1. Introdução..... | 39 |
| 2. Material e Métodos..... | 42 |
| 2.1. Obtenção do Extrato e da Mangiferina..... | 42 |
| 2.2. Ensaio Biológico..... | 43 |
| 2.2.1. Dieta hiperlipídica..... | 43 |
| 2.2.2. Desenho experimental..... | 43 |
| 2.3. Análises..... | 44 |
| 2.3.1. Peso relativo do fígado..... | 44 |
| 2.3.2. Parâmetros avaliados no homogeneizado de fígado..... | 45 |
| 2.3.3. Expressão de Gênica de HSP72, CB1, PPAR α , NF κ B, TNF- α , IL10..... | 46 |
| 2.4. Análise Estatística..... | 47 |
| 3. Resultados..... | 47 |
| 4. Discussão..... | 54 |
| 5. Conclusão..... | 57 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 57 |
| CAPÍTULO 3: EXTRATO DE <i>Mangifera indica</i> E MANGIFERINA MODULAM GENES INFLAMATÓRIOS NO CÉREBRO DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA..... | 66 |
| Resumo..... | 67 |
| Abstract..... | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 69 |
| 2. Material e Métodos..... | 72 |
| 2.1. Obtenção do Extrato e da Mangiferina..... | 72 |
| 2.2. Ensaio Biológico..... | 74 |
| 2.2.1. Dieta hiperlipídica..... | 73 |
| 2.2.2. Desenho experimental..... | 73 |
| 2.3. Análises Realizadas..... | 74 |
| 2.3.1. Atividade antioxidante..... | 74 |
| 2.3.2. Atividade anti-inflamatória..... | 75 |
| 2.4. Análise Estatística..... | 76 |
| 3. Resultados..... | 76 |
| 4. Discussão..... | 83 |
| 5. Conclusão..... | 84 |
| 6. Referências Bibliográficas..... | 85 |
| CAPÍTULO 4: EFEITO PROTETIVO DO EXTRATO DE <i>Mangifera indica</i> E MANGIFERINA SOBRE O CÉREBRO DE ANIMAIS ALIMENTOS COM DIETA DE CAFETERIA..... | 91 |
| Resumo..... | 92 |
| Abstract..... | 93 |
| 1. Introdução..... | 93 |
| 2. Material e Métodos..... | 95 |
| 2.1. Obtenção do Extrato e da Mangiferina..... | 95 |
| 2.2. Ensaio Biológico..... | 96 |
| 2.3. Análises Realizadas..... | 97 |
| 2.3.1. Peso relativo do cérebro..... | 97 |

| | |
|--|------------|
| 2.3.2. Parâmetros avaliados no homogeneizado do cérebro..... | 97 |
| 2.3.3. Expressão de Gênica de HSP72, CB1, PPAR α , NF κ B, TNF- α , IL10..... | 98 |
| 2.4. Análise Estatística..... | 99 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 99 |
| 4. Conclusão..... | 104 |
| 5. Referências Bibliográficas..... | 105 |
| 4. CONCLUSÃO GERAL..... | 110 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 113 |

RESUMO

TOLEDO, Renata Celi Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Ação da mangiferina e do extrato das folhas de manga Ubá (*Mangifera indica* L) no estresse oxidativo e na inflamação em animais alimentados com dieta de cafeteria.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

A dieta rica em gordura e carboidratos simples, e pobre em fibras é considerada um dos principais fatores responsáveis pelo aumento da obesidade. Esta doença está associada com a ocorrência de estresse oxidativo, resistência à insulina e baixo grau de inflamação sistêmica subclínica. Estudos mostram que a *Mangifera indica* L tem um elevado potencial bioativo, possuindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, imunomodulatória, entre outras, as quais são atribuídas especialmente a mangiferina, seu principal composto bioativo. Estas propriedades funcionais demonstram o potencial destes compostos na prevenção e tratamento de várias desordens metabólicas. Os receptores canabinóides CB1 e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) têm um papel central na regulação da homeostase energética e na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios; estando associados ainda com a redução do processo inflamatório. Além desses receptores as proteínas de choque térmico promovem um amplo estado anti-inflamatório, uma vez que estas chaperonas bloqueiam os fatores de transcrição pró-inflamatórios. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito antioxidante do extrato das folhas de *Mangifera indica* (manga variedade Ubá) e da mangiferina e a ação destes sobre a modulação gênica de receptores e marcadores inflamatórios e anti-inflamatórios no tecido hepático e cerebral de animais alimentados com dieta de cafeteria. O efeito do extrato (250 mg/kg) e da mangiferina (40 mg/kg) foi avaliado de duas formas: ofertados juntamente com a dieta hiperlipídica por oito dias e administrados por cinco dias após sete dias de ingestão da dieta de cafeteria. Os resultados demonstraram que tanto o extrato da folha de manga quanto a mangiferina exerceram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios no fígado e cérebro de animais alimentados com dieta de cafeteria. O período curto de administração dos tratamentos foi suficiente para prevenir e reverter as alterações hepáticas e cerebrais causadas pela dieta hiperlipídica, uma vez que, no geral, favoreceram o equilíbrio redox com aumento da atividade da superóxido dismutase e diminuição da peroxidação lipídica e interferiram sobre os marcadores inflamatórios com diminuição da expressão e concentração destes. Além disso, foi verificado que a ação da mangiferina em diminuir a expressão gênica de citocinas inflamatórias pode estar relacionada com a via de sinalização

do receptor CB1 e PPAR, uma vez que o uso de antagonistas destes bloqueou o efeito anti-inflamatório desta xantona. Portanto, o presente estudo reforça a importância da mangiferina e do extrato de folha de manga na prevenção e no tratamento de desordens hepáticas e cerebrais decorrente da obesidade.

ABSTRACT

TOLEDO, Renata Celi Lopes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Action of mangiferin and Ubá mango leaves extract (*Mangifera indica* L) in oxidative stress and inflammation in animals fed with cafeteria diet.** Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-Advisor: Hércia Stampini Duarte Martino.

The diet high in fat and simple carbohydrates and low in fiber is considered one of the main factors responsible for the increase in obesity. This disease is associated with the occurrence of oxidative stress, insulin resistance, and subclinical low degree of systemic inflammation. The *Mangifera indica* L has a high potential bioactive having antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory properties, which are specially assigned mangiferin, its major bioactive compound, presenting great potential in the prevention and treatment of various metabolic disorders. The cannabinoid receptors CB1 and peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) have a central role in regulating the energy homeostasis, regulation of carbohydrate and lipid metabolism, and reduce the inflammatory process. The heat shock proteins promote a broad anti-inflammatory state, since these chaperones block the pro-inflammatory transcription factors. The aim of this study was to evaluate the antioxidant effect of the *Mangifera indica* leaves extract (mango variety Ubá) and mangiferin and their action in the gene inflammatory and anti-inflammatory modulation and of receptors and in the liver and brain of animals fed with cafeteria diet. The effect of the extract (250 mg / kg) and mangiferin (40 mg / kg) was evaluated in two ways: offered along with the high fat diet for eight days and administered for five seven days after ingestion of a cafeteria diet. The results showed that both the mango leaf extract as mangiferin exerted antioxidant and anti-inflammatory activity. The study showed that the cafeteria diet intake and treatment for a short period of time were sufficient to prevent and reverse the liver and brain changes caused by hyperlipidemia diet since, in general, favored the redox equilibrium with increased superoxide dismutase activity and lipid peroxidation decreased and interfere on inflammatory markers with expression and concentration decreased of these. Furthermore, it was found that the action of mangiferin to reduce inflammatory genes can be related to the signaling pathway of CB1 and PPAR, since the receptors antagonists interfered in the anti-inflammatory effect of xanthone. Therefore, this study reinforces the importance of mangiferin and mango leaf extract in the prevention and treatment of liver and brain disorders resulting from obesity, highlighting the need for further studies to confirm these effects

1. INTRODUÇÃO GERAL

A dieta rica em gordura saturada e açúcares e pobre em fibras é considerada um dos principais fatores responsáveis pelo constante aumento da incidência da obesidade em todo o mundo. Esta doença está associada à ocorrência de um processo inflamatório crônico de grau leve, sendo a resistência insulínica (RI), o possível elo entre eles, uma vez que o defeito da ação deste hormônio nos tecidos leva ao aumento do processo inflamatório com elevação da expressão gênica e das concentrações plasmáticas do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), entre outras citocinas inflamatórias.

É relatado que em desordens metabólicas associadas à obesidade, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), ocorre uma baixa expressão do fator de choque térmico 1 (HSF-1) e baixos níveis das proteínas de choque térmico (HSPs) nos tecidos insulino-sensíveis, devido à sinalização prejudicada da insulina nesta doença. Ao contrário do que ocorre no DM2 a ativação do HSF-1 e a subsequente expressão de HSP promove um amplo estado anti-inflamatório, uma vez que estas chaperonas bloqueiam os fatores de transcrição pró-inflamatórios como o fator nuclear kappa B (NF- κ B). Portanto, pressupõe que um aumento da HSPs deva diminuir a inflamação e melhorar a ação da insulina.

A inflamação pode induzir ou agravar danos cerebrais através do aumento da liberação de mediadores neurotóxicos, tais como óxido nítrico sintetase (NOS) e espécies reativas de oxigênio (EROS) assim como TNF- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6, eicosanóides.

O processo inflamatório pode ser controlado no organismo por diferentes mecanismos como os associados aos receptores canabinóides (CBs) e aos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR).

Os receptores canabinóides têm um pronunciado efeito inibitório na função das células imunes. Agonistas dos CBs são capazes de reduzir a inflamação que ocorre nas doenças neurodegenerativas e/ou neuroinflamatórias, possivelmente por ativarem os receptores CB₁, modulando a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células da glia.

Os PPARs exercem uma grande variedade de funções fisiológicas, tendo um papel central na regulação do metabolismo lipídico, na homeostase da glicose e na proliferação celular e apoptose. A ativação do PPAR inibe a transcrição de genes pró-inflamatórios ao impedir a sinalização do NF- κ B. Nos últimos anos, estudos revelaram um papel crucial dos PPARs na atenuação da neuroinflamação e morte neuronal do sistema nervoso central (SNC) lesionado podendo estes efeitos neuroprotetores serem atribuídos à inibição das citocinas dependentes de NF- κ B (IL-1, IL-8, TNF).

Evidências sugerem haver uma interação funcional entre os receptores canabinóides e os PPARs, onde os endocanabinoides, ligantes do primeiro, podem ativar o segundo desencadeando uma ação anti-inflamatória independente ou não dos CBs. Diante disto, existe um grande interesse científico de isolar, identificar, e sintetizar compostos com atividades farmacológicas, que possam ser empregados na prevenção e tratamento de doenças. É relatado na literatura que uma grande variedade de produtos naturais apresenta atividade sobre o SNC, sendo os estudos farmacológicos de extratos e produtos isolados, que exercem suas ações através de interações com neurotransmissores, responsáveis pela compreensão das bases neuroquímicas de muitas doenças.

A *Mangifera indica* é amplamente utilizada como planta medicinal, sendo diferentes partes desta exploradas com variadas finalidades terapêuticas. O extrato aquoso da casca de *Mangifera indica* tem sido utilizado como analgésico, anti-inflamatório, redutor do estresse oxidativo, etc. Entre os compostos bioativos presente no extrato da *Mangifera indica*, a mangiferina é apontada como um dos principais responsáveis por esses efeitos, além de apresentarem atividade antiviral, antitumoral, antidiabética, antiobesidade e hipolipidemiante. O conjunto destas propriedades farmacológicas destaca a mangiferina e o extrato da folha de manga com potencial valor no tratamento destas desordens metabólica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O elevado consumo de alimentos ricos em gordura saturada e açúcares e pobre em fibras, associado a um estilo de vida sedentário são considerados os principais fatores responsáveis pelo constante aumento da incidência da obesidade, a qual é apontada como um dos mais expressivos fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade (RADAK et al., 2008). A Organização Mundial de Saúde estima que em 2014 em torno de 600 milhões de indivíduos apresentavam obesidade, com índice de massa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, e que aproximadamente 1,9 bilhões de pessoas apresentavam sobrepeso (IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) em todo o Mundo, sendo o Brasil o quinto país com maior número de indivíduos com sobrepeso (WHO, 2015).

A obesidade é caracterizada por um acúmulo de gordura que inicialmente ocorre no tecido adiposo e posteriormente nos órgãos como fígado, pâncreas, cérebro e músculo esquelético (RUIZ et al., 2009).

Vários estudos, utilizando ratos wistar, demonstraram que a obesidade pode ser induzida por meio de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas (dieta ocidental ou dieta de cafeteria) (KRETSCHMER et al., 2005; BURNEIKO et al., 2006), a qual é caracterizada por induzir não somente o estoque de lipídios no tecido adiposo, mas também o estresse oxidativo caracterizado pela inflamação (MILAGRO et al., 2006; ECHARRI et al., 2009; BELTOWSKI et al., 2009; BRUNETTI et al., 2009; RUIZ et al., 2009; SCOARIS et al., 2010).

O acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo promove a infiltração de macrófagos ocasionando um quadro de inflamação crônica de grau leve neste tecido, a qual se estende para outros órgãos como fígado e cérebro (ALVES et al., 2012; ALEMANY, 2013). Este estado inflamatório crônico é refletido no SNC pela ativação de astroglia e microglia e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo, levando a um declínio cognitivo (THIRUMANGALAKUDI et al., 2008).

Nos últimos anos, estudos demonstraram uma forte relação entre a obesidade, inflamação crônica e resistência à insulina. Adipócitos e macrófagos secretam citocinas inflamatórias, como TNF- α , que ativam a c-jun N-terminal quinase (JNK) e a quinase inibidora de I κ B (IKK) em órgãos sensíveis à insulina (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo). A JNK e IKK prejudicam a função do receptor de insulina e interferem na sua sinalização levando a uma deposição de lipídeos em excesso no fígado e adipócitos, elevando os níveis de metabólitos lipídicos (ceramida e diacilglicerol). Estes lipídeos ativam diretamente a JNK e IKK, ampliando assim o defeito na sinalização da insulina. Portanto, o bloqueio na sinalização destas quinases protege contra a obesidade induzida por resistência à insulina (HOTAMIŞLIGIL, 2006; SHOELSON et al., 2006).

A sinalização prejudicada da insulina reduz as proteínas de choque térmico (HSP72). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está associado a uma baixa expressão do fator transcricional de choque térmico 1 (HSF-1) e baixos níveis de HSP72 nos tecidos insulino-sensíveis (ATALAY et al, 2004; BRUCE et al., 2003; KAVANAGH et al, 2008). Em modelos animais diabéticos a restauração dos níveis de insulina aumenta as HSPs, enquanto que a interrupção da sua cascata de sinalização impede a translocação nuclear do HSF-1 por fosforilação deste fator, diminuindo assim a expressão destas proteínas (CHU et al., 1998).

Chung e colaboradores (2008) demonstraram que a indução de super expressão de HSP70 impediu a ativação de JNK e o desenvolvimento de resistência à insulina em ratos alimentados com dieta rica em gordura, apresentando estes animais um quarto de gordura

corporal da linhagem selvagem. As chaperonas, HSPs, reduziram a inflamação e restauraram a homeostase da glicose em um modelo de rato de diabetes mellitus tipo 2 (ÖZCAN et al., 2006). Estes achados identificam um papel essencial da HSP70 em bloquear a inflamação e impedir a resistência à insulina na obesidade (CHUNG et al., 2008; HOOPER; HOOPER, 2009).

As HSPs, proteínas de choque térmico ou Heat Shock Proteins, são polipeptídeos altamente conservados e agrupados em famílias, de acordo com suas sequências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (MAYER; BUKAU, 2005; GABAI; SHERMAN, 2002). Essas proteínas são consideradas “chaperonas” moleculares atuando em mecanismo que conferem proteção ao organismo, uma vez que, sem fazer parte da estrutura final das proteínas, desempenham funções importantes evitando interações incorretas entre elas, auxiliando na sua síntese, montagem final e na translocação destas para os compartimentos celulares (MAYER; BUKAU, 2005).

As HSPs são encontradas em pequenas concentrações e em diferentes compartimentos dentro das células, sendo em caso de injúria desencadeadas respostas intracelulares, que se inicia com a redução transitória da síntese de proteínas não vitais, seguida por um aumento na transcrição, tradução e expressão de genes específicos que levam ao aumento da concentração das HSPs (WISCHMEYER, 2002; BURG et al., 2007).

A ativação dessas proteínas é um dos principais mecanismos para o aumento da capacidade da célula de sobreviver a alterações na sua homeostase em decorrência da exposição a agentes estressores (GABAI; SHERMAN, 2002).

As proteínas HSPs atuam em diversos processos anti-apoptótico (BURG et al., 2007), na inibição de vias de sinalização intracelular, tais como a da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do NF- κ B (SINGLETON et al., 2005), reduzindo a ativação de sinais de tradução e expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β e o TNF- α . As HSPs diminuem ainda o nível do glutamato nas sinapses impedindo assim a translocação do NF- κ B ao núcleo levando ao bloqueio desta via (SINGLETON et al., 2005). Portanto, com o aumento da expressão da proteína HSP obtém-se um efeito anti-inflamatório devido ao bloqueio dos fatores de transcrição pró-inflamatório, como NF- κ B, e conseqüentemente com inibição da expressão de marcadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS (TAWFIK et al., 2012).

O NF- κ B no SNC atua tanto em condições de injúria, modulando processos inflamatórios e de apoptose, como também está presente constitutivamente em neurônios participando de funções fisiológicas do SNC. A quantidade do NF- κ B na forma ativa pode

variando de acordo com a atividade sináptica, sendo que a aplicação do neurotransmissor excitatório, glutamato e do agonista glutamatérgico NMDA (N-methyl-D-aspartate) em células granulares de cerebelo é capaz de ativar a translocação do NF- κ B ao núcleo, enquanto a utilização de antagonistas de receptores excitatórios diminui a ativação sináptica basal do fator de transcrição (GUERRINI et al., 1995). De acordo com estudos, a via de sinalização do NF- κ B, parece ter grande importância em doenças neurológicas podendo as proteínas envolvidas nesta via serem potenciais alvos para intervenções terapêuticas nestas enfermidades.

A patogênese da resistência à insulina (RI) tem como fator principal o aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres (AGL) que por meio de ações específicas levam a inibição dos receptores responsáveis pela sinalização da insulina, além de induzirem o estresse oxidativo, a inflamação e a reatividade vascular subnormal (LE MARCHAND-BRUSTEL, 2003; TRIPATHY et al., 2003). A RI frequentemente coexiste como um estado subagudo pró-inflamatório crônico (ROCHE, 2004), onde as citocinas pró-inflamatórias derivadas do tecido adiposo são a via chave no desenvolvimento desta resistência (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003), a qual se caracteriza por um ciclo vicioso de lipólise, devido à ativação constante da lipase hormônio sensível nos adipócitos, ocasionando em um aumento de ácidos graxos livres (AGL), resistência a insulina e inflamação (PACKER; SIES, 2007; FONSECA-ALANIZ et al., 2007).

Vários estudos apontam para uma associação entre a obesidade e o estado inflamatório, mostrando que na obesidade ocorre um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-6 (KERN et al., 2001; PRADHAN et al., 2001; XU et al., 2003; DANDONA et al., 2004), os quais podem ser reduzidos por uma variedade de fatores incluindo dieta (ESPÓSITO, 2004), exercícios (DEVARAJ et al., 2004) e farmacoterapia, como no uso do bloqueador dos receptores CB₁ como o rimonabanto (DESPRES et al., 2005), e uso dos agonistas de PPAR α e PPAR γ (ESPOSITO, 2006).

O sistema endocanabinóide (SECB) é um importante sistema de sinalização endógena que atua na regulação da homeostase energética e no metabolismo, sendo esta ação localizada, ativada e inativada rapidamente (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006). Este sistema é constituído pelos receptores canabinóides (CB₁ e CB₂), os endocanabinóides e as enzimas que catalisam sua biossíntese e degradação (MATOS et al., 2006; SVÍZENSKÁ, et al., 2008) e agem no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010). As substâncias agonistas

endógenas, 2AG (2-araçdonoil glicerol) e anandamida (N-araçdonoil etanolamina), são bem conhecidas e foram designadas como endocanabinóides (ECB), os quais atuam nos receptores CB₁ e CB₂ (DAMIANI; DAMIANI, 2011). Estes receptores são polipeptídios com sete hélices transmembrana simples que são ativados pela proteína G e inibidos pela adenilato ciclase (AC), diminuindo a produção de AMP cíclico (AMPC); abertura dos canais de K⁺, e transmissão de sinais e fechamento dos canais de Ca⁺², levando a um decréscimo na liberação de neurotransmissores (JOY et al., 1999, SARNE; KEREN, 2004; HOWLETT; MUKHOPADHYAY, 2000; TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010).

Os receptores CB₁ são encontrados em várias áreas do cérebro (hipotálamo, hipófise, núcleos da base, cerebelo, sistema nervoso entérico), fígado, tecido adiposo, músculo esquelético e trato gastrointestinal. Já os receptores CB₂ estão localizados nas células do sistema imunológico como as células B e T, micróglia, baço e tonsilas (PACHER et al., 2006; PACHER; MACKIE, 2012).

A ativação do receptor CB₁ desencadeia efeito orexígeno e maior motivação para a alimentação. Nos tecidos periféricos, os receptores CB₁ estão relacionados ao aumento da lipogênese (tecido adiposo, fígado, trato gastrointestinal e músculo esquelético) alterando assim o metabolismo da glicose. Especula-se que na obesidade o sistema endocanabinóide permaneça ativado. Atualmente dispõe-se de ferramentas farmacológicas que bloqueiam o receptor CB₁, suprimindo assim o apetite (DAMIANI; DAMIANI, 2011).

Os canabinóides são terpenos fenólicos bioativos presentes na Cannabis sativa, a qual contém mais de 60 destes compostos químicos como o Δ8-tetraidrocanabinol (Δ8-THC) e o Δ9-tetraidrocanabinol (Δ9-THC) (SVÍZENSKÁ et al., 2008). Devido às propriedades terapêuticas dos canabinóides existe um grande interesse científico no papel biológico e fisiológico que estes desempenham nos seres humanos (TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010), havendo atualmente progressos na compreensão do mecanismo de distribuição, armazenagem e eliminação dos canabinóides e seus metabólitos (HONÓRIO et al., 2006).

Os endocanabinóides, 2-AG e anandamida, são derivados de ácidos graxos de cadeia longa (PUFAs), especificamente o ácido araquidônico, sendo respectivamente sintetizados pela N-acilfosfatidiletalona-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) e a lipase sn-1-diacilglicerol-seletiva fosfolipase (DAG Lipase) (MCALLISTER; GLASS, 2002; FRANCISCHETTI; ABREU, 2006) e hidrolisados pelas enzimas lipase sn-1-diacilglicerol-seletiva fosfolipase (DAG Lipase) e N-acilfosfatidiletalona-seletiva (FAAH) (MATOS et al., 2006; MARZO; MATIAS, 2005).

Diferentemente do usual os endocanabinóides agem como mensageiros cerebrais retrógrados (CHRISTIE et al., 2001; PETROCELLIS et al., 2004; MATOS et al., 2006), uma vez que o estímulo começa no neurônio pós-sináptico e a excitação neuronal desencadeia sinais que estimulam várias fosfolipases, iniciando a síntese dos endocanabinóides que são liberados na fenda sináptica e se difundem para estimular os receptores CB₁ nos terminais pré-sinápticos neuronais (MARZO; MATIAS, 2005). Os ECB são prontamente sintetizados e liberados para as células, onde e quando forem necessários não sendo, portanto armazenados (CHRISTIE et al., 2001; MATOS et al., 2006). Estudos demonstraram uma associação entre o polimorfismo no gene da FAAH e a obesidade em humanos, uma vez que esta enzima, quando inativada, pode determinar maior atividade do sistema ocasionando um efeito orexígeno podendo levar à obesidade e à síndrome metabólica (SIPE et al., 2005).

Além do SECB o organismo dispõe de outro sistema relacionado à homeostase energética, conhecido como Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPARs), o qual exerce várias funções fisiológicas, sendo de grande importância na regulação do metabolismo lipídico, na homeostase da glicose e na proliferação celular e apoptose. Estes receptores respondem a uma variedade de sinais biológicos, como ácidos graxos, eicosanóides, ligantes sintéticos (JANKE et al., 2006), estatinas (JASINSKA et al., 2007), antagonistas do ácido retinóico (SCHUPP et al., 2007), flavonóides (SALAM et al., 2008) e compostos de frutas cítricas (KUROYANAGI et al., 2008).

Os agonistas de PPAR, as tiazolidinodionas (pioglitazona e rosiglitazona) são drogas sensibilizadoras da ação da insulina que estimulam a diferenciação de adipócitos pequenos, que apresentam maior sensibilidade a este hormônio, e a apoptose dos adipócitos maiores, que são os principais responsáveis pela liberação de ácidos graxos livres, secreção de TNF- α e IL-6 (LARSEN et al., 2003). Estes medicamentos exercem seus efeitos através da ligação ao PPAR γ , o qual se liga a elementos de resposta no DNA e regulam diversos genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, inflamação, trombose, função endotelial e crescimento celular (SCHIFFRIN, 2005). As outras isoformas de PPARs (PPAR α , PPAR β/δ) também são ativadas por ácidos graxos, sendo expressas em diversos locais onde o catabolismo destes ácidos é alto como fígado, coração, rins e músculo esquelético (BERGER, 2002).

Todos os três isotipos de PPARs são expressos no SNC de ratos durante a embriogênese. Os PPAR β/δ permanecem altamente expressos neste tecido, sendo encontrados em neurônios de numerosas áreas do cérebro de roedores adultos, já a

expressão de PPAR α e PPAR γ diminui no cérebro após o nascimento e são localizados em áreas mais restritas deste órgão (BRAISSANT et al., 1996; MORENO et al., 2004).

A localização de PPARs também tem sido investigada em culturas de células neurais. PPAR β/δ são expressos em oligodendrócitos imaturos onde a sua ativação promove diferenciação, e maturação da mielina. O isotipo PPAR γ é a isoforma dominante em microglia. Os astrócitos possuem todos os três isotipos PPAR, embora a diferentes graus, dependendo da área do cérebro e idade do animal (CRISTIANO et al., 2001).

O papel dos PPARs no SNC está relacionado principalmente ao metabolismo lipídico, no entanto, esses receptores têm sido implicados na diferenciação e morte de células neurais. A expressão do PPARs em relação à inflamação e neurodegeneração no cérebro vêm sendo extensivamente estudada, tendo sido sugerido que os PPARs possam regular, por meio de vários mecanismos, as vias inflamatórias e oxidativas, apresentando os agonistas destes receptores importante papel na neuroproteção. Por exemplo, a ativação PPAR α pode induzir a expressão e ativação de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e de glutatona peroxidase (GSH) (TOYAMA et al., 2004).

Estudos com ratos demonstraram que a administração de um agonista altamente seletivo de PPAR α , WY14643, 30 minutos antes da isquemia cerebral, diminuiu a produção de EROs e a peroxidação lipídica, além de protegerem contra a depleção de GSH (COLLINO et al., 2006). Ratos knockout de PPAR γ apresentaram aumentos significativos do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica (POYNTER; DAYNES, 1998).

Estudos in vitro demonstraram que o pré-tratamento com agonistas de PPAR γ protegeu linhagem de células do hipocampo de ratos contra estresse oxidativo induzido por glutamato ou peróxido de hidrogênio (AOUN et al., 2003).

Os agonistas PPAR γ interrompem parcialmente a cadeia respiratória mitocondrial, interferindo tanto no transporte de elétrons quanto na geração de ânion superóxido, contribuindo na inibição da geração de espécies reativas de oxigênio. Outro mecanismo através do qual os agonistas de PPARs podem fornecer neuroproteção é por baixa regulação da resposta inflamatória. A duração e conseqüências dos eventos inflamatórios podem ser moduladas de diferente intensidade dependendo da isoforma envolvida do PPAR e seu agonista (COLLINO et al., 2006).

Os PPARs podem suprimir as atividades de muitas famílias distintas de fatores de transcrição, sendo os fatores afetados e os mecanismos envolvidos diferentes para cada

isotipo de PPAR, embora um mecanismo comum de neuroproteção de PPAR α e PPAR γ parece envolver a inibição da MAPK p38 e ativação e translocação nuclear de NF- κ B. A proteína inibidora I κ B α , que é um indicador da atividade transcricional de NF- κ B, é aumentada no cérebro de ratos submetidos à isquemia cerebral e completamente bloqueada por rosiglitazona confirmando que a administração de ligantes de PPAR γ tanto endógenos quanto sintéticos inibe a sinalização de NF- κ B (PEREIRA et al., 2006).

Embora os dados clínicos sejam limitados, uma grande variedade de provas obtidas em modelos animais mostra que a ativação de PPAR pode ser uma estratégia eficiente contra danos no cérebro. As ações neuroprotetoras parecem estar principalmente relacionadas com a redução dos danos oxidativos, bem como dos efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos (FUNG et al., 2012).

A atividade anti-inflamatória desencadeada pelos PPARs pode estar diretamente ou indiretamente ligada aos canabinóides existindo uma pequena similaridade estrutural entre estes e os ligantes de PPAR (O'SULLIVAN; KENDALL, 2010). Portanto a ativação de PPAR pode ocorrer por diferentes mecanismos, como por exemplo, as estatinas podem aumentar a função de PPAR pela ativação da via MAPK (YANO et al., 2007), ou pela estimulação dos receptores canabinóides (UPHAM et al., 2003; DEMUTH; MOLLEMAN, 2006).

Em lesões no SNC ocorre ativação da via de sinalização do NF- κ B estimulando a transcrição de genes pró-inflamatórios e pró-apoptóticos, porém na presença de agonistas dos receptores PPAR e de canabinóides como o dexanabinol e o Rimonabanto®, ocorre uma inibição da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, mediadores pró-apoptóticos e do estresse oxidativo impedindo assim a sinalização do NF- κ B e a ocorrência de uma lesão cerebral secundária (STAHEL et al., 2008). No entanto ainda não está esclarecido se as drogas derivadas dos canabinóides são capazes de atenuar o processo inflamatório de doenças crônicas.

Sugere-se que os canabinóides agem tanto nos receptores CBs quanto nos receptores PPARs, apresentando efeito benéfico no processo inflamatório envolvido em diversas desordens metabólicas (RANDALL et al., 2007), sendo que antagonistas dos receptores CB₁ como o Rimonabanto®, mostraram modular negativamente a resposta inflamatória em modelos de endotoxemia e peritonite em camundongos interferindo na liberação e expressão de citocinas e outras moléculas inflamatórias, assim como diretamente sobre o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (SMITH et al., 2000; 2001). Portanto, o processo inflamatório pode ser controlado por meio destes

receptores, os quais podem ser ativados tanto por ligantes sintéticos quanto pelos derivados de plantas, onde uma grande variedade de extratos vegetais e seus compostos bioativos isolados agem como ligantes principalmente dos receptores PPARs.

A *Mangifera indica* (família Anacardiaceae) é uma fruta nativa do sudeste asiático, mais precisamente da Índia, onde é cultivada há mais de quatro mil anos. O Brasil foi o primeiro país da América a cultivar a mangueira que foi trazida pelos portugueses no século XVI (FILHO et al., 2004).

A manga figura entre as frutas tropicais de maior expressão econômica nos mercados brasileiro e internacional. O Brasil ocupa o sétimo lugar entre os maiores produtores mundiais de manga. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2013, o Brasil apresentou uma produção de 1.163.000 toneladas, sendo Minas Gerais o quarto maior produtor nacional, ficando atrás somente dos Estados da Bahia, de São Paulo e de Pernambuco (IBGE, 2015). A manga da variedade Ubá bastante conhecida em algumas regiões do Brasil, sobretudo em Minas Gerais, destaca-se industrialmente na fabricação de sucos por possuir excelentes qualidades de sabor, aroma e coloração após o processamento industrial (FARAONI et al., 2009).

Esta fruta apresenta elevado valor nutricional, sendo uma fonte rica em carotenóides, β -caroteno, vitamina A e C e compostos fenólicos. Dentre as variedades de manga, Tommy Athins, Palmer, Haden e Ubá, a polpa desta última apresentou os maiores teores destes compostos antioxidantes (RIBEIRO et al., 2007). Foram ainda identificados um total de doze flavonóides e xantonas em polpas, cascas e caroços destas variedades, sendo a Ubá a que apresentou maior atividade antioxidante (RIBEIRO et al., 2008), além de propriedades imunomoduladora (MAKARE et al., 2001), antimutagênica (BOTTING et al., 1999; PRASAD et al., 2007) e anticarcinogênica (PERCIVAL et al., 2006).

Mangifera indica, além de ser comercialmente importante, é amplamente utilizada como planta medicinal, principalmente na África, Índia e Cuba, sendo diferentes partes desta planta exploradas com diversas finalidades terapêuticas, como no tratamento da dor, artrite, diabetes, infecções cutâneas e parasitárias, entre outras (SHARMA et al., 1971; SINGH, 1986; COE; ANDERSON, 1996; ROSS, 1999). O extrato aquoso da casca do tronco da *Mangifera indica* apresenta altos teores de polifenóis (NÚÑEZ-SELLÉZ et al., 2007), sendo comercializado como fitoterápico por apresentar propriedades antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias e imunomodulatórias (MARTINEZ et al., 2001; GARCÍA et al., 2002; LEIRO et al., 2004b; GARRIDO et al., 2004; PARDO-ANDREU et al., 2008).

Pesquisas demonstram que o extrato das folhas de *M. indica*, foco do presente estudo, apresentam, *in vitro*, propriedades antioxidante, anti-apoptótica e antibacteriana e, *in vivo*, atividades gastroprotetora e hipoglicemiante (SHARMA et al., 1997; ADERIBIGBE et al., 1999; BBOSA et al., 2007; SEVERI et al., 2009, OLABINRI et al., 2009; LING et al., 2009; SANGEETHA et al., 2010).

Entre os compostos bioativos presente no extrato da *Mangifera indica*, destaca-se a mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-beta-D-glicosídeo), uma glicosil xantona presente em uma grande variedade de vegetais superiores como os pertencentes às famílias Gentianaceae e Anacardiaceae (PARDO-ANDREU et al., 2005).

Estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* indicam que a mangiferina apresenta uma grande variedade de propriedades farmacológicas, como anti-obesidade (GIRÓN et al., 2009; SANGEETHA et al., 2010), antidiabética (ICHIKI et al., 1998; MURUGANANDAN et al., 2002, GIRÓN et al., 2009) e hipolipemiante (NAIR; DEVI, 2006), anti-inflamatória (LEIRO et al., 2004a; PRABHU et al., 2009), antioxidante (SÁNCHEZ et al., 2000; GOTTLIEB et al., 2006; PRABHU et al., 2006; PARDO-ANDREU et al., 2008), antitumoral, imunomodulatória (GUHA et al., 1996), hepatoprotetora (DAR et al., 2005) e neuroprotetora (GOTTLIEB et al., 2006; CAMPOS-ESPARZA et al., 2009).

O conjunto destas propriedades farmacológicas destaca a mangiferina e o extrato da folha de manga com potencial valor no tratamento das desordens relacionadas à obesidade, principalmente à ocasionada pela ingestão de dieta rica em gordura, cuja ingestão frequente, independente do quadro instalado da obesidade, pode estar relacionada a vários efeitos deletérios ao organismo.

A compreensão minuciosa dos fatores que promovem o quadro clínico da inflamação no início do desenvolvimento da obesidade é fundamental para o progresso das intervenções preventivas e terapêuticas nesta doença. Diante disso, devido às inúmeras propriedades farmacológicas atribuídas ao extrato da folha de manga e principalmente à mangiferina, estes aparecem como potencial terapêutico no controle e tratamento de diferentes desordens metabólicas. O presente estudo baseia-se na hipótese de que a mangiferina e o extrato da folha de manga possam ser ligantes do receptor CB₁ e/ou do receptor PPAR- α , apresentando efeitos benéficos no processo inflamatório.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar o efeito da mangiferina e do extrato de folhas de manga (*Mangifera indica* L. variedade Ubá) na modulação gênica da inflamação no cérebro e no fígado de animais alimentados com dieta de cafeteria. Além disso, teve o intuito de avaliar a associação do processo inflamatório com a via dos receptores CB₁ e dos receptores PPAR- α .

3.1. Objetivos Específicos

- Avaliar, no cérebro e no fígado dos animais, o efeito da mangiferina e do extrato de folha de manga na (s):
 - Expressão gênica dos receptores CB₁ e PPAR- α , das citocinas IL-10 e TNF- α , do NF κ B (p65), e da proteína HSP 70.
 - Ativação do fator de transcrição NF κ B (p65) por meio da técnica Elisa.
 - Concentrações de TNF- α e IL-10 por citometria de fluxo.
 - Peroxidação lipídica por determinação da concentração de malondialdeído.
 - Defesa antioxidante pela determinação da atividade da superóxido dismutase.

**CAPÍTULO 1: EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO EXTRATO DA
FOLHA DE MANGIFERA INDICA L E DA MANGIFERINA EM FÍGADO
DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA**

Efeito anti-inflamatório do extrato da folha de *Mangifera indica* L e da mangiferina em fígado de ratos alimentados com dieta de cafeteria

Effect anti-inflammatory of the leaf extract of *Mangifera indica* L and mangiferin on the liver of mice fed a high fat diet

RESUMO

A dieta de cafeteria devido ao seu alto teor de gordura e açúcares simples pode levar a obesidade e a um quadro de inflamação. O acúmulo de gordura nos tecidos desencadeia um estresse oxidativo, induzindo a uma resposta inflamatória crônica de grau leve, a qual é favorecida pela baixa expressão da proteína HSP 72. Os receptores canabinóides CB₁ e os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR) estão envolvidos na sensibilidade à insulina e no processo inflamatório, podendo o primeiro comportar-se como pró ou anti-inflamatório, enquanto o segundo desencadeia atividades anti-inflamatórias. O extrato da folha de manga e a mangiferina, principal composto bioativo deste, possuem propriedades farmacológicas antioxidante, anti-inflamatória, dentre outras. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do extrato da folha de manga, variedade Ubá e da mangiferina sobre a prevenção de alterações no tecido hepático decorrente da ingestão de dieta rica em gordura. O estudo foi composto por três grupos; DC: dieta de cafeteria, DC + extrato da folha de manga (250 mg/kg) e DC + mangiferina (40 mg/kg), os quais receberam os tratamentos por oito dias. Foram realizadas as análises hepáticas de: peroxidação lipídica (MDA), atividade da superóxido dismutase (SOD), expressão gênica de HSP72, CB₁, PPAR- α , NF κ B, IL10, TNF- α , concentração de IL-10 e TNF- α e atividade de NF κ B (p65). O grupo que recebeu mangiferina apresentou um aumento na expressão do mRNA de PPAR- α , CB₁ e HSP70, diminuiu o mRNA de IL10, mas não alterou o mRNA de TNF- α e NF κ B. O extrato de folha de manga diminuiu a expressão do mRNA de CB₁, aumentou PPAR- α , reduziu IL10 e não alterou a expressão gênica de HSP70, NF κ B e TNF- α . No entanto, ambos os tratamentos diminuíram a atividade de NF κ B (p65), aumentaram a concentração de IL10 e atividade da SOD, mas não alteraram concentração de MDA no fígado dos animais. Portanto, o presente estudo destaca o potencial do extrato da folha da manga Ubá e mangiferina na prevenção da inflamação hepática causada pela dieta rica em gordura.

Palavra chave: *Mangifera indica* L., mangiferina, estresse oxidativo, inflamação, dieta de cafeteria.

ABSTRACT

The cafeteria diet with high fat and simple sugars may lead to obesity and inflammation. The accumulation of fat in the tissues leads to oxidative stress, which triggers an inflammatory response chronic mild, which is favored by the low expression of the protein HSP 72. The CB₁ and PPAR alpha receptors are involved in the insulin sensitivity and inflammations, allowing the second behave as pro or anti-inflammatory, while the first trigger has anti-inflammatory activities. The leaf extract of *Mangifera indica* and mangiferin, the main bioactive compound, have pharmacological properties like antioxidant and anti-inflammatory activities, among others. The objective of the study was to evaluate the effect of mango leaf extract and mangiferin isolated from the same, to prevent changes in the liver caused by eating a diet high in fat. Three animal groups were fed a cafeteria diet (DC); DC + extract (250 mg/kg); and DC + mangiferin (40 mg/kg). After 8 days, were evaluated, lipid peroxidation (MDA), superoxide dismutase (SOD), gene expression of HSP-70, CB₁, PPAR- α , NF κ B, IL10, TNF- α , concentration of IL-10 and TNF- α . The mangiferin group showed increased mRNA expression for PPAR- α , CB₁ and HSP72; null mRNA; alteration for TNF- α and NF κ B; and reduced mRNA for IL-10. The extract group showed reduced mRNA expression for CB₁ and IL-10; increased expression for PPAR- α ; and null gene expression alteration for HSP72, NF κ B, and TNF- α . Both treatments led to SOD activity and IL-10 increases, p65 reduction and with no effect on MDA concentration. The present study highlights the potential of mango leaf extract Ubá and mangiferin to prevent liver inflammation caused by fat-rich diets.

Keyword: mangiferin, leaf extract of *Mangifera indica*, superoxide dismutase, lipid peroxidation, inflammation, cafeteria diet.

A prevalência da obesidade tem aumentado em todo o mundo, tornando-se um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. A etiologia da obesidade é multifatorial por estar associada a fatores genéticos, ambientais e a alterações no sistema neurológico, endócrino e imunológico. A obesidade é considerada um fator primário para a instalação de distúrbios metabólicos e doenças crônicas, como resistência à insulina, hipertensão e síndrome metabólica estando associada com estresse oxidativo e inflamação crônica de baixo grau (EGGER; DIXON, 2009; REAVEN, 1988; SCOARIS et al., 2010; PACKER; SIES, 2007).

Homeostase energética e lipídica pode ser controlada pelo sistema endocannabinoide (receptor canabinóide CB₁) e pelos receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006; BERMUDEZ-SILVA et al., 2010). Os canabinóides, além de exercer ação sobre o metabolismo energético com aumento do apetite e do armazenamento de gordura, estes ainda apresentam efeitos sobre vários processos fisiológicos como a diminuição da inflamação, da ansiedade e da memória (CROWE et al., 2014).

Os PPARs ao serem ativados pelos seus ligantes naturais (ácidos graxos saturados e insaturados e seus derivados as prostaglandinas e leucotrienos) exercem ação o metabolismo energético de modo a promover a oxidação de ácidos graxos, a diferenciação de adipócitos, a sensibilidade à insulina, e a atividade anti-inflamatória (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; MICHALIK et al., 2006).

O acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo induz estresse oxidativo e infiltração de macrófagos neste tecido, ocasionando uma inflamação crônica de grau leve com ativação de vias inflamatórias que levam a resistência à insulina (ALVES et al., 2012; ALEMANY, 2013). A Inflamação crônica sistêmica associada à obesidade tem sua origem em uma disfunção do tecido adiposo, tais como mudanças na secreção de adipocinas, estresse oxidativo, hipóxia deste tecido, entre outros (FORSYTHE et al., 2008; HEREDIA et al., 2012). O fígado é um órgão mais afetado na obesidade, onde a gordura intra-abdominal metabolicamente ativo, pode induzir a inflamação e, portanto, a doença hepática gordurosa não alcoólica (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZE et al., 2013).

O processo inflamatório é regulado por um mecanismo de feedback negativo, onde a secreção de citocinas anti-inflamatórias é seguida pela redução da acumulação de espécies de oxigênio reactivas (EROS). O sistema de defesa antioxidante celular (enzimas

e elementos de baixo peso molecular) também é ativado para limitar o desenvolvimento de inflamação crônica (BULLO et al., 2005). Quando a disponibilidade de antioxidantes encontra-se limitada, o dano por espécies reativas pode resultar no estresse oxidativo, causando lesão tecidual direta, peroxidação lipídica das membranas celulares, carbonilação das proteínas e alteração do DNA (RIBEIRO et al., 2005).

A primeira linha de defesa contra os radicais livres no organismo ocorre pela ação das superóxido dismutases (EC 1.15.1.1), que por dismutação do ânion superóxido produz o peróxido de hidrogênio, o qual é convertido em água pela ação da catalase e/ou glutathione peroxidase. Além dessas enzimas, o organismo dispõe de outros sistemas antioxidantes, como a indução de síntese de proteínas de choque térmico, HSP 70 (Heat Shock Proteins), as quais têm sua expressão aumentada em variadas condições de estresse metabólico (VELLOSA et al., 2007).

A relação da HSP 70 com a inflamação é controversa na literatura. Vários estudos sugerem que esta chaperona exerce um papel pró-inflamatório por induzir o fluxo intracelular de cálcio e ativar o NFκB (ASEA et al., 2002; BASU et al., 2001). Em contrapartida outros estudos relatam que a HSP 70 exerce um papel citoprotetor, uma vez que regula negativamente a transcrição do gene TNF-α por recrutar o fator de transcrição HSF1 (FERAT-OSORIO et al., 2014).

Chung e colaboradores (2008) demonstram que seres humanos, obesos, resistentes à insulina têm reduzida expressão da proteína HSP 70 e aumento da fosforilação da proteína c-Jun N-terminal quinase (JNK). Fatores estes responsáveis pelo ciclo vicioso de inflamação e resistência à insulina na obesidade. Portanto, com o aumento da expressão da proteína HSP 70 obtém-se um efeito anti-inflamatório devido ao bloqueio dos fatores de transcrição pró-inflamatório, como NFκB (SINGLETON et al., 2005).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo de antioxidantes na dieta está inversamente relacionado à incidência de doenças crônicas. Estes antioxidantes desempenham um importante papel na regulação redox, atenuando a inflamação, através da diminuição da atividade de fatores de transcrição, tais como NF-κB, que podem ser ativados pelas EROS (JACKSON et al., 1998; CHUANG; MCINTOSH et al., 2011).

Produtos naturais vêm sendo utilizados na medicina popular por apresentarem várias ações como atividade antidiabética, hipolipemiante, anti-inflamatória, anti-obesidade, dentre outras propriedades farmacológicas. Diante disto, vem se desencadeando o interesse de várias pesquisas científicas na tentativa de isolar, identificar, e sintetizar compostos com atividades farmacológicas, que possam ser empregados na prevenção e

tratamento de doenças relacionadas ao metabolismo energético total, como por exemplo, novos agonistas para receptores PPARs (BRITO et al., 2013).

Em estudo anterior comprovou-se que a polpa, a casca e o caroço de manga da variedade Ubá apresentam um alto teor de antioxidantes, sendo este constituído por um total de 12 flavonóides e xantonas (RIBEIRO et al., 2008). O extrato aquoso da casca da mangueira (*Mangifera indica* L.) é estudado há algum tempo, sendo relatado, entre outros, o seu efeito anti-inflamatório e antioxidante, os quais são direcionados principalmente à mangiferina. No entanto, pesquisas relatam que a ação farmacológica exercida pela mangiferina não apresenta a mesma intensidade que a dos diferentes tipos de extratos, indicando que existe um sinergismo entre os diversos componentes bioativos (GARRIDO-SUÁREZ et al., 2010).

O conjunto destas propriedades farmacológicas sugere que a mangiferina e o extrato da folha de *Mangifera indica* L. tenham potencial valor na prevenção e tratamento das alterações fisiológicas que ocorrem no tecido hepático em decorrência da síndrome metabólica e das doenças cardiovasculares.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da mangiferina e do extrato das folhas de *Mangifera indica* L, em impedir o surgimento de estresse oxidativo e inflamação hepática em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, tipo cafeteria.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do extrato e da mangiferina

As folhas de *Mangifera indica* L., variedade Ubá, foram coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, e a exsicata, depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC nº 37.611). As folhas foram secas a temperatura ambiente e trituradas obtendo-se um pulverizado que foi utilizado para obtenção do extrato etanólico 95% por percolação exaustiva e concentração a vácuo em evaporador rotativo, a 60°C. O concentrado foi então liofilizado, com um rendimento final de aproximadamente 27% a partir da droga vegetal seca.

Para o isolamento da mangiferina foi feito o mesmo procedimento de obtenção do extrato, sendo a amostra anteriormente desengordurada em soxhlet, utilizando como solvente o éter de petróleo, durante 12 horas. Após esse processo, o extrato foi submetido a

sucessivas recristalizações com acetato de etila tendo um rendimento final de 3,6% de mangiferina a partir da droga vegetal seca. O procedimento de purificação foi monitorado por cromatografia de camada delgada e a pureza do composto avaliada por HPLC comparando-se o cromatograma ao padrão de mangiferina (Sigma Aldrich). A metodologia utilizada nesses processos foi adaptada de Muruganandan et al., 2002.

2.2. Ensaio Biológico

O estudo foi realizado após ser aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 28/2012). Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, com 25 dias de idade, submetidos a um período experimental de duas semanas. Os animais foram divididos em três grupos constituídos de oito animais cada (n= 8). Tanto o extrato das folhas de manga da variedade Ubá, como a mangiferina isolada, foram oferecidos aos animais por gavagem, na concentração de 250 mg/Kg e 40 mg/Kg, respectivamente, utilizando como veículo o composto dimetilsulfoxi (DMSO).

Os animais foram distribuídos em gaiolas coletivas, com ventilação apropriada, e mantidos em sala climatizada com temperatura média de 22°C e foto período (claro/escuro) de 12 horas. Os ratos foram alimentados, durante sete dias, com ração comercial, e a partir daí foi ofertada a dieta de cafeteria e os tratamentos por um período de oito dias. A distribuição calórica da dieta continha 9,8% de proteínas, 31,4% de carboidratos e 58,8% de lipídios, sendo constituída dos seguintes alimentos: patê de presunto, batata palha, bacon, mortadela, biscoito maisena, achocolatado, leite em pó integral e ração comercial nas proporções de 2:1:1:1:1:1:1. Durante todo o experimento, os animais foram alimentados com a dieta e água ad libitum.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais G1 (cafeteria + DMSO), G2 (cafeteria + extrato) e G3 (cafeteria + mangiferina).

Após oito dias de tratamento, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas e em seguida eutanasiados e o fígado coletado, pesado e armazenado a -80°C para as análises de peroxidação lipídica por malondialdeído, atividade da superóxido dismutase, concentração de IL10 e TNF- α , análise de NF κ B p65 e expressão gênica de marcadores inflamatórios (CB₁, PPAR α , NF κ B, HSP72, IL-10 e TNF- α).

2.3. Análises

2.3.1. Peso Relativo do Fígado

Este parâmetro é também denominado de índice hepatossomático (IHS), sendo determinado pela relação entre o peso do fígado e o peso corporal, segundo a fórmula:

$$\text{IHS} = (\text{peso do fígado} / \text{peso corporal}) \times 100$$

2.3.2. Parâmetros avaliados no homogeneizado de fígado

O homogeneizado do fígado foi preparado com 500 mg do tecido em 5 mL de tampão Tris (0,01 M, pH 7,4) utilizando um homogeneizador com banho de gelo. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados sob refrigeração e o sobrenadante retirado e armazenado a -80°C . Este homogeneizado foi utilizado para as análises de malondialdeído e atividade da superóxido dismutase.

- Concentração de malondialdeído (MDA): A determinação de MDA foi feita pelo teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Foram adicionados em 400 μl de sobrenadante do homogeneizado, 1 ml de ácido tricloroacético 20% e 400 μl de ácido tiobarbitúrico 1,6%. A mistura foi incubada por 1 hora, a 95°C , sendo em seguida acrescentados 1,6 ml de n-butanol, e centrifugada por 10 minutos a 3000 r.p.m com a retirada da fase orgânica, na qual foi determinada a absorvância em 510, 532, e 560 nm. Para o cálculo dos valores finais utilizou-se a seguinte equação, proposta para minimizar a interferência dos pigmentos heme e da hemoglobina na dosagem de MDA (PYLES et al., 1993):

$$\text{MDA}_{532} = 1,22[(A_{532}) - (0,56) (A_{510}) + (0,44) (A_{560})]$$

A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978), sendo os resultados expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína (MDA/PTN). A proteína total do homogeneizado do fígado foi quantificada, segundo o método de Bradford (1976).

- **Atividade da superóxido dismutase (SOD):** A quantificação desta enzima é dada em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. No meio de reação foram utilizados 20 µL de homogeneizado de fígado, 8µL de pirogalol 24 mmol/L e 4 µL de catalase 30 µmol/L, completando para 200 µL com tampão Tris-HCl-EDTA 0,01 M (pH 7,4). Os cálculos foram realizados segundo a equação linear obtida pela curva padrão, a qual teve cinco concentrações de SOD (1U – 5U). A leitura de absorvância foi feita a 420 nm, sendo os resultados expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1985).

Determinação de citocinas por citometria de fluxo: As citocinas foram medidas na fração citoplasmática do tecido hepático. Utilizou-se o kit NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction (Pierce Biotechnology / Thermo Fisher Scientific Inc, MA, EUA), com o qual separou-se o extrato nuclear e o citoplasmático do homogeneizado de fígado. Estas frações foram armazenadas a -80°C até a análise por citometria de fluxo. As concentrações de IL-10 e TNF-α foram realizadas pelo método de imunocitoquímica utilizando anticorpos específicos conjugados com partículas fluorescente (Rat Cytokine capture beads). Para esta análise utilizou-se kits comerciais (BD Biociences, CA, EUA), seguindo protocolos do fabricante. Os resultados (pg / ml) foram obtidos utilizando-se o software FCAP Array (BD Biociences, CA, EUA).

Análise de NFκB (p65): A atividade de p65 foi determinada utilizando um kit específico *NFκB (p65) Transcription Factor Assay* (Cayman Chemical), segundo instruções do fabricante. O extrato nuclear, 10 µL, foi incubado durante a noite em placa de 96 poços contendo uma sequência específica de dsDNA, na qual ocorre a ligação do NFκB (p65) contido na amostra. Este é então detectado por incubação com um anticorpo primário específico para a forma ativada de p65, que é, em seguida, incubada com anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase. A quantidade de NFκB (p65) foi avaliada a 450 nm em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific), sendo o resultado obtido de acordo com a absorvância do controle positivo.

2.3.3. Expressão de Gênica de HSP72, CB₁, PPARα, NFκB, TNF-α, IL10: A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, USA), sendo a concentração e pureza avaliados em espectrofotômetro Multiskan Go (Thermo Scientific,

DE, USA) e a integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose. Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Brasil Ltda.), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) utilizando o equipamento AB StepOne Real Time PCR System e o reagente 2X SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems, CA, USA). O volume final de cada reação foi de 10 µl, sendo 2 µl do cDNA; 0,8 µl da mistura dos iniciadores a 2,5 µM (senso e antisenso), 5,0 µl do reagente Sybr Green 2,2 µl de água ultra pura. Os parâmetros utilizados na corrida foram 15 min a 95° C e em seguida 40 ciclos de 95° C (15s), 60° C (30s) e 72° C (30s), seguido pela análise da curva de melting. Os iniciadores foram: HSP72 (Fw-AGGCCAACAAGATCACCATC, Rv-TAGGACTCGAGCGCATTCTT), CB₁ (Fw-ATATTCTCTGGAAGGCTCACAGCC, Rv-GAGCATACTGCAGAATGCAAACACC), NFκB (Fw-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA, Rv-TCGCACTTGTAACGGAAACG), PPAR-α (Fw-CCTGCCTTCCCTGTGAACT, Rv-ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA), TNF-α (Fw-ACGGCATGGATCTCAAAGAC, Rv-AGATAGCAAATCGGCTGACG), IL10 (Fw-ACTACCATAGCCACAACGCA, Rv-TTTCTGTTTCCTACGGCGCT). Foi utilizado como controle endógeno o gene GAPDH (Fw-GGTTGTCTCCTGTCACTTC, Rv-CTGTTGCTGTAGCCATATTC). Os iniciadores foram desenhado utilizando o programa Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), de acordo com os requisitos para PCR em tempo real.

2.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. Para análise descritiva dos dados e testes de comparação de grupos independentes utilizou-se o software Sigma Plot 11.0. Para avaliação da distribuição das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv, sendo aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-wallis em comparações de variâncias múltiplas e o teste de Wilcoxon para comparação de dois grupos independentes quando as distribuições não apresentaram normalidade. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi realizada análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey ou Dunnett para variáveis múltiplas e o teste T para dois grupos independentes. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

No experimento onde se avaliou o efeito do extrato da folha de manga e da mangiferina na prevenção das alterações fisiológicas relacionadas à ingestão da dieta tipo cafeteria verificou-se que não houve diferença significativa entre estes grupos no teor de malondialdeído (tabela 1). Os grupos que receberam os tratamentos apresentaram maior atividade da SOD que o controle, sendo a mangiferina a que mais intensificou esta defesa antioxidante. O índice hepatossomático (IHS) foi menor no grupo que recebeu o extrato juntamente com a dieta de cafeteria.

Tabela 1. Proteína total, concentração de malondialdeído, atividade da superóxido dismutase do tecido hepático e IHS de ratos alimentados com dieta de cafeteria e submetidos a diferentes tratamentos por 8 dias.

| Grupos | PTN (mg/mL) | MDA (nMol/mg PTN) | SOD (U/mg PTN) | IHS |
|-----------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| DC | 5,63 ± 0,30 ^a | 1,16 ± 0,09 ^a | 34,28 ± 12,77 ^c | 4,79 ± 0,42 ^a |
| DC + EFM | 5,41 ± 0,31 ^a | 1,01 ± 0,17 ^a | 84,02 ± 3,62 ^b | 3,94 ± 0,42 ^b |
| DC + MANG | 5,57 ± 0,51 ^a | 1,02 ± 0,16 ^a | 101,48 ± 12,77 ^a | 4,62 ± 0,38 ^a |

Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). PTN: Proteína total; MDA: Malondialdeído; SOD: atividade da superóxido dismutase; IHS: Índice hepatossomático (peso relativo do fígado = (peso do fígado/peso corporal) x 100); DC: dieta de cafeteria + DMSO; DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato da folha de manga (250 mg/kg); DC + MANG: dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg).

A mangiferina demonstrou exercer efeito sobre o mRNA da HSP72, elevando significativamente a sua expressão, enquanto o extrato não interferiu na expressão do mRNA desta chaperona (figura 1).

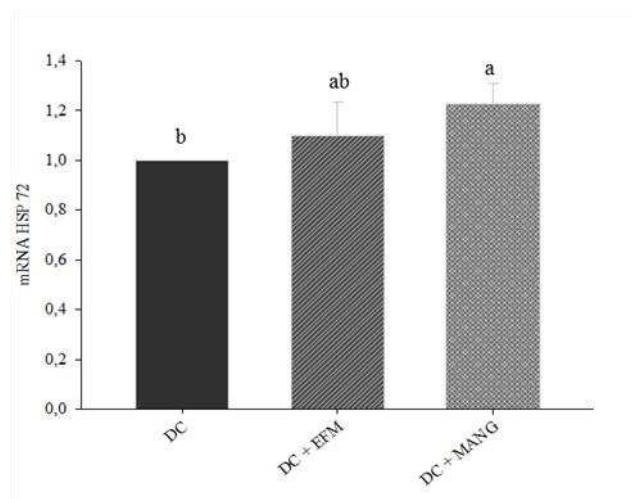


Figura 1 – Expressão gênica da HSP 72 no tecido hepático de ratos submetidos a diferentes tratamentos, durante 8 dias. Controle: Dieta de cafeteria (DC) + DMSO; DC + EFM: DC + extrato de folha de manga; DC + MANG: DC + mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os tratamentos influenciaram significativamente a expressão do mRNA dos receptores CB1 e PPAR- α (figuras 2 e 3).

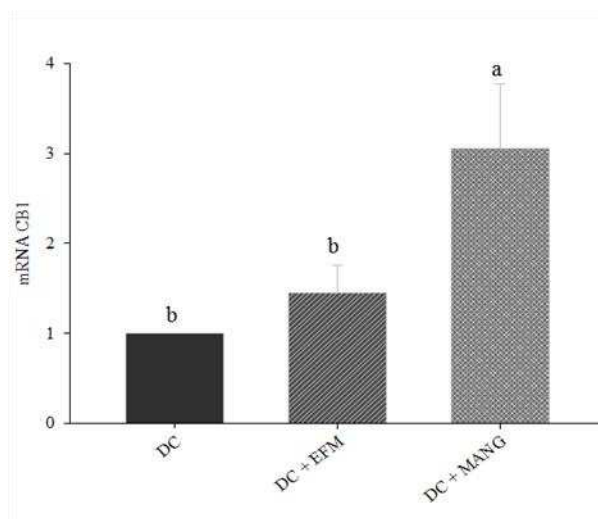


Figura 2. Expressão gênica do receptor endocanabinóide CB1 no fígado de ratos submetidos a diferentes tratamentos. DC: Dieta de cafeteria (DC) + DMSO; DC + EFM: DC + extrato de folha de manga; DC + MANG: DC + mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Como mostrado na figura 2, o grupo que recebeu o extrato de M. indica, apresentou expressão do receptor CB₁ igual ao grupo controle. Já os animais tratados com a

mangiferina apresentaram uma elevação significativa da expressão destes receptores comparados aos demais grupos.

Ambos os tratamentos aumentaram a expressão gênica do receptor PPAR- α , sendo a mangiferina a que demonstrou exercer um maior efeito, sendo diferente tanto do controle quanto do grupo que recebeu o extrato de *M. indica* (figura 3).

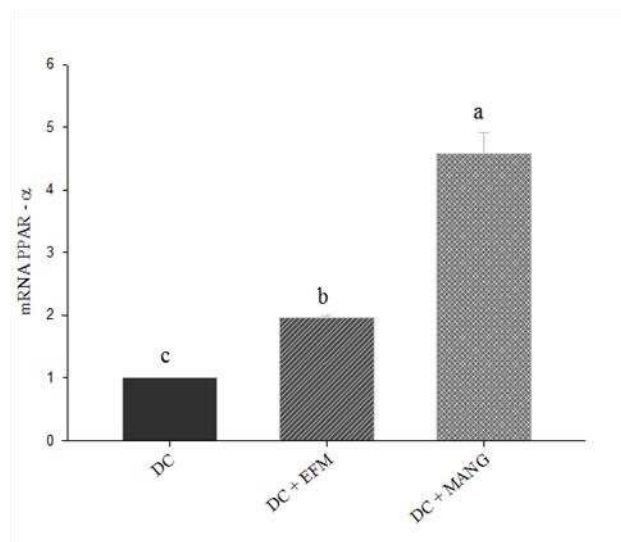


Figura 3. Expressão gênica do receptor PPAR α no fígado dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. DC: Dieta de cafeteria (DC) + DMSO; DC + EFM: DC + extrato de folha de manga; DC + MANG: DC + mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Não houve diferença significativa na expressão do mRNA de NF κ B entre os grupos. Entretanto, os animais que receberam os tratamentos apresentaram menor atividade de NF κ B (p65) (Figura 4).

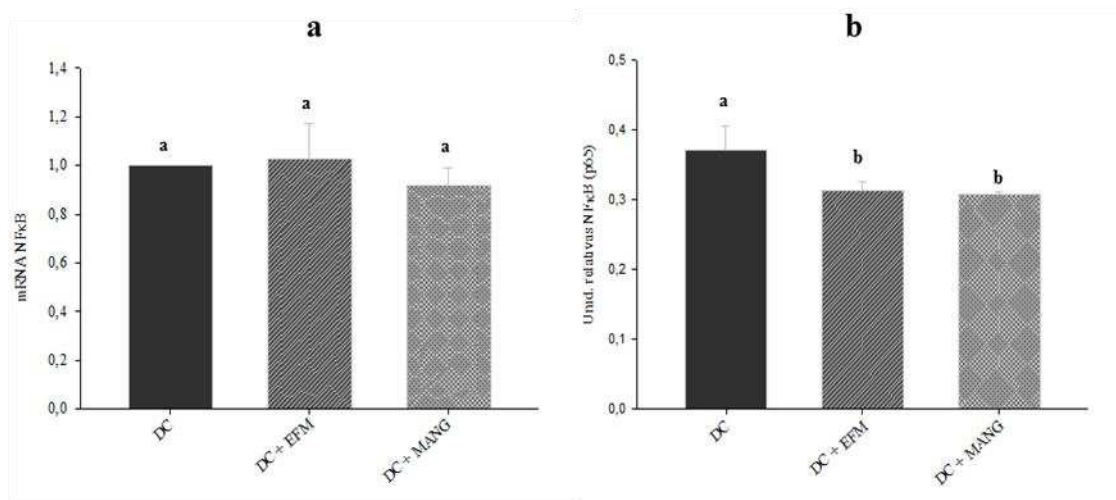


Figura 4. Expressão gênica e atividade de NFκB p65 nuclear no fígado dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. (a) Expressão de mRNA de NFκB p65 por quantificação relativa (qRT-PCR). (b) Atividade de NFκB (p65) (unidade relativa) no extrato nuclear hepático. DC: Dieta de cafeteria (DC) + DMSO; DC + EFM: DC + extrato de folha de manga; DC + MANG: DC + mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os tratamentos não interferiram na expressão e concentração de TNF- α no fígado dos animais, apesar dos grupos de tratamentos demonstrarem uma tendência em reduzir tanto a expressão quanto a concentração desta citocina pró-inflamatória (Figura 5).

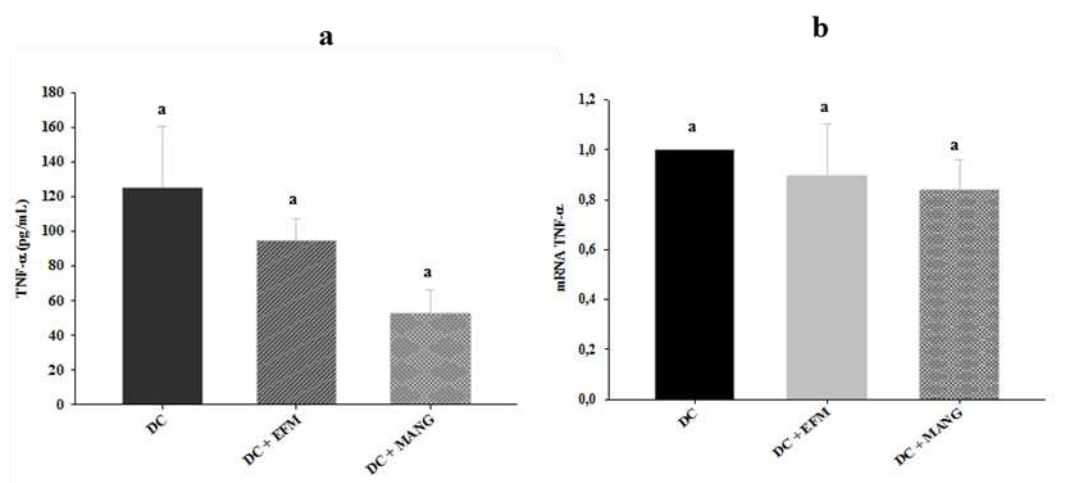


Figura 5. Concentração e expressão gênica de TNF- α no fígado dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos. (a) Concentração citosólica de TNF- α (pg/ml). (b) Expressão do mRNA de TNF- α por quantificação relativa (qRT-

PCR). DC: Dieta de cafeteria + DMSO; DC + EFM: DC + extrato de folha de manga; DC + MANG: DC + mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Em relação a citocina IL-10, os animais que receberam os tratamentos mostraram uma expressão do gene mais baixa do que o grupo controle, enquanto que a sua concentração foi significativamente mais elevada.

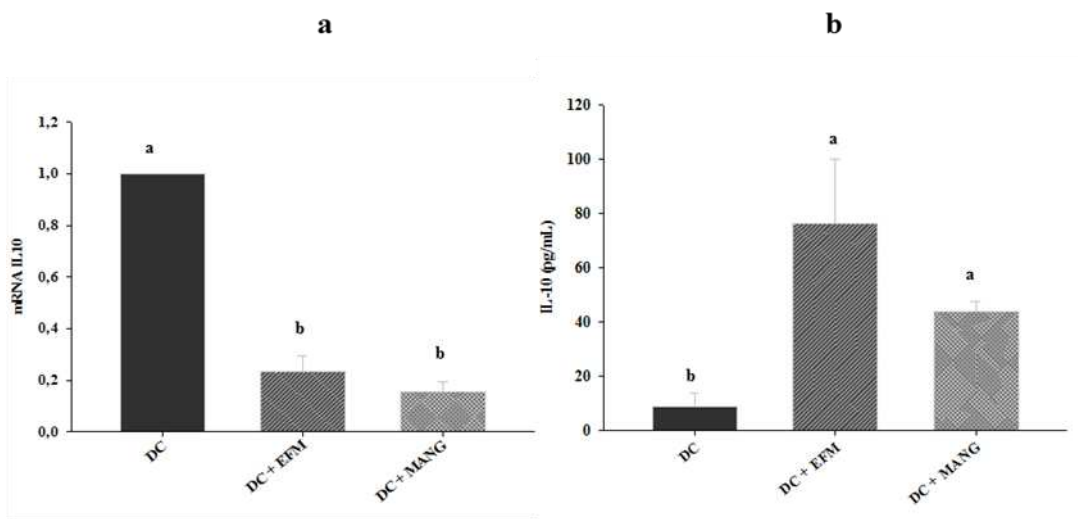


Figura 6. Expressão e concentração de IL10 em fígado de ratos submetidos aos diferentes tratamentos. (a) Concentração citosólica de IL10 (pg/ml). (b) Expressão do mRNA de IL10 por quantificação relativa (qRT-PCR). DC: Dieta de cafeteria + DMSO; DC + EFM: DC + extrato de folha de manga; DC + MANG: DC + mangiferina. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

A contradição entre a expressão gênica e a concentração de IL-10 no tecido hepático dos animais que receberam a dieta de cafeteria pode ser devido a alguma alteração a nível pós transcricional desta citocina, visto que apesar de ter um valor de mRNA elevado em comparação aos tratamentos a sua concentração citosólica é significativamente inferior. Portanto, o extrato de folha de manga e a mangiferina interferem nesta citocina anti-inflamatória elevando a sua concentração hepática.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo, avaliando os efeitos hepáticos da ingestão de dieta hiperlipídica por um período de oito dias, demonstrou que o extrato da folha de manga e a mangiferina administrados por gavagem, não alteraram a concentração de MDA, podendo isto ter ocorrido pelo fato do período experimental ter sido curto para provocar uma peroxidação lipídica no fígado dos animais. No entanto, ambos os tratamentos aumentaram a atividade da SOD demonstrando o potencial destes em reforçar a defesa antioxidante hepática de animais expostos a dieta hiperlipídica.

Os animais que receberam o extrato apresentaram um peso relativo do fígado (IHS) menor que os demais grupos, o que pode estar relacionado a uma menor deposição de gordura no fígado indicando um efeito benéfico do extrato neste órgão.

Em estudo anterior avaliando duas concentrações de polpa de manga da variedade Ubá na dieta, foi demonstrado que a ingestão na quantidade de 10% aumentou o teor de MDA e apresentou uma tendência em aumentar o peso relativo do fígado, enquanto que a ingestão de 3% de polpa de manga apresentou menor IHS que o grupo anterior (TOLEDO et al., 2013), demonstrando que a ação de compostos bioativos sobre o fígado são dose dependente. Isso também pode ser verificado no presente estudo, onde o extrato de folha de manga diminuiu o IHS e assim como a mangiferina apresentou uma tendência em diminuir a peroxidação lipídica.

Pardo-Andreu e colaboradores (2008) avaliando os efeitos do extrato aquoso de casca do caule de mangueira (Vimang®) nas concentrações de 50, 100, 250 mg/kg de peso corporal de ratos e de 40 mg/kg de mangiferina, por sete dias antes e sete dias após a indução de estresse, verificaram que o extrato e a mangiferina reduziram a peroxidação lipídica hepática, as transaminases séricas (aspartato amino-transferase e alanina amino-transferase) e aumentaram a atividade da superóxido dismutase e glutathione peroxidase, sendo a mangiferina e a concentração de 250 mg/kg de extrato os que apresentaram melhores resultados contra o estresse oxidativo.

Trabalhos com ratos Wistar machos relatam que a administração de mangiferina impede o desequilíbrio redox e leva a uma diminuição de mediadores inflamatórios (MÁRQUEZ et al., 2012; DAS et al., 2012).

No presente estudo verificou-se que os animais tratados com o extrato da folha de manga, por 8 dias, apresentaram aumento da expressão de mRNA do receptor PPAR- α e uma tendência em elevar o mRNA de CB₁ e da HSP72. Já a mangiferina elevou

expressivamente a transcrição de ambos os receptores e da HSP72. Estes dados indicam que tanto o extrato quanto a mangiferina favoreceram a ação anti-inflamatória no fígado dos animais, visto que estes receptores e a chaperona HSP72 tem importante papel na via de sinalização anti-inflamatória. Os tratamentos não interferiram na expressão de mRNA de TNF- α e de NF κ B e levaram a uma redução de mRNA de IL10. No entanto, apesar do tratamento não ter diminuído a concentração de TNF- α verificou-se uma menor atividade de NF κ B (p65) e maior concentração da IL10 demonstrando o efeito anti-inflamatório tanto do extrato da folha de manga quanto da mangiferina no fígado dos animais.

Em estudo anterior desta equipe, avaliando o efeito destes mesmos tratamentos sobre o tecido adiposo, verificou-se que o extrato reduziu a expressão de mRNA de CB₁ e aumentou o mRNA de PPAR γ , enquanto a mangiferina elevou a expressão de mRNA de CB₁ e diminuiu o mRNA de PPAR γ (BRITO, 2013). Já no presente estudo a mangiferina aumentou a expressão tanto de PPAR- α quanto dos receptores canabinóides CB₁. Enquanto o extrato apesar de ter aumentado o mRNA de PPAR- α não alterou a expressão de CB₁. Estes resultados demonstram que a ação da mangiferina pode ser diferente de acordo com o tecido, visto que ela elevou o mRNA de PPAR α no fígado, enquanto reduziu a sua expressão no tecido adiposo.

Estudo com ratos alimentados com dieta rica em gordura e suplementados com polpa de manga a 1% na dieta mostrou que os efeitos induzidos por esta foram semelhantes ao demonstrado pelo agonista de PPAR com modulação de genes relacionados com o metabolismo lipídico e glicídico no fígado e no tecido adiposo, além de ter provocado a redução da deposição de gordura (LUCAS et al., 2011). Wilkinson et al (2008) relataram que os compostos da manga, como a mangiferina, podem alterar a transcrição dos PPARs contribuindo com benefícios positivos para a saúde por meio da sinalização desencadeada por estes receptores.

Na literatura são encontrados estudos que identificam um papel essencial da HSP70 em bloquear a inflamação e impedir a resistência à insulina na obesidade. Recentemente foi descoberto que a chaperona HSP70 é necessária para a degradação da p65 inibindo assim a via de sinalização do NF κ B (TANAKA et al., 2014). Chung e colaboradores (2008) demonstraram que a indução de super expressão de HSP70 impediu a ativação de JNK e o desenvolvimento de resistência à insulina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, apresentando estes animais um quarto de gordura corporal da linhagem selvagem. As chaperonas, HSPs, reduziram a inflamação e restauraram a homeostase da glicose em um modelo de rato de diabetes melittus tipo 2 (ÖZCAN et al., 2006). Portanto,

a indução de proteínas de choque térmico, HSP70, pode diminuir a inflamação e a resistência à insulina na obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (HOOPER; HOOPER, 2009; SIMAR et al., 2012).

Este dado está de acordo com o presente estudo, no qual a mangiferina elevou a expressão de mRNA HSP72 e o extrato demonstrou uma tendência a isto, levando a uma menor atividade de NFκB (p65) demonstrando o potencial efeito anti-inflamatório do extrato da folha de manga e da mangiferina nas condições experimentais.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo tanto o extrato da folha de manga quanto a mangiferina demonstraram exercer efeitos benéficos sobre o fígado de animais alimentados com dieta hiperlipídica, uma vez que apresentaram atividade anti-inflamatória e antioxidante. Além disso, a mangiferina demonstrou exercer um efeito maior, visto que aumentou a expressão da HSP72. Portanto, este trabalho demonstra um potencial papel do extrato da folha de manga e principalmente da mangiferina na prevenção do processo inflamatório e do estresse oxidativo desencadeado pela dieta hiperlipídica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALEMANY, M. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. **Nutrition Research**. 33:1-11, 2013.

ALVES, N.E.G.; VALDÉS, S.T.; SILVEIRA, C.M.M.; MARTINO, H.S.D.; MILAGRO, F.I.; MORENO-ALIAGA, M.J.; RIBEIRO, S.M.R. Studies on Mechanistic Role of Natural Bioactive Compounds in the Management of Obesity An Overview. **The Open Nutraceuticals Journal**. 5:193-206, 2012.

ASEA, A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; BOCH, J.A.; BARE, O.; AURON, P.E.; STEVENSON, M.A.; CALDERWOOD, S.K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **The Journal of Biological Chemistry**. 277(17):15028–15034, 2002.

BASU, S.; BINDER, R.J.; RAMALINGAM, T.; SRIVASTAVA, P.K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. **Immunity**. 4(3):303–313, 2001.

BERMUDEZ-SILVA, F. J.; VIVEROS, M. P.; MCPARTLAND, J. M.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. 95:375–382, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72:248-254, 1976.

BRITO, L.F. **Efeito do extrato das folhas de manga Ubá (Mangífera indica L.) e da mangiferina na modulação da expressão dos receptores CB1, PPAR γ e adipocinas em ratos alimentados com dieta de cafeteria**. Viçosa: UFV, 2013. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

BRITO, L.F.; TOLEDO, R.C.L.; CARVALHO, I.M.M.; LEITE, J.P.V.; RIBEIRO, S.M.R.; PELUZIO, M.C.G. ; QUEIROZ, J.H. Produtos naturais ativadores de PPAR e marcadores associados ao processo inflamatório na Síndrome Metabólica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 15(3):449-466, 2013.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 52: 302-310, 1978.

BULLO, M.; CASAS AGUSTENCH, P.; CORREING, P.A.; ARANCETA, J.; SALAS-SALVADOR, J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. **Public Health Nutrition**: 10(10A), 1164–1172, 2006.

CHUNG, J.; NGUYEN, A. K.; HENSTRIDGE, D. C.; HOLMES, A. G.; CHAN, M. H.; MESA, J. L.; LANCASTER, G. I.; SOUTHGATE, R. J.; BRUCE, C. R.; DUFFY, S. J.; HORVATH, I.; MESTRIL, R.; WATT, M. J.; HOOPE, P. L.; KINGWELL, B. A.; VIGH, L.; HEVENER, A.; FEBBRAIO, M. A. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 105:1739–1744, 2008.

CHUANG, S.; MCINTOSH, M. K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. **The Annual Reviews of Nutrition**. 31: 155-176, 2011.

CROWE, M.S., NASS, S. R.; GABELLA, K. M.; KINSEY, S. G. The endocannabinoid system modulates stress, emotionality, and inflammation. **Brain Behavior and Immunity**, 2014.

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**. 260:35–47, 2012.

EGGER, G.; DIXON, J. Obesity and chronic disease: always offender or often just accomplice? **British Journal of Nutrition**. 102:1238–1242, 2009.

FERAT-OSORIO, E.; SÁNCHEZ-ANAYA, A.; GUTIÉRREZ-MENDOZA, M.; BOSCO-GÁRATE, I.; WONG-BAEZA, I.; PASTELIN-PALACIOS, R.; PEDRAZA-ALVA, G.; BONIFAZ, L. C.; CORTÉS-REYNOSA, P.; PÉREZ-SALAZA, E.; ARRIAGA-PIZANO, L.; LÓPEZ-MACÍAS, C.; ROSENSTEIN, Y.; ISIBASI, A. Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-dependent mechanism. **Journal of Inflammation**. 11(19), 2014.

FORSYTHE, L. K.; WALLACE, J. M.; LIVINGSTONE, M. B. Obesity and inflammation: the effects of weight loss. **Nutrition Research Reviews**. 21 (2): 117-133, 2008.

FRANCISCHETTI, E. M.; ABREU, V. G. O sistema endocanabinóide: Novas perspectivas no controle de fatores de risco cardiometabólico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 87:548-558, 2006.

GARRIDO-SUÁREZ, B.B.; GARRIDO, G.; DELGADO, R.; BOSCH, F.; RABÍ, M.D.C. A *Mangifera indica* L. extract could be used to treat neuropathic pain and implication of mangiferin. **Molecules**. 15:9035-9045, 2010.

HEREDIA, F. P.; GOMEZ-MARTINEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**. 71 (2): 332-338, 2012.

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

HOOPER, P. L.; HOOPER, P. L. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. **Cell Stress and Chaperones**. 14:113–115, 2009.

KOHN, H.I., LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and manadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 82: 292-300, 1944.

LUCAS, E. A.; LI, W.; PETERSON, S. K., BROWN, A.; KUVIBIDILA, S.; PERKINS-VEAZIE, P.; CLARKE, S. L.; SMITH, B. J. Mango modulates body fat and plasma glucose and lipids in mice fed a high-fat diet. **British Journal of Nutrition**. 106:1495–1505, 2011.

MÁRQUEZ, L.; GARCÍA-BUENO, B.; MADRIGAL, J.L.M.; LEZA, J. C. Mangiferin decreases inflammation and oxidative damage in rat brain after stress. **European Journal Nutrition**. 51:729–739, 2012.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research** (CRC Press Boca Raton FL), p.243-247, 1985.

MICHALIK, L.; AUWERX, J.; BERGER, J.P.; CHATTERJEE, V.K.; GLASS, C.K.; GONZALES, F.J.; GRIMALDI, P.A.; KADOWAKI, T.; LAZAR, M.A.; O'RAHILLY, 40 S.; PALMER, C.N.A. et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-activated receptors. **Pharmacological Reviews**. 58:726-741, 2006.

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**. 176:165–173, 2002.

ÖZCAN, U.; YILMAZ, E.; ÖZCAN, .L; FURUHASHI, M.; VAILLANCOURT, E.; SMITH, R. O.; GÖRGÜN, C. Z.; HOTAMIŞLIGIL, G. S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**. 313:1137–1140, 2006.

PACKER, L.; SIES, H. Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome. CRC Press; 1^a ed344p, 2007.

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**. 57:79–86, 2008.

PYLES, L.A; STEJSKAL, E.J.; EINZIG, S. Spectrophotometric measurement of plasma 2-thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 202(19), 1993.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**. 37(12):1595-1607, 1988.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. 21(3):133-149, 2005.

RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**. 110:620-626, 2008.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, H, SIMENTAL-MENDÍA, LE, RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, G, REYES-ROMERO, M. A. Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation. **International Journal of Endocrinology**. 2013:1-11, 2013.

SIMAR, D.; JACQUES, A.; CAILLAUD, C. Heat shock proteins induction reduces stress kinases activation, potentially improving insulin signalling in monocytes from obese subjects. **Cell Stress and Chaperones**. 17:615–621, 2012.

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

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Shock**. 24(6):583-589, 2005.

TANAKA, T.; SHIBAZAKI, A.; ONO, R.; KAISHO, T. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor κ B to inhibit inflammatory signaling. **Science Signaling**. 7(119), 2014.

TOLEDO, R. C. L.; BRITO, L. F.; RIBEIRO, S. M. R.; PELUZIO, M. C. G.; SIQUEIRA, C. L. M.; QUEIROZ, J. H.. Efeito da ingestão da polpa de manga (*Mangifera indica* L.) sobre os parâmetros bioquímicos séricos e integridade hepática em ratos. **Bioscience Journal**. 29(2):516-525, 2013.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. de F. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres, **Rev. Eletr. de Farm**, UNESP, 4 (2):119-130, 2007.

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

**CAPÍTULO 2: AÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE MANGA E
MANGIFERINA NA MODULAÇÃO DE GENES ANTI-
INFLAMATÓRIOS HEPÁTICOS VIA SINALIZAÇÃO DOS
RECEPTORES CB₁ E PPAR- α**

Ação do extrato de folhas de manga e mangiferina na modulação de genes anti-inflamatórios hepáticos via sinalização dos receptores CB₁ e PPAR- α

Action of the mango leaf extract and mangiferin in the modulation of anti-inflammatory genes in liver signaling pathway PPAR- α and CB₁ receptors

RESUMO

A Mangiferina indica e a mangiferina apresentam diversas propriedades farmacológicas podendo apresentar efeitos benéficos na obesidade, diabetes, inflamação, etc. Estas alterações metabólicas podem ser controladas por mecanismos como o sistema endocanabinóide e receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs). O estudo teve como objetivo avaliar a ação do extrato de folhas de manga (variedade Ubá) e da mangiferina em reverter possíveis alterações oxidantes e inflamatórias no tecido hepático causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica verificando se a ação da mangiferina possa estar relacionada aos receptores CB₁ e PPAR α . Ratos wistar foram divididos em 7 grupos experimentais (DC: dieta de cafeteria; DCOM: ração comercial; DC + EFM (250 mg/kg de extrato); DC + MANG (40 mg/kg de mangiferina); MANG + GW (3 mg/kg de GW9662); MANG + RNT (10 mg/kg de Rimonabanto) e MANG + GW + RNT). Os animais receberam a dieta de cafeteria por 7 dias, seguido de 5 dias de tratamento juntamente com a DC. O extrato diminuiu a concentração de malondialdeído (MDA), de TNF- α , e a expressão gênica de NF κ B, TNF- α , CB₁, aumentou a atividade da superóxido dismutase (SOD), o mRNA de HSP72 e de PPAR- α , e não alterou a concentração de IL-10, apesar de ter diminuído o mRNA desta citocina. A mangiferina apresentou o mesmo efeito do extrato, no entanto, não alterou o MDA e reduziu a atividade de NF κ B (p65). A administração do GW9662 (antagonista de PPAR) diminuiu a atividade da SOD e a expressão gênica de PPAR- α e de IL-10, aumentou a atividade de NF κ B (p65), a concentração e expressão de TNF- α e não alterou os níveis de MDA e a expressão de mRNA de HSP72 e CB₁. O rimonabanto (antagonista de CB₁) aumentou a atividade de NF κ B (p65), diminuiu a expressão gênica de IL-10 e dos receptores PPAR- α , e não alterou a transcrição dos genes NF κ B, HSP72, CB₁ e TNF- α e a concentração deste último. Já a administração de ambos antagonistas aumentou a expressão do mRNA de NF κ B (p65), TNF- α , HSP72, PPAR- α e a atividade de NF κ B (p65), reduziu a concentração de IL-10, e não interferiu na expressão dos receptores CB₁. A administração do extrato de folhas de

manga e da mangiferina mostraram atividade antioxidante com diminuição da peroxidação lipídica e aumento da atividade da SOD e atividade anti-inflamatória com diminuição da expressão do fator de transcrição NFκB e da citocina TNF-α. Verificou-se que a ação da mangiferina em diminuir os marcadores inflamatórios parece envolver a via de sinalização do receptor PPAR, uma vez que o uso de antagonista deste bloqueou o efeito da mangiferina levando a um aumento da concentração e transcrição de TNF-α e da atividade do NFκB (p65) e diminuição de mRNA de IL-10.

Palavra chave: Mangifera indica, mangiferina, inflamação, antioxidante, receptores CB₁ e PPAR

ABSTRACT

Mangifera indica and mangiferin have various pharmacological properties and may have beneficial effects in obesity, diabetes, inflammation, etc. The body has mechanisms as the endocannabinoid system and peroxisome proliferator activated receptor (PPARs) that can control the metabolic changes. The study aimed to evaluate the action of mango leaf extract (variety Ubá) and mangiferin in reverse oxidants and inflammatory changes in the liver caused by high fat diet verifying that the action of mangiferin can be related to CB₁ and PPARα receptors. Rats wistar were divided into 7 groups (DC: cafeteria diet; DCOM: commercial diet; DC + EFM (250 mg/kg de extract); DC + MANG (40 mg/kg de mangiferin); MANG + GW (3 mg/kg de GW9662); MANG + RNT (10 mg/kg de Rimonabanto) e MANG + GW + RNT). The animals received cafeteria diet for 7 days followed by treatment 5 days. The extract decreased the levels of malondialdehyde (MDA), the TNF-α concentration, and the gene expression of NFκB, TNF-α, CB₁, increased the activity of superoxide dismutase (SOD), the HSP72 mRNA and PPAR-α mRNA, and did not alter the concentration of IL-10, although it decreased the mRNA of cytokines. The mangiferin had the same effect of the extract, however, did not alter the MDA and decreased NFκB (p65) activity. The administration of GW9662 (PPAR antagonist) decreased SOD activity and the gene expression of PPAR-α and IL-10, increased the NFκB (p65) activity and the concentration and expression of TNF-α, and did not alter the MDA levels and the HSP72 mRNA and CB₁ mRNA. The rimonabant (CB₁ antagonist) led to increased NFκB(p65) activity, decreased gene expression of IL-10 and PPAR-α receptors, and did not alter the transcription of NFκB, HSP72, CB₁ and TNF-α

and the concentration of the latter. The administration of both antagonists increased expression of NF κ B mRNA, TNF- α mRNA, HSP72 mRNA and the NF κ B (p65) activity and decreased IL-10 concentration and did not affect the expression of CB₁ receptors. The administration of mangiferin and mango leaf extract showed antioxidant activity, with decreased lipid peroxidation and increased SOD activity, and anti-inflammatory activity with decreased expression of NF κ B and TNF- α . It has been found that the action of mangiferin to reduce inflammatory markers appears to involve signaling pathway PPAR receptor, since the use of these antagonists blocked the effect of mangiferin leading to an increased concentration and expression of TNF- α and NF κ B activity (p65) and decreased IL-10 mRNA.

Key works: *Mangifera indica*, mangiferin, inflammation, antioxidant, CB₁ and PPAR- α receptor.

1. INTRODUÇÃO

A *Mangifera indica* é amplamente utilizada como planta medicinal, principalmente na África, Índia e Cuba. Diferentes partes desta planta são exploradas com diversas finalidades terapêuticas, como no tratamento da dor, artrite, diabetes, infecções cutâneas e parasitárias, entre outras (WATT; BREYER-BRANDWIJK, 1962; COE; ANDERSON, 1996; ROSS, 1999). O extrato aquoso da casca do caule da mangueira contendo elevado teor de polifenóis é comercializado em Cuba como fitoterápico, suplemento alimentar e cosméticos (NÚÑEZ-SELLÉZ et al., 2007), os quais apresentam propriedades antioxidante, analgésica, anti-inflamatória e imunomodulatória (MARTINEZ et al., 2001; GARRIDO et al., 2004; NÚÑEZ-SELLÉZ et al., 2007; PARDO-ANDREU et al., 2008).

Estudos demonstram que o extrato das folhas de *M. indica*, foco do presente estudo, apresenta, in vitro, propriedades antioxidante, anti-apoptótica e antibacteriana e, in vivo, atividades hepatoprotetora e hipoglicemiante (BBOSA et al., 2007; SEVERI et al., 2009, OLABINRI et al., 2009; LING et al., 2009).

Este conjunto de propriedades farmacológicas da *Mangifera indica* é desempenhado principalmente pela ação da mangiferina, seu principal composto bioativo. A mangiferina é uma xantona C-glicosilada (2-C-b-D-glicopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxil-xantona) encontrada principalmente nas famílias Gentianaceae e Anacardiaceae. Ela está

presente em diferentes partes da mangueira, sendo nas folhas jovens e na casca do caule, onde estão em maior quantidade (BARRETO et al., 2008).

A mangiferina e os diferentes tipos de extratos de *M. indica* são propensos a agirem em diversas doenças crônicas como diabetes, obesidade e síndrome metabólica devido as suas propriedades hipoglicemiantes, antioxidante, anti-inflamatória, anti-obesidade, entre outras.

A obesidade é caracterizada por um quadro de inflamação crônica de grau leve, porém não menos agressiva (NEWSHOLME; BITTENCOURT, 2014). O acúmulo de gordura no tecido adiposo desencadeia um estresse metabólico, o qual inicialmente ocorre neste tecido e se estende para outros órgãos, como o fígado (ALVES et al., 2012; ALEMANY, 2013). Uma série de fatores relacionados à obesidade, como ácidos graxos livres, colesterol, acúmulo de gordura e morte de adipócitos ativam o inflamassoma (complexo multiprotéico intracelular), resultando na infiltração de macrófagos no tecido adiposo, os quais liberam citocinas pró-inflamatórias, estabelecendo a inflamação crônica na obesidade (KANNEGANTI; DIXIT, 2012; NEWSHOLME; BITTENCOURT, 2014).

A relação entre a obesidade, a inflamação crônica e a resistência à insulina ocorre como em um “ciclo vicioso”. Adipócitos e macrófagos secretam citocinas inflamatórias, como TNF- α , que ativam a c-jun N-terminal quinase (JNK) e a quinase inibidora de NF κ B (IKK) em órgãos sensíveis à insulina (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo). A JNK e IKK prejudicam a função do receptor de insulina levando a uma deposição de lipídeos em excesso no fígado e nos adipócitos. Estes lipídeos ativam diretamente a JNK e IKK, ampliando assim o defeito na sinalização da insulina, além de ativar a via de sinalização inflamatória do NF κ B, responsável pela indução da expressão de citocinas inflamatórias, perpetuando o ciclo (HOTAMIŞLIGIL, 2006; SHOELSON et al., 2006).

Chung e colaboradores (2008) demonstraram que seres humanos, obesos, resistentes à insulina têm reduzida expressão da proteína HSP 72 e aumento da fosforilação de JNK no músculo esquelético. Em situações de estresse metabólico e inflamação o organismo aumenta a expressão das proteínas HSP70, as quais exercem importantes funções citoprotetoras. Estudos relatam que a baixa expressão da HSP72 leva ao desenvolvimento da inflamação prejudicando a via de sinalização insulínica (HOOPER; HOOPER, 2009). Portanto, a indução da expressão desta proteína é importante para limitar ou interromper o ciclo envolvendo a obesidade, inflamação e resistência insulínica, promovendo redução da glicemia e da gordura corporal (MORAES et al., 2011;

JOHNSON & FLESHNER, 2006; CHUNG et al., 2008; RODRIGUES-KRAUSE et al., 2012).

Estes achados identificam um papel essencial da HSP72 em bloquear a inflamação e impedir a resistência à insulina tanto na obesidade genética quanto na ocasionada pelo alto teor de gordura na dieta. Este tipo de dieta está relacionada com um processo inflamatório caracterizado pelo aumento da expressão de TNF- α e ativação da via NF κ B com inibição da sinalização do IRS-1 levando à resistência a insulina. O TNF- α é reponsável ainda por diminuir a oxidação de ácidos graxos nos hepatócitos aumentando o nível de triacilglicerol e consequentemente intensificando a inibição do IRS-1 (GALIC et al., 2008).

Vários estudos apontam para uma associação entre a obesidade e o estado inflamatório, mostrando que na obesidade ocorre um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 (XU et al., 2003; DANDONA et al., 2004), os quais podem ser reduzidos por uma variedade de fatores como dieta (ESPÓSITO, 2004), exercícios (DEVARAJ et al., 2004), farmacoterapia, e também pelo uso de bloqueadores dos receptores CB₁, como o Rimonabanto (DESPRES et al., 2005; DAVIS, 2006), e de agonistas de PPAR α e PPAR γ (ESPOSITO, 2006).

Os receptores canabinóides CB₁ e CB₂ juntamente com os endocanabinóides e as enzimas responsáveis pela sua biossíntese e degradação, constituem o sistema endocanabinóide (SECB) (MATOS et al., 2006; SVÍZENSKÁ, et al., 2008). Este sistema apresenta grande importância na sinalização endógena atuando na regulação da homeostase energética e do metabolismo (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006). A ativação patológica do SECB está implicada no desenvolvimento de obesidade abdominal, pois estimula a lipogênese nos tecidos periféricos e altera o metabolismo de glicose, com redução da sensibilidade à insulina. (DAMIANI; DAMIANI, 2011). Esses efeitos podem ser reduzidos pelo uso de bloqueadores dos receptores CB₁. No entanto, a utilização clínica destes é problemática devido aos graves efeitos neuropsiquiátricos, como depressão e tendência ao suicídio (BERMUDEZ-SILVA et al., 2010). Além da ação do SECB no metabolismo, os canabinóides apresentam efeito anti-inflamatório por promover apoptose em células imunes (RIEDER et al., 2010)

Outro importante sistema relacionado à homeostase energética e ao metabolismo lipídico e glicídico é composto pelos Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPARs). Estes receptores respondem a uma variedade de sinais biológicos, como ácidos graxos, eicosanóides (JANKE et al., 2006), estatinas (JASINSKA et al.,

2007), antagonistas do ácido retinóico (SCHUPP et al., 2007), flavonóides (SALAM et al., 2008) e compostos de frutas cítricas (KUROYANAGI et al., 2008). A isoforma PPAR α , é ativada por ácidos graxos, sendo expressas em diversos locais onde o catabolismo destes ácidos é alto (fígado, coração, rins e músculo esquelético) (BERGER, 2002). Os PPARs interferem na expressão gênica de modo a promover a oxidação de ácidos graxos, diferenciação de adipócitos, sensibilidade à insulina e atividade anti-inflamatória (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004; PEREIRA et al., 2006).

A atividade anti-inflamatória desencadeada pelos PPARs pode estar diretamente ou indiretamente ligada aos canabinóides existindo uma pequena similaridade estrutural entre estes e os ligantes de PPAR (O'SULLIVAN; KENDALL, 2009). Portanto, a ativação de PPAR pode ocorrer tanto por seus ligantes naturais (YANO et al., 2007), quanto pela estimulação dos receptores canabinóides (UPHAM et al., 2003; DEMUTH; MOLLEMAN, 2006). Dadas às ações anti-inflamatórias dos agonistas de PPARs, bem como dos antagonistas dos receptores CB₁, estes podem ser alvos potenciais no combate a obesidade (IZZO et al., 2009) e ao processo inflamatório.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do extrato de folhas de *Mangifera indica* (variedade Ubá) e da mangiferina em reverter possíveis alterações oxidantes e inflamatórias causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica. Além de verificar se a ação da mangiferina possa estar relacionada aos receptores CB₁ e PPAR α .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do extrato e da Mangiferina

O extrato etanólico 95% de folhas de *Mangifera indica* (variedade Ubá) foi obtido por meio da maceração estática do pulverizado das folhas com etanol 95% por 24 horas, seguida de extração exaustiva por percolação, e concentração em evaporador rotativo a 60°C. O extrato foi liofilizado obtendo-se um rendimento final de aproximadamente 27% a partir da droga vegetal seca. A matéria-prima foi coletada no município de Viçosa, Minas Gerais, e a exsicata, depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC nº 37.611).

A mangiferina foi isolada a partir do pulverizado das folhas de *Mangifera indica*, sendo este inicialmente desengordurado por 12 horas, em soxhlet, utilizando como

solvente o éter de petróleo, passando em seguida pelos mesmos passos da obtenção do extrato. Este foi então liofilizado, sendo submetido a cinco recristalizações com acetato de etila seguidas de outras duas com etanol 95%. Foram feitas filtrações a vácuo nos intervalos de cada recristalização para troca do solvente. O procedimento de purificação foi acompanhado por cromatografia de camada delgada utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (15:2:2:1) e como solvente o metanol. A pureza do composto foi avaliada por HPLC utilizando como padrão mangiferina comercial da marca Sigma Aldrich (adaptado de MURUNGANANDAN et al., 2002).

2.2. Ensaio Biológico

2.2.1. Dieta Hiperlipídica

A dieta de cafeteria (tabela 1) foi preparada manualmente e oferecida ad libitum aos animais durante todo o experimento. A distribuição calórica da dieta foi de 9,8% de proteínas, 31,4 % de carboidratos e 58,8 % de lipídios.

Tabela 1. Composição da dieta de cafeteria (g / Kg de dieta).

| Ingredientes | Quantidade (g) |
|------------------------------------|-----------------------|
| Patê de presunto | 223 |
| Batata frita palha | 111 |
| Bacon | 111 |
| Mortadela | 111 |
| Biscoito doce maisena | 111 |
| Achocolatado em pó sabor chocolate | 111 |
| Leite integral em pó | 111 |
| Ração comercial | 111 |

Proporção de 2:1 do patê de presunto para os outros ingredientes na dieta.

2.2.2. Desenho Experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 28/2012).

No estudo foram utilizados 56 ratos Wistar, machos, com 25 dias de idade, que após oito dias de adaptação com dieta comercial receberam por sete dias a dieta de cafeteria para induzir alterações no tecido hepático.

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais.

| Grupos | Tratamentos |
|-----------------|--|
| DC | Dieta de Cafeteria + DMSO |
| DCOM | Ração Comercial |
| DC + EFM | DC + 250 mg/kg Extrato |
| DC + MANG | DC + 40 mg/kg Mangiferina |
| MANG + GW | DC + 40 mg/kg Mang. + GW9662 |
| MANG + RNT | DC + 40 mg/kg Mang. + Rimonabanto |
| MANG + GW + RNT | DC + 40 mg/kg Mang. + GW9662 + Rimonabanto |

GW9662: antagonista do receptor PPAR (3 mg/kg). Rimonabanto: antagonista irreversível do receptor CB₁ (10 mg/kg)

Após este período os grupos receberam, por cinco dias, juntamente com a dieta de cafeteria, seus respectivos tratamentos (tabela 2). Todos os tratamentos foram oferecidos por gavagem usando como veículo dimetil sulfoxido (DMSO).

Após o período experimental os animais foram eutanaziados, sendo o fígado coletado, pesado e armazenado a -80°C para as análises de estresse oxidativo (peroxidação lipídica e atividade da superóxido dismutase), de marcadores pró e anti-inflamatórios (TNF- α , NF κ B, IL-10), da HSP72 e dos receptores CB₁ e PPAR α .

2.3. Análises

2.3.1. Peso Relativo do Fígado:

Determinado pela relação entre o peso do fígado e o peso corporal. Este parâmetro é também denominado de índice hepatossomático (IHS), sendo definido pela fórmula:

$$\text{IHS} = (\text{peso do fígado} / \text{peso corporal}) \times 100$$

2.3.2. Parâmetros avaliados no homogeneizado de fígado

Para as determinações da concentração de malondialdeído e da atividade da superóxido dismutase (SOD) as amostras de fígado foram homogeneizadas sob refrigeração em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,4 na proporção de 5 mL de tampão por 500 mg de tecido, seguida de centrifugação a 10.000 xg por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C. A determinação de proteína foi pelo método descrito por Bradford (1976).

- Atividade de SOD

A determinação da atividade da SOD foi baseada na inibição da reação de auto-oxidação do pirogalol, em meio básico. A quantificação da SOD é dada em unidades relativas, uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima em termos de substrato consumido por unidade de tempo. A reação foi composta de 20 µL de homogeneizado de fígado, 8 µL de pirogalol a 24 mmol/L e 4 µL de catalase a 30 µmol/L, completando para 200 µL de tampão Tris 0,01 M (pH 7,4), sendo a reação incubada por 5 minutos a 37°C e a leitura realizada em espectrofotômetro a 420 nm. Através da curva padrão, com cinco concentrações distintas de SOD (1U - 5U), foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol (MARKLUND, 1995).

- **Determinação da Lipoperoxidação:** Esta foi analisada pela quantificação de malondialdeído (MDA) pelo teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). O meio de reação contendo 400 µl de homogeneizado de fígado, 1 ml de ácido tricloroacético 20% e 400 µl de ácido tiobarbitúrico 1,6% foi incubado a 95°C / 1hora, sendo adicionados 1,6 ml de n-butanol, e centrifugado a 3000 r.p.m / 10 min. A leitura foi realizada em 510, 532, e 560 nm. Para o cálculo dos valores finais utilizou-se a seguinte equação, proposta para minimizar a interferência dos pigmentos heme e da hemoglobina na dosagem de MDA (PYLES et al., 1993):

$$MDA_{532} = 1,22 [(A_{532}) - (0,56) (A_{510}) + (0,44) (A_{560})]$$

A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978), sendo os resultados expressos em nmol de MDA / mg de proteína.

- **Quantificação de NFκB p65, TNF-α e IL-10:** Preparou-se o homogeneizado de fígado utilizando o kit NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction (Pierce Biotechnology / Thermo Fisher Scientific Inc, MA, EUA), com o qual se separou a fração nuclear e a citoplasmática.

A determinação da atividade de p65 foi realizada no extrato nuclear do homogeneizado utilizando o kit *NFκB (p65) Transcription Factor Assay* (Cayman Chemical), seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de NFκB p65 foi avaliada a 450 nm em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific), sendo o resultado dado em unidades arbitrárias de acordo com a absorvância do controle positivo.

As concentrações de IL-10 e TNF-α foram medidas por citometria de fluxo pelo método de imunocitoquímica com anticorpos específicos conjugados a partículas fluorescente (Rat Cytokine capture beads) utilizando kits comerciais (BD Biosciences, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Os resultados (pg / ml) foram analisados utilizando o software BD FCAP Array (BD Biosciences, CA, EUA).

2.3.3. Expressão Gênica de HSP72, CB₁, PPARα, NFκB, TNF-α, IL10

Inicialmente foi extraído o RNA total do tecido hepático pelo método Trizol (Invitrogen, CA, USA), sendo este quantificado em espectrofotômetro a 260 nm, e analisado quanto à pureza pela relação 260nm e 280nm, e quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose. Foram utilizados 2 µg de RNA para a síntese do cDNA com o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por meio da reação reversa da cadeia de polimerase (RT-PCR) utilizando o equipamento AB StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) e o reagente 2X SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystem). Foram analisadas as transcrições de HSP72 (Fw- AGGCAACAAGATCACCATC, Rv-TAGGACTCGAGCGCATTCTT), CB₁ (Fw- ATATTCTCTGGAAGGCTCACAGCC, Rv-GAGCATACTGCAGAATGCAAACACC), NFκB (Fw-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA, Rv-TCGCACTTGTAACGGAAACG), PPAR-α (Fw-CCTGCCTTCCCTGTGAACT, Rv-ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA), TNF-α (Fw- ACGGCATGGATCTCAAAGAC, Rv- AGATAGCAAATCGGCTGACG),

IL10 (Fw- ACTACCATAGCCACAACGCA, Rv- TTTCTGTTTCCTACGGCGCT). Foi utilizado como controle endógeno o gene GAPDH (Fw-GGTTGTCTCCTGTCACTTC, Rv-CTGTTGCTGTAGCCATATTC).

2.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Para análise descritiva dos dados e testes de comparação de grupos independentes utilizou-se o software Sigma Plot 11.0. Para avaliação da distribuição das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv, sendo aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-wallis em comparações de variâncias múltiplas e o teste de Wilcoxon para comparação de dois grupos independentes quando as distribuições não apresentaram normalidade. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi realizada análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey ou Dunnett para variáveis múltiplas e o teste T para dois grupos independentes. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

No experimento onde se avaliou a ação do extrato da folha de *Mangifera indica* L, variedade Ubá, e da mangiferina em reverter às alterações provocadas pela dieta de cafeteria no fígado (tabela 4) verificou-se que esta dieta provocou lipoperoxidação no tecido hepático. Os grupos que receberam os tratamentos diminuíram a concentração de MDA a valores iguais ao do grupo que recebeu a ração comercial. A administração de ambos os antagonistas tenderam elevar o nível de MDA a valores próximos ao apresentado pela dieta de cafeteria.

Com relação à atividade da superóxido dismutase, o grupo que recebeu a mangiferina teve um aumento quase quatro vezes maior que o grupo que recebeu a dieta de cafeteria. A administração do antagonista do receptor PPAR (GW9662) reverteu o efeito da mangiferina reduzindo bruscamente a atividade da SOD levando a valores semelhantes ao dos animais que receberam a dieta de cafeteria. O antagonista do receptor CB1 (rimonabanto) e ambos os antagonistas também diminuíram a atividade desta enzima antioxidante, porém com menos intensidade. O extrato aumentou a atividade da SOD comparada ao grupo controle, no entanto, este valor foi inferior aos dos demais grupos (tabela 3).

Tabela 3. Proteína total, concentração de malondialdeído, atividade da superóxido dismutase do tecido hepático e IHS de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia.

| Grupos | PTN | MDA | SOD | IHS |
|-----------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| DCOM | 6,85 ± 1,26 ^a | 0,64 ± 0,14 ^c | 41,22 ± 7,27 ^d | 6,40 ± 0,40 ^b |
| DC | 6,25 ± 0,56 ^a | 1,68 ± 0,51 ^{ab} | 16,97 ± 0,63 ^f | 7,50 ± 0,27 ^a |
| DC + EFM | 5,90 ± 0,91 ^a | 0,76 ± 0,12 ^c | 26,20 ± 5,33 ^e | 6,03 ± 0,55 ^{bc} |
| DC + MANG | 5,36 ± 0,44 ^a | 1,00 ± 0,14 ^{bc} | 66,91 ± 3,96 ^a | 6,52 ± 0,40 ^{bc} |
| MANG + GW | 5,95 ± 0,57 ^a | 1,08 ± 0,09 ^{bc} | 18,45 ± 1,41 ^f | 5,89 ± 0,21 ^{bc} |
| MANG + RNT | 5,52 ± 0,41 ^a | 1,01 ± 0,19 ^{bc} | 61,375 ± 2,91 ^b | 5,46 ± 0,12 ^c |
| MANG + GW + RNT | 5,98 ± 0,87 ^a | 1,32 ± 0,28 ^{ab} | 59,09 ± 3,09 ^c | 5,43 ± 0,41 ^c |

Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para os grupos que receberam a mangiferina fez-se o teste de Dunnett ($p < 0,001$). PTN (mg/mL): Proteína total; MDA (nMol/mg PTN): Malondialdeído; SOD (U/mg PTN): atividade da superóxido dismutase; IHS: Índice hepatossomático (peso relativo do fígado = peso do fígado/peso corporal). DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de CB1: 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

Os animais que receberam a mangiferina junto com o rimonabanto e ambos os antagonistas apresentaram redução do IHS (tabela 4), o que pode indicar que estes compostos podem alterar o funcionamento do fígado com efeito maléfico ao organismo, visto que este órgão tem papel primordial no metabolismo.

Os tratamentos com extrato de folhas de *M. indica* e mangiferina demonstraram interferir sobre os marcadores inflamatórios analisados neste estudo.

A expressão de mRNA de NFκB foi menor em todos os grupos que receberam os tratamentos, com exceção do grupo em que foram administrados ambos os antagonistas, o qual apresentou expressão aumentada, sendo esta igual a dos animais que receberam a dieta de cafeteria. No entanto, somente o grupo que recebeu a mangiferina teve menor

atividade de NFκB (p65), sendo este efeito revertido ao ser administrado os antagonistas dos receptores PPAR e CB1. O extrato apesar de diminuir a expressão de NFκB não diminuiu a atividade de NFκB (p65) (figura 1).

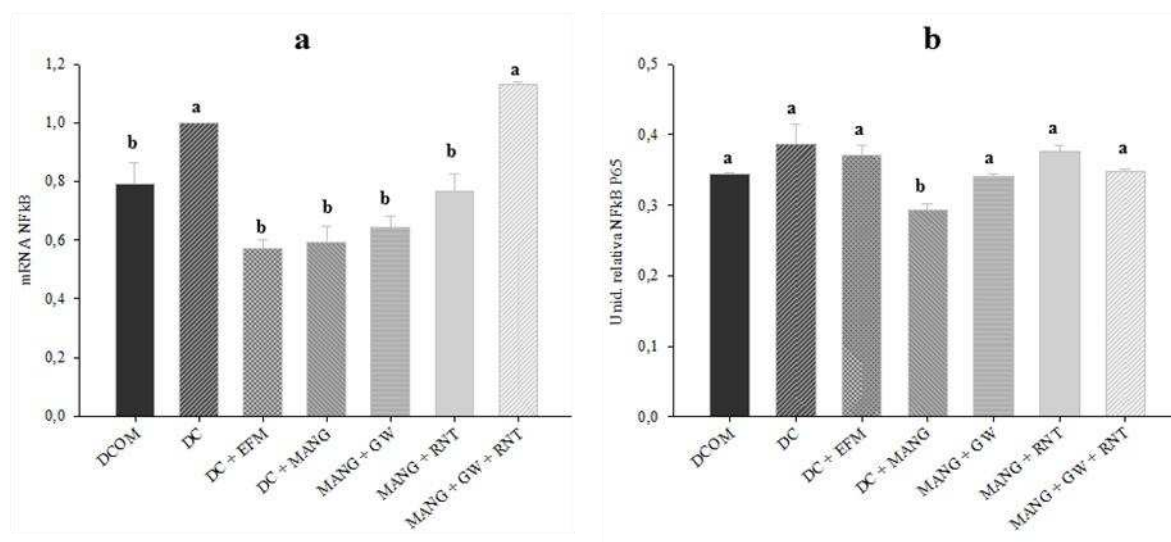


Figura 1. Expressão de mRNA de NFκB e atividade de p65 no tecido hepático de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. (a) Expressão gênica de NFκB (p65) por quantificação relativa (qRT-PCR). (b) Atividade de NFκB (p65) (unidades ordinárias) no extrato nuclear hepático. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de *Mangifera indica* (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de CB₁: 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

Os tratamentos com o extrato de folha de *M. indica* e mangiferina demonstraram diminuir significativamente tanto a expressão de mRNA de TNF- α quanto a sua concentração hepática comparada ao grupo que recebeu a dieta de cafeteria, sendo estes valores iguais aos dos animais que não receberam esta dieta. Verificou-se que a administração do antagonista do receptor PPAR (GW9662) provocou um aumento expressivo da concentração e do mRNA de TNF- α , enquanto o antagonista de CB₁

(rimonabanto) não interferiu nestes parâmetros. No grupo que recebeu ambos os antagonistas a expressão do mRNA de TNF- α foi aumentada a valores acima do grupo da dieta de cafeteria, porém a concentração foi igual à apresentada pelo grupo da mangiferina (figura 2a e 2b).

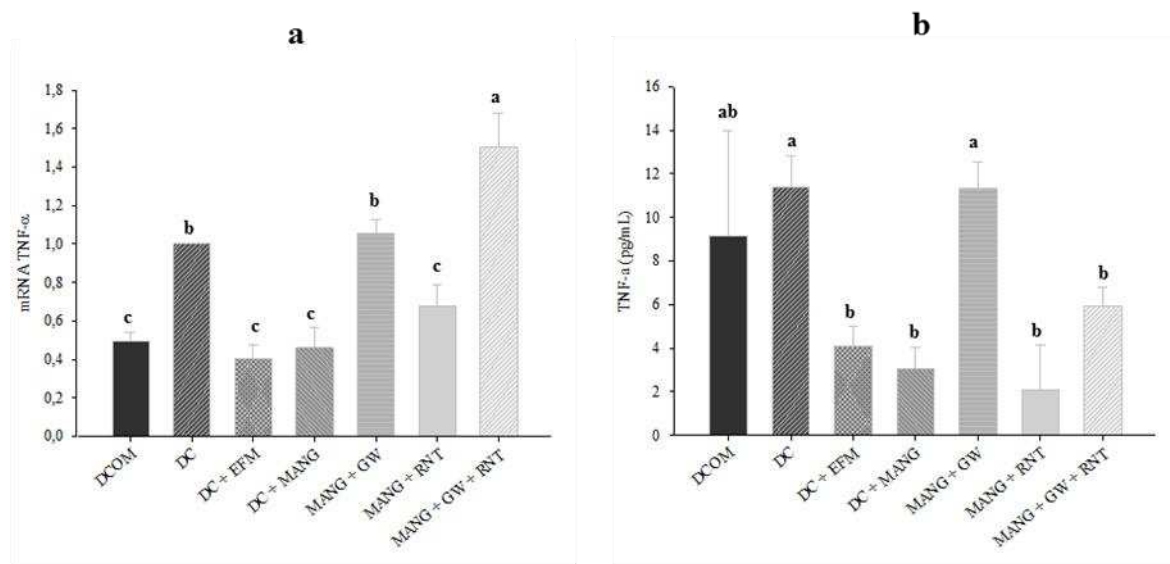


Figura 2. Concentração e expressão de mRNA de TNF- α no tecido hepático de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. (a) Expressão de mRNA de TNF- α por quantificação relativa (qRT-PCR). (b) Concentração de TNF- α no extrato citoplasmático do tecido hepático. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de CB₁: 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

A expressão do mRNA de IL-10 não sofreu alteração com a ingestão da dieta hiperlipídica comparada ao grupo que recebeu a ração comercial. No entanto, todos os grupos tratados apresentaram uma expressão de mRNA de IL-10 expressivamente inferior ao controle mostrando que tanto o extrato quanto a mangiferina exercem efeito negativo na

expressão desta interleucina anti-inflamatória. Quanto à concentração de IL-10 não houve diferença entre os grupos do extrato e da mangiferina com relação ao controle positivo (DC) e ao negativo (DCOM). A administração de ambos os antagonistas aumentou a concentração de IL-10 comparado ao grupo que recebeu somente a mangiferina e aos que receberam estes antagonistas de maneira isolada. No entanto, nenhum dos tratamentos provocou alteração da concentração comparada ao grupo que recebeu a ração comercial, o que pode ser devido ao grande desvio padrão observado nestes grupos (figura 3).

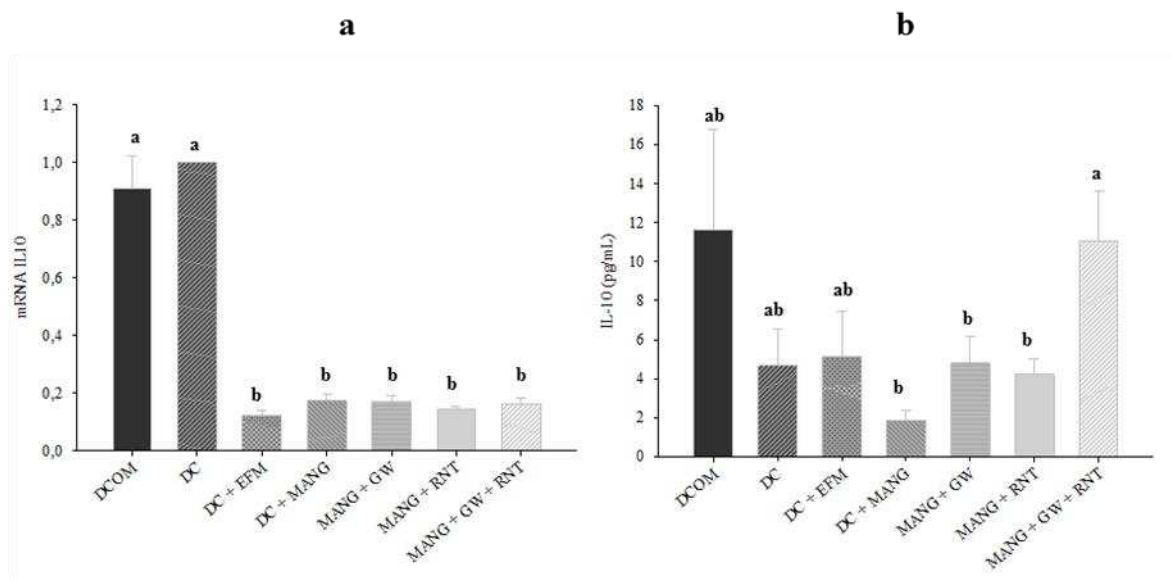


Figura 3. Concentração e expressão de mRNA de IL-10 no tecido hepático de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. (a) Expressão de mRNA de IL-10 por quantificação relativa (qRT-PCR). (b) Concentração de IL-10 no extrato citoplasmático do tecido hepático. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de CB_1 : 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

A dieta de cafeteria induziu um aumento de 100% na expressão gênica do receptor CB_1 , sendo este aumento diminuído pelos tratamentos com o extrato e a mangiferina, com este último sendo igual ao controle negativo (ração comercial). O grupo que recebeu o rimonabanto apresentou uma tendência em diminuir a expressão gênica do receptor CB_1 ($p= 0,064$), enquanto que a administração do antagonista de PPAR e de ambos os antagonistas não alterou a expressão gênica de CB_1 (figura 4a).

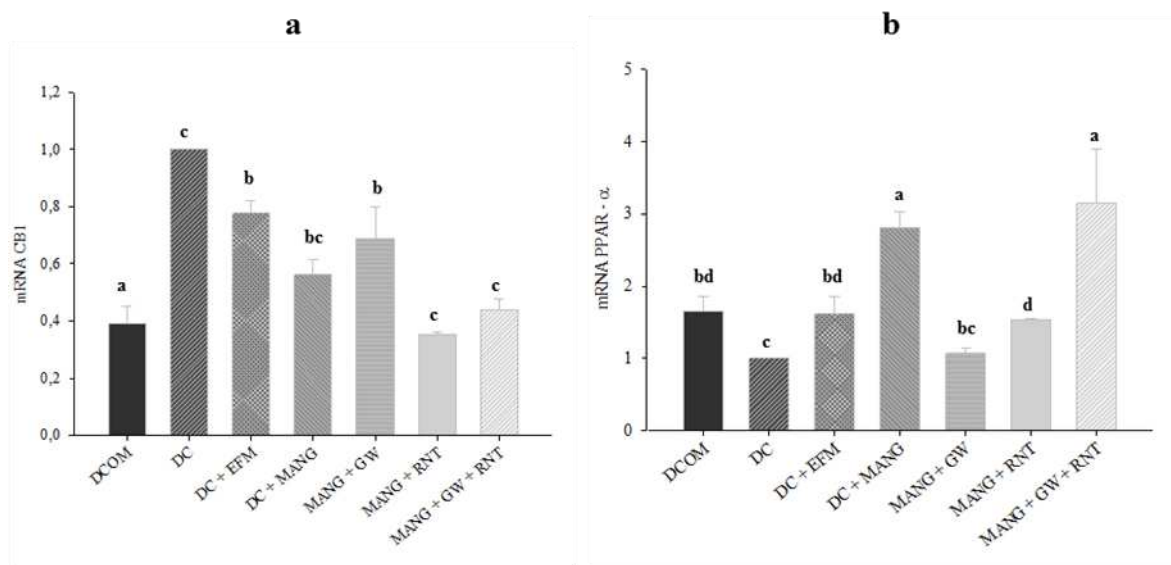


Figura 4. Expressão de mRNA do receptor CB_1 e PPAR no tecido hepático de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. (a) Expressão de mRNA de CB_1 por quantificação relativa (qRT-PCR). (a) Expressão de mRNA de PPAR- α do tecido hepático. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de CB_1 : 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

A expressão gênica do receptor PPAR- α foi maior em todos os grupos que receberam os tratamentos com exceção do grupo em que foi administrado o GW 9662, o qual também foi semelhante aos animais que não receberam a dieta de cafeteria. A mangiferina mostrou aumentar expressivamente o mRNA de PPAR- α , o qual foi reduzido pela administração dos antagonistas de PPAR e CB₁. No entanto, quando ambos antagonistas foram oferecidos conjuntamente não houve alteração na expressão deste receptor (figura 4B).

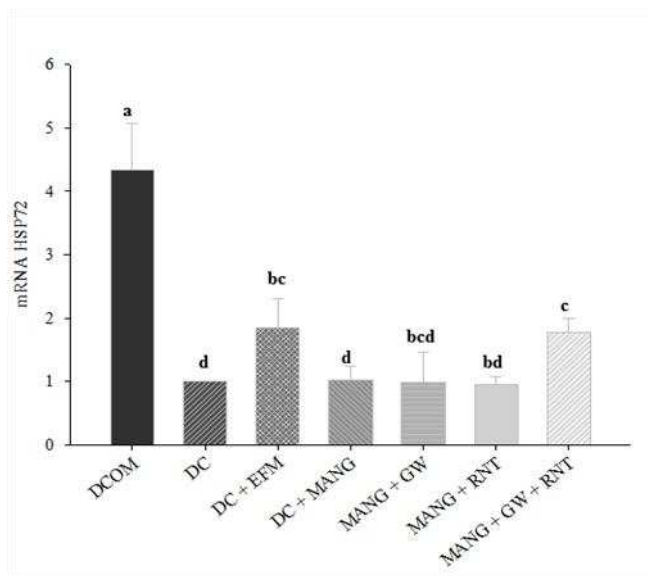


Figura 5. Expressão de mRNA da proteína HSP72 no tecido hepático de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de CB₁: 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

Os animais que receberam a dieta de cafeteria apresentaram redução da expressão de mRNA de HSP72 comparada ao grupo em que foi oferecida a ração comercial. O tratamento com o extrato de folhas de manga levou ao aumento do mRNA desta chaperona, enquanto a mangiferina não exerceu o mesmo efeito (figura 5).

No entanto, a administração da mangiferina juntamente com os dois antagonistas provocou um aumento da expressão do mRNA HSP72, o que não foi observado com a administração destes separadamente (figura 5).

4. DISCUSSÃO

A ingestão de dieta hiperlipídica, mesmo por um curto período de tempo (13 dias), demonstrou exercer efeitos maléficos ao tecido hepático. Isso fica claro ao verificar que os animais que receberam esta dieta apresentaram um IHS (peso relativo do fígado) maior que o grupo que recebeu a ração comercial, podendo este aumento ser devido a deposição de gordura neste órgão. Além disso, a dieta rica em gordura levou a uma lipoperoxidação hepática, visto que a concentração de malondialdeído teve um aumento significativo comparado ao apresentado pelos animais que não receberam esta dieta.

O presente estudo demonstrou ainda que os tratamentos com o extrato de folha de *M.indica* e mangiferina, por apenas 5 dias, foram eficientes em reverter estes danos hepáticos, uma vez que diminuiu o peso relativo do fígado (IHS) e a lipoperoxidação, levando a valores de IHS e de MDA iguais ao apresentado pelos animais que não receberam a dieta de cafeteria. O aumento significativo do IHS nos animais que receberam a dieta hiperlipídica sugere que esta altera o metabolismo hepático podendo ter havido deposição de gordura neste tecido, o qual foi revertido pelo tratamento com extrato de folha de manga e mangiferina. Ambos os tratamentos elevaram a atividade da superóxido dismutase comparado ao controle. Estes dados demonstram o potencial antioxidante do extrato de folha de manga e mangiferina no tecido hepático.

A administração do antagonista do receptor CB₁ (rimonabanto) provocou diminuição do peso relativo do fígado a valores menores que dos animais controle negativo. Este resultado pode ser devido à composição química da ração comercial, que apesar de ser relatado pelo fabricante, ser adequada de acordo com a distribuição de carboidrato, proteína e lipídio, pode ter favorecido a deposição de gordura no fígado, elevando o IHS. Estudo com humanos obesos verificou que a administração de 20 mg/ dia de rimonabanto pelo período de 12 meses, promoveu ação benéfica sobre o fígado, agindo no metabolismo da lipogênese, diminuindo a ocorrência de gordura no fígado, além de reduzir os níveis da enzima alanina aminotransferase (ALT), relacionada com a integridade hepática (DESPRÉS et al., 2009). Dados este que corrobora com o presente estudo, onde a

administração do rimonabanto promoveu uma diminuição do peso relativo do fígado, manteve elevada a atividade da SOD e reduzida a concentração de malondialdeído.

A administração do antagonista de PPAR (GW9662) diminuiu expressivamente a atividade da SOD a valores iguais ao da dieta de cafeteria mostrando que o bloqueio deste receptor interfere na ação da mangiferina em aumentar a defesa antioxidante hepática. Estes dados sugerem que a ação desta xantona em reverter a peroxidação lipídica e aumentar a defesa antioxidante pode estar relacionada com a via de sinalização do PPAR podendo a mangiferina ser um agonista deste receptor. A administração do rimonabanto e de ambos os antagonistas também promoveu uma diminuição na atividade da SOD, porém de forma mais discreta.

Assim como no presente estudo, outros trabalhos com ratos demonstraram que a administração de diferentes tipos de extratos de plantas ricas em compostos bioativos revertem danos causados por estresse oxidativo. Marquez e colaboradores (2012) verificaram que variadas doses de mangiferina (15, 30, e 60 mg /kg) impediram o desequilíbrio redox com redução da peroxidação lipídica e diminuição dos mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α e NF κ B. Em outro estudo verificou-se que a administração desta xantona (15 mg/kg) em ratos induzidos ao estresse reverteu os diversos efeitos hepatotóxicos, como a peroxidação lipídica (DAS et al., 2012).

Além da atividade antioxidante demonstrada pelo extrato de folha de *M. indica* e pela mangiferina verificou-se também que estes exerceram atividade anti-inflamatória. Houve uma redução significativa da expressão do mRNA de TNF- α e NF κ B nos grupos que receberam o tratamento. No entanto, somente o grupo que recebeu a mangiferina apresentou redução da atividade de NF κ B p65. A mangiferina demonstrou exercer um efeito anti-inflamatório via sinalização dos receptores PPARs, visto que na presença do antagonista GW9662 houve um aumento da expressão e da concentração de TNF- α , o que não ocorreu na presença do antagonista do receptor CB₁. Contudo ao se administrar ambos os antagonistas novamente ocorreu o efeito pró-inflamatório demonstrando que a mangiferina pode ser um ligante dos receptores PPAR. Estes resultados corroboraram com estudos anteriores em que se verificou que a mangiferina age como agonista de PPAR γ e PPAR α (WILKINSON et al., 2008; KAUSHIK et al., 2010).

O tratamento com o extrato de folha de manga e com a mangiferina provocaram diminuição da expressão do mRNA da citocina anti-inflamatória, IL-10, porém não houve redução da sua concentração hepática, sendo os valores iguais aos dos animais que receberam a ração comercial.

Estudos relatam uma correlação direta entre a produção das citocinas pró-inflamatórias e a anti-inflamatória IL-10, sendo o TNF- α principal indutor da expressão gênica e da produção de IL-10 (MALEFYT, 1999; MOORE et al., 2001). Isso foi constatado no presente estudo, onde os grupos que apresentaram maior expressão e concentração de TNF- α demonstrando uma tendência em elevar a concentração de IL-10, enquanto que o tratamento com extrato e mangiferina por ocasionarem baixa expressão e concentração de TNF- α levaram a uma baixa expressão e concentração de IL-10.

O presente estudo demonstrou que a ingestão da dieta hiperlipídica provocou um aumento na expressão de mRNA de CB₁ e uma diminuição do mRNA de PPAR- α o que pode justificar o quadro de inflamação presente na obesidade-dieta induzida, visto que em um período curto de tempo, sete dias, em que esta foi ingerida pelos animais foi suficiente para causar uma modulação de marcadores inflamatórios. Ao mesmo tempo, o tratamento em curto período, 5 dias, reverteu estas alterações. O extrato e a mangiferina levaram a uma diminuição da expressão do mRNA de CB₁ e ao aumento do mRNA de PPAR. A administração dos antagonistas interferiu também na expressão destes receptores, principalmente o GW9662, o qual diminuiu a expressão de PPAR- α a valores iguais ao grupo controle positivo e tendeu a aumentar a expressão do mRNA de CB₁, porém ao ser administrado ambos os antagonistas houve uma reversão deste efeito, sendo o mRNA de PPAR- α igual ao dos animais que receberam a mangiferina sozinha. Já na presença do rimonabanto houve efeito contrário, onde a presença deste reduziu a expressão de mRNA de CB₁ e de PPAR- α quando comparada ao grupo que recebeu somente a mangiferina. Portanto, percebe-se haver uma ligação entre a expressão dos receptores CB₁ com a do PPAR- α , visto que o bloqueio de CB₁ reduz a expressão de mRNA de PPAR- α e o bloqueio deste tende a aumentar o mRNA de CB₁.

A dieta hiperlipídica reduziu intensamente a expressão do mRNA de HSP72 comparado aos animais que não receberam esta dieta. A administração do extrato aumentou a expressão do mRNA desta chaperona favorecendo a ação anti-inflamatória nos animais. Já a mangiferina não exerceu o mesmo efeito com a expressão gênica desta chaperona, a qual foi igual ao controle positivo. Pode-se perceber ainda que a administração de ambos os antagonistas juntamente com a mangiferina favoreceu o aumento da expressão do mRNA da HSP72.

A indução de proteínas de choque térmico, HSP70, pode reduzir a inflamação visto que impede a via de sinalização do NF κ B diminuindo assim a expressão das citocinas pró-inflamatórias (ÖZCAN et al., 2006; CHUNG et al., 2008; HOOPER; HOOPER, 2009;

SIMAR et al., 2012). Este dado está de acordo com o estudo, onde o aumento da expressão da HSP72 promoveu uma menor expressão gênica dos marcadores inflamatórios.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a dieta hiperlipídica mesmo sendo ingerida por um curto período de tempo (sete dias) pode causar alterações hepáticas como estresse oxidativo e inflamação. Ao mesmo tempo o tratamento, por apenas cinco dias, com o extrato de folhas de *Mangifera indica* e mangiferina, foram suficientes para melhorar as alterações hepáticas causadas pela dieta hiperlipídica, uma vez que eles favoreceram o equilíbrio redox e o controle da inflamação. Além disso, foi verificado que os efeitos benéficos desencadeados pela mangiferina pode estar relacionada com a via de sinalização do receptor PPAR, uma vez que o uso de antagonista deste receptor impediu a ação da mangiferina, demonstrando que esta xantona age como agonista dos receptores PPARs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N.E.G.; VALDÉS, S.T.; SILVEIRA, C.M.M.; MARTINO, H.S.D.; MILAGRO, F.I.; MORENO-ALIAGA, M.J.; RIBEIRO, S.M.R. Studies on Mechanistic Role of Natural Bioactive Compounds in the Management of Obesity An Overview. **The Open Nutraceuticals Journal**. 5:193-206, 2012.

ALEMANY, M. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. **Nutrition Research**. 33:1-11, 2013.

BARRETO, J. C.; TREVISAN, M.T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; de BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER; 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**. 56:5599-5610, 2008.

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**. 45: 54–58, 2007.

BERGER, J.; MOLLER, D.E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**. 53:409-35, 2002.

BERMUDEZ-SILVA, F. J.; VIVEROS, M. P.; MCPARTLAND, J. M.; RODRIGUEZ DE FONSECA, F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. 95:375–382, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72(1-2):248-254, 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 52: 302-310, 1978.

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

CHUNG, J.; NGUYEN, A. K.; HENSTRIDGE, D. C.; HOLMES, A. G.; CHAN, M. H.; MESA, J. L.; LANCASTER, G. I.; SOUTHGATE, R. J.; BRUCE, C. R.; DUFFY, S. J.; HORVATH, I.; MESTRIL, R.; WATT, M. J.; HOOPE, P. L.; KINGWELL, B. A.; VIGH, L.; HEVENER, A.; FEBBRAIO, M. A. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 105:1739–1744, 2008.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Revista Brasileira de Clinica Medica**. 9(2):138-45, 2011.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**. 25 (4), 2004.

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**. 260:35–47, 2012.

DAVIS, S. N. Contemporary strategies for managing cardiometabolic risk factors. **Journal of Managed Care Pharmacy**. 12, S4, 2006.

DEMUTH, D.G.; MOLLEMAN, A. Cannabinoid signalling. **Life Science**. 78: 549–563, 2006.

DESPRES, J.P.; GOLAY, A.; SJOSTROM, L. Rimonabant in obesity-lipids study group: effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. **New England Journal of Medicine**. 353(2121), 2005.

DESPRÉS, J.P., ROSS, R., BOKA, G., ALMERÁS, N., LEMIEUX, I. Effect of Rimonabant on the High-Triglyceride/Low–HDL-Cholesterol Dyslipidemia, Intra abdominal Adiposity, and Liver Fat. The ADAGIO-Lipids Trial. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 29:416-423, 2009.

DEVARAJ, S.; ROSENSON, R. S.; JIALAL, I. Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. 33 (431), 2004.

ESPOSITO, K. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in metabolic syndrome: a randomized trial. **Journal of the American Medical Association**. 292: 1440, 2004.

ESPOSITO, K. Effect of rosiglitazone on endothelial function and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**. 29: 1071, 2006.

FRANCISCHETTI, E. M.; ABREU, V. G. O sistema endocanabinóide: Novas perspectivas no controle de fatores de risco cardiometabólico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 87: 548-558, 2006.

GALIC, S.; OAKHILL, J.S.; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 316(2):129-139, 2010.

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**. 50:143–149, 2004.

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

HOOPER, P. L.; HOOPER, P. L. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. **Cell Stress and Chaperones**. 14:113–115, 2009.

HOTAMIŞLIGİL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**; 444:860–867, 2006.

JANKE, J.; ENGELI, S.; GORZELNIAK, K.; LUFT, F.C.; SHARMA, A.M. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. **Obesity**. 10: 1-5, 2002.

IZZO, A.A.; BORRELLI, F.; CAPASSO, R.; DI MARZO, V.; MECHOULAM, R. Nonpsychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in Pharmacological Sciences**. 30:515–527, 2009.

JASINSKA, M.; OWCZAREK, J.; ORSZULAK-MICHALAK, D. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. **Pharmacological Reports**. 59:483–499, 2007.

JOHNSON, J.D.E.; FLESHNER, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **Journal of Leukocyte Biology**. 79(3):425-434. 2006.

KANNEGANTI, T. D.; DIXIT, V.D. Immunological complications of obesity, **Nature Immunology**. 13, 2012.

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

KOHN, H.I., LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and manadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 82: 292-300, 1944.

KUROYANAGI, K.; KANG, M.-S.; GOTO, T. Citrus auraptene acts as an agonist for PPARs and enhances adiponectin production and MCP-1 reduction in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 366:219–225, 2008.

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**. 113:1154–1159, 2009.

MALEFYT, R. Interleukin-10. In: Mire-Sluis, A.; Thorpe, R. editors. **Cytokines**. 2nd ed. Blanch Lane: Academic Press; p.151-161, 1999.

MÁRQUEZ, L.; GARCÍA-BUENO, B.; MADRIGAL, J.L.M.; LEZA, J. C. Mangiferin decreases inflammation and oxidative damage in rat brain after stress. **The European Journal of Nutrition**. 51:729–739, 2012.

MARTÍNEZ, G.; GIULIANI, A.; LEÓN, O. S.; PÉREZ, G.; NÚÑEZ-SELLES, A. J. Effect of *Mangifera indica* L. Extract (QF808) on Protein and Hepatic Microsome Peroxidation. **Phytotherapy Research**. 15: 581–585, 2001.

MATOS, A. F. G.; GUEDES, E. P.; SOUZA, L. L.; VALÉRIO, C. M. O sistema endocanabinóide: Novo paradigma no tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 50:390-399, 2006.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research** (CRC Press Boca Raton FL), p.243-247, 1985.

MOORE, K.; MALLEFYT, R.; COFFMAN, R.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **The Annual Review of Immunology**. 19(1):683-765, 2001.

MORAES, JCM. Sistema nervoso central e inflamação: descontrole nos mecanismos de fome e saciedade. In: Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Pauli, J. R. **Obesidade e diabetes – fisiopatologia e sinalização celular**. Ed. Sarvier, 2011.

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**. 176:165–173, 2002.

NEWSHOLME, P.; BITTENCOURT JR, P.I.H. The fat cell senescence hypothesis: a mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease, **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. 17(4), 2014.

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**. 55: 351–358, 2007.

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 *Magnifera indica* and *Azadirachta indica*. **African Journal of Biotechnology**. 8:2968-2972, 2009.

O’SULLIVAN, S. E.; KENDALL, D.A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. **Immunobiology**. 215 (8):611-616, 2010.

ÖZCAN, U.; YILMAZ, E.; ÖZCAN, .L; FURUHASHI, M.; VAILLANCOURT, E.; SMITH, R. O.; GÖRGÜN, C. Z.; HOTAMIŞLIGIL, G. S. Chemical chaperones reduce ER

stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**. 313:1137–1140, 2006.

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**. 57:79–86, 2008.

PEREIRA, M. P.; HURTADO, O.; CÁRDENAS, A.; BOSCA, L.; CASTILLO, J.; DÁVALOS, A.; VIVANCOS, J.; SERENA, J.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I.; MORO, M. A. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta 12,14- prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. 26(2): 218-29, 2006.

PYLES, L.A; STEJSKAL, E.J.; EINZIG, S. Spectrophotometric measurement of plasma 2-thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 202(19), 1993.

RIEDER, S. A.; CHAUHAN, A.; SINGH, U.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. **Immunobiology**. 215(8):598-605, 2010.

RODRIGUES-KRAUSE, J; KRAUSE, M. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? **Cell Stress Chaperones**. 17(3), 2012.

ROSS, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **American Heart Journal**. 138: S419–S420, 1999.

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**. 14:1098–1110, 2009.

SALAM, N.K.; HUANG, T.H.-W.; KOTA, B.P.; KIM, M.S.; LI, Y.; HIBBS, D.E. Novel PPAR-gamma agonists identified from a natural product library: a virtual screening, induced-fit docking and biological assay study. **Chemical Biology & Drug Design**. 71:57–70, 2008.

SIMAR, D.; JACQUES, A.; CAILLAUD, C. Heat shock proteins induction reduces stress kinases activation, potentially improving insulin signalling in monocytes from obese subjects. **Cell Stress and Chaperones**. 17:615–621, 2012.

SCHUPP, M.; CURTIN, J.C.; KIM, R.J.; BILLIN, A.N.; LAZAR, M.A. A widely used retinoic acid receptor antagonist induces peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. **Molecular Pharmacology**. 71:1251–1257, 2007.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**. 116:1793–1801, 2006.

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

UPHAM, B.L.; RUMMEL, A.M.; CARBONE, J.M.; TROSKO, J.E.; OUYANG, Y.; CRAWFORD, R.B. Cannabinoids inhibit gap junctional intercellular communication and activate ERK in a rat liver epithelial cell line. **International Journal Cancer**. 104: 12-18, 2003.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; NICHOLS, A.; ROSS J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal Clinical Investigation**. 112(12): 1821-1830, 2003.

YANO, M.; MATSUMURA, T.; SENOKUCHI, T.; ISHII, N.; MURATA, Y.; TAKETA, K. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent

cyclooxygenase-2 expression in macrophages. **Circulation Research**. 100:1442-1451, 2007.

WATT, J. M.; BREYER-BRANDWIJK, M. G. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 2^a Ed. Livingstone: London. 46–49, 1962.

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

**CAPÍTULO 3: EXTRATO DE *Mangifera indica* E MANGIFERINA MODULAM
GENES INFLAMATÓRIOS NO CÉREBRO DE RATOS ALIMENTADOS COM
DIETA HIPERLIPÍDICA**

Extrato de *Mangifera indica* e mangiferina modulam genes inflamatórios no cérebro de ratos alimentados com dieta hiperlipídica

Mangiferin and *Mangifera indica* extract modulate inflammatory genes in brains of rats fed high-fat diet

RESUMO

A obesidade é uma doença crônica multifatorial caracterizada pela ocorrência de estresse metabólico e de inflamação crônica de grau leve. Esta desordem está diretamente relacionada ao sistema nervoso central (SNC), o principal responsável pela homeostase energética. O cérebro dispõe de mecanismos, como os receptores endocanabinóides CB₁ que agem no controle alimentar. As vias de sinalização do receptor canabinóide CB₁ juntamente com os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) estão envolvidas no controle da inflamação no SNC, onde ligantes destes receptores provocam inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias via sinalização do NF-κB (Fator nuclear Kappa B). Extratos de *Mangifera indica* e a mangiferina, seu principal composto bioativo, apresentam propriedades terapêutica anti-obesidade, antidiabética, antioxidante, anti-inflamatórias, entre outras. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da mangiferina e do extrato das folhas de *Mangifera indica* L. (variedade Ubá) na modulação gênica da inflamação no cérebro de ratos alimentados com dieta hiperlipídica, verificando se a ação da mangiferina possa estar relacionada com a via dos receptores CB₁ e com a do PPAR-α. Ratos wistar foram divididos em 7 grupos experimentais (DC: dieta de cafeteria; DCOM: ração comercial; DC + EFM (250 mg/kg de extrato); DC + MANG (40 mg/kg de mangiferina); MANG + GW (3 mg/kg de GW9662); MANG + RNT (10 mg/kg de Rimonabanto) e MANG + GW + RNT). Os animais receberam a dieta de cafeteria por 7 dias, seguido de 5 dias de tratamento juntamente com a DC. O extrato de folha de manga e a mangiferina reduziram a concentração de malondialdeído (MDA) e aumentaram a atividade da superóxido dismutase (SOD) e a expressão do mRNA de HSP72. A mangiferina teve maior efeito na modulação de genes inflamatórios com diminuição da expressão do NFκB e TNF-α, enquanto o extrato reduziu somente este último. Quanto a expressão dos receptores o extrato aumentou o mRNA de CB₁ e de PPAR-α, já a mangiferina não alterou a expressão destes receptores. O rimonabanto aumentou a transcrição de todos os genes avaliados (PPAR-α, CB₁, NFκB, TNF-α e HSP72), porém

reduziu a atividade de NFκB (p65) e a da SOD, além de diminuir a peroxidação lipídica. O GW9662 aumentou a concentração e a expressão de TNF-α. A administração de ambos os antagonistas levaram ao aumento da expressão de NFκB, TNF-α e HSP72, e a diminuição da atividade de NFκB (p65) e a concentração de malondialdeído. Estes dados sugerem que a mangiferina pode ter sua ação desencadeada por meio da via destes receptores, uma vez que o bloqueio deste reverteu o efeito anti-inflamatório desta xantona. Os tratamentos demonstraram exercer atividade antioxidante e anti-inflamatória no cérebro.

Palavra chave: Mangiferina, manga (variedade Ubá), receptor CB₁ e PPAR, dieta de cafeteria, inflamação, cérebro.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial chronic disease characterized by the occurrence of metabolic stress and mild chronic inflammation. It is disorder is directly related to the central nervous system (CNS), primarily responsible for energy homeostasis. The brain has mechanisms such as endocannabinoids CB₁ receptors while that act on food control. The CB₁ and peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) signaling pathways are involved in the control of inflammation in the CNS where receptors ligands cause inhibition of the production of pro-inflammatory cytokines. Mango leaf extract and mangiferin, main bioactive component of the *Mangifera indica*, has antioxidant, antidiabetic and anti-inflammatory properties, among other pharmacological qualities. This study aimed to investigate the effect of mangiferin and mango leaves extract (*Mangifera indica* L., variety Ubá) in gene modulation of inflammation in the brain of rats fed with hiperlipídica diet, evaluating sure that the action of mangiferin may be related the route of CB₁ and PPAR-α receptors. Rats Wistar were divided into 7 groups (DC: cafeteria diet; DCOM: commercial diet; DC + EFM (250 mg/kg extract); DC + MANG (40 mg/kg mangiferin); MANG + GW (3 mg/kg GW9662); MANG + RNT (10 mg/kg Rimonabant) and MANG + GW + RNT). The animals received cafeteria diet for 7 days followed by treatment 5 days. The mango leaf extract and mangiferin reduced the concentration of malondialdehyde (MDA) and increased the superoxide dismutase (SOD) activity and HSP72 mRNA. The mangiferin had greater effect in modulating inflammatory genes with reduced expression of NFκB and TNF-α, while the extract only reduced the latter. O extract increased CB1 mRNA and PPAR mRNA, while the mangiferin did not alter the expression. The rimonabant increased

transcription of genes (PPAR- α , CB₁, NF κ B, TNF- α and HSP72) and the superoxide dismutase activity and reduced the MDA concentration and the NF κ B (p65) activity. The GW9662 increased the concentration and TNF- α expression. The administration of both antagonists led to increased expression of NF κ B, TNF- α and HSP72, and reduced MDA concentration and NF κ B (p65) activity. These data suggest that their action mangiferin can be triggered by means of these receptors, since blocking reversed the anti-inflammatory effect of xanthone. The treatments have exercised antioxidant and anti-inflammatory activity in the brain.

Key works: Mangiferin, mango (variety Ubá), CB₁ and PPAR receptors, cafeteria diet, inflammation, brain.

1. INTRODUÇÃO

O cérebro é o principal órgão responsável pela homeostase energética, controlando a ingestão e o gasto de energia por meio de um complexo circuito de neurotransmissores e neuromoduladores, os quais quando alterados podem desencadear a indução da obesidade (RIBEIRO, 2009). A dieta rica em gordura influencia o desenvolvimento normal do sistema nervoso central (SNC) podendo comprometer o desempenho cognitivo independente do acúmulo de tecido adiposo (LINDQVIST et al., 2006).

A homeostase energética e lipídica pode ser regulada por sinalização endógena tanto no sistema nervoso central (SNC) como no periférico (SNP), sendo controlada principalmente pelo sistema endocanabinóide (SECB) e também pelos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) (FRANCISCHETTI; ABREU, 2006; TANASESCU; CONSTANTINESCU, 2010). O SECB é constituído pelos receptores canabinóides (CB₁ e CB₂), os endocanabinóides e as enzimas responsáveis pela sua biossíntese e degradação (MATOS et al., 2006; SVÍZENSKÁ et al., 2008). A ativação do receptor CB₁ desencadeia sinalizações que agem sobre o SNC, mais especificamente no núcleo hipotalâmico e no sistema límbico, provocando respectivamente, um efeito orexígeno e maior motivação para a alimentação. Já nos tecidos periféricos (adiposo, fígado, trato gastrointestinal e músculo esquelético), a ativação destes receptores esta relacionada ao aumento da lipogênese (DAMIANI; DAMIANI, 2011).

Estudos relatam que a ativação patológica do sistema endocanabinóide, devido a um polimorfismo no gene da FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase), enzimas que hidrolisam os endocanabinóides, leva ao aumento do efeito orexígeno ocasionando à obesidade (SIPE et al., 2005).

A obesidade é uma doença crônica multifatorial que envolve aspectos genéticos e ambientais. O elevado consumo de dieta rica em gorduras e carboidratos é um dos principais responsáveis pelo aumento da obesidade em todo o mundo. Esta enfermidade é um fator primário para várias desordens metabólicas como, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares, sendo considerada um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Fato este que chama atenção das indústrias farmacêuticas na busca de fármacos que consigam combater estas desordens (BURNEIKO et al., 2006; KRETSCHEMER et al., 2005).

Compostos ligantes do receptor CB1 são alvos para o tratamento da obesidade por suprimirem o apetite, entretanto, até o momento somente o rimonabanto® (antagonista de CB₁) foi comercializado, sendo, porém, contra-indicado por provocar efeitos psíquicos (VAN GAAL et al., 2005). Outros receptores, os PPARs (peroxisome proliferator activated receptor), são alvos de fármacos que visam reverter estas desordens metabólicas, como a rosiglitazona e pioglitazona (tiazolinedionas) que são utilizadas no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Estas drogas aumentam a sensibilidade à insulina principalmente por reduzirem a produção de marcadores pró-inflamatórios como TNF- α e resistina (KOSHIYAMA et al., 2001; SIDHU et al., 2003).

A atividade anti-inflamatória desencadeada pelos PPARs pode estar diretamente ou indiretamente ligada aos canabinóides existindo uma pequena similaridade estrutural entre eles (O'SULLIVAN; KENDALL, 2009). Embora os dados clínicos sejam limitados, evidências sugerem que a ativação do receptor PPAR pode ser uma estratégia eficiente na reversão do processo inflamatório ocorrido no cérebro em decorrência de doenças crônicas como alzheimer e parkinson e mesmo em diabetes mellitus, na qual foi relatado aumento do risco de demência (STAHEL et al., 2008; FUNG et al., 2012). Nestas doenças ocorre a ativação da via de sinalização do NF κ B, no SNC, estimulando a transcrição de genes pró-inflamatórios e pró-apoptóticos.

Stahel e colaboradores (2008) relataram que os agonistas dos receptores PPAR e de canabinóides como o dexamabinol e o Rimonabanto®, provocaram inibição da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, de mediadores pró-apoptóticos e do estresse oxidativo impedindo assim a sinalização do NF κ B e a ocorrência de uma lesão cerebral

secundária. De acordo com a literatura, os canabinóides têm um profundo efeito inibitório na função das células imunes (KLEIN; CABRAL, 2006), no entanto ainda não está esclarecido se as drogas derivadas dos canabinóides são capazes de atenuar o processo inflamatório de doenças crônicas como na obesidade, diabetes mellitus tipo 2, entre outras.

O aumento da adiposidade resultante de uma dieta rica em gorduras promove o recrutamento de macrófagos no tecido adiposo com consequente aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias podendo desencadear em uma inflamação sistêmica (LIONETTI et al., 2009; SCHENK et al., 2008). Os ácidos graxos saturados, presentes em dietas hiperlipídicas, podem se ligar aos receptores TLR4 (toll-like receptor 4) induzindo a ativação da JNK serino-quinase em células do hipotálamo. Essa proteína ativada fosforila o IRS1 levando a resistência à insulina. A exposição prolongada aos ácidos graxos saturados pode levar a uma resposta pro-apoptótica, com perda gradual de neurônios anorexígenos prejudicando assim o sinal de saciedade provocando uma maior ingestão alimentar e consequentemente ganho de peso (VELLOSO, 2009; FUNG et al., 2012).

Na ocorrência de um processo inflamatório ou estresse oxidativo o organismo promove um aumento da produção das proteínas de choque térmico, HSP72, as quais podem exercer papel importante na neuroproteção, uma vez que estas interagem com as proteínas I κ B e JNK impedindo a sua fosforilização levando ao bloqueio da via de sinalização do NF κ B. Portanto, com o aumento da expressão destas proteínas obtém-se um efeito anti-inflamatório com inibição da expressão de IL-1 β e TNF- α , tornando esta chaperona um alvo terapêutico para doenças neurodegenerativas (KIM et al., 2014).

Extratos de plantas e compostos isolados destas são constantemente estudados como alternativas terapêuticas na reversão de desordens metabólicas e neurológicas. A *Mangifera indica* L., uma espécie da família Anacardiaceae, apresenta um alto conteúdo de compostos bioativos, os quais desempenham propriedades antioxidante, anti-obesidade, hepatoprotetora, anti-inflamatória, neuroprotetoras, entre outras (NÚÑEZ-SELLÉZ et al., 2007). Esta planta já vem sendo utilizada na medicina popular no intuito de reverter várias enfermidades. Em Cuba é comercializado um suplemento nutricional a base de extrato aquoso da casca do caule da mangueira (Vimang®), o qual tem suas propriedades farmacológicas atribuídas, em sua maioria, à mangiferina (MASIBO; HE, 2009).

A mangiferina (1,3,6,7-tetrahidroxixantona-C2-beta-D-glicosídeo) é uma glicosil xantona presente em uma grande variedade de vegetais superiores como os pertencentes às famílias Gentianaceae e Anacardiaceae (PARDO-ANDREU et al., 2005). Estudos indicam que a mangiferina apresenta uma grande variedade de propriedades farmacológicas, como

anti-obesidade (SANGEETHA et al., 2010), antidiabética (GIRÓN et al., 2009), anti-inflamatória (PRABHU et al., 2009), antioxidante (PARDO-ANDREU et al., 2008), antitumoral, imunomodulatória (GUHA et al., 1996), hepatoprotetora (DAR et al., 2005) e neuroprotetora (GOTTLIEB et al., 2006; CAMPOS-ESPARZA et al., 2009).

Apesar de alguns resultados promissores na tentativa de desenvolver terapias para suprimir a resposta inflamatória central, até agora tem se obtido pouco sucesso. Diante disto percebe-se a relevância em explorar estratégias terapêuticas que suprimem a resposta inflamatória a fim de prevenir o aparecimento ou a exacerbação de doenças neurodegenerativas. A compreensão minuciosa dos fatores que promovem o quadro clínico da inflamação no início do desenvolvimento da obesidade é fundamental para o progresso das intervenções preventivas e terapêuticas nesta desordem metabólica. Diante disso, e devido às inúmeras propriedades farmacológicas atribuídas ao extrato da folha de manga e principalmente à mangiferina, estes aparecem como potencial terapêutico no controle e tratamento de diferentes desordens metabólicas. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da mangiferina e do extrato das folhas de manga (*Mangifera indica* L., variedade Ubá) na modulação gênica da inflamação no sistema nervoso central (SNC) em animais alimentados com dieta indutora de obesidade verificando ainda se a ação da mangiferina ocorre via sinalização dos receptores CB₁ e PPAR.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Obtenção do Extrato e da Mangiferina

As folhas de *M. indica*, variedade Ubá, foram coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, e a exsicata, depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC nº 37.611). O extrato foi obtido a partir de 1472,2 g de droga seca (folhas secas e trituradas), sendo este pulverizado das folhas, submetido à percolação exaustiva em etanol 95%, concentrado em evaporador rotativo (temperatura máxima de 60°C) e então liofilizado obtendo-se 400 g de extrato seco (27% de rendimento).

A mangiferina foi isolada a partir de 582,55 g do pulverizado das folhas de *M. indica*, que foi desengordurado passando em seguida pelo mesmo método de obtenção do extrato, apresentando um peso seco de 360 g. Este foi então submetido a sucessivas recristalizações com acetato de etila obtendo-se 21 g de mangiferina, com rendimento de 3,60% a partir da droga seca e 5,83% a partir do extrato. O procedimento de purificação foi

monitorado por cromatografia de camada delgada e a pureza do composto avaliada por HPLC comparando-se o cromatograma ao padrão de mangiferina (Sigma Aldrich). A metodologia utilizada nesses processos foi adaptada de Muruganandanet al., 2002.

2.2. Ensaio Biológico

2.2.1. Dieta Hiperlipídica

Foi utilizada neste trabalho dieta hiperlipídica, tipo cafeteria, a qual foi processada manualmente. Esta dieta apresentou distribuição calórica composta por 9,8% de proteínas, 31,4% de carboidratos e 58,8% de lipídios. A formulação da dieta foi a partir de alimentos industrializados, sendo esta constituída por: patê de presunto, batata palha, bacon, mortadela, biscoito maisena, achocolatado, leite em pó integral e ração comercial nas proporções de 2:1:1:1:1:1:1.

2.2.2. Desenho Experimental

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 28/2012). Utilizou-se 56 ratos machos da linhagem wistar, recém desmamados, os quais foram distribuídos em sete grupos experimentais (n=8) de acordo com a tabela abaixo. Estes receberam por oito dias uma dieta comercial e em seguida foi ofertada a dieta hiperlipídica por sete dias. Após este período os grupos receberam, por cinco dias, juntamente com a dieta de cafeteria, seus respectivos tratamentos, sendo estes oferecidos por gavagem usando como veículo o reagente dimetil sulfoxido (DMSO).

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.

| Grupos | Tratamentos |
|-----------------|--|
| DCOM | Ração Comercial |
| DC | Dieta de Cafeteria + DMSO |
| DC + EFM | DC + 250 mg/kg Extrato |
| DC + MANG | DC + 40 mg/kg Mangiferina |
| MANG + GW | DC + 40 mg/kg Mang. + GW9662 |
| MANG + RNT | DC + 40 mg/kg Mang. + Rimonabanto |
| MANG + GW + RNT | DC + 40 mg/kg Mang. + GW9662 + Rimonabanto |

GW9662: antagonista do receptor PPAR (3 mg/kg). Rimonabanto: antagonista irreversível do receptor CB1 (10 mg/kg)

Após o período experimental os animais foram eutanaziados, sendo o cérebro coletado, pesado e armazenado a -80°C até a realização das análises de: peroxidação lipídica, atividade da superóxido dismutase, expressão de genes pró e anti-inflamatórios (TNF- α , NF κ B, IL-10), da HSP72 e dos receptores CB₁ e PPAR α .

2.3. Análises

2.3.1. Atividade Antioxidante

A determinação da peroxidação lipídica por malondialdeído (MDA) e da defesa antioxidante pela atividade da superóxido dismutase (SOD) foram realizadas em amostras de homogeneizado do tecido cerebral, o qual foi preparado na proporção de 5 mL de tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,4 por 500 mg de tecido, sendo em seguida centrifugado (10.000 xg / 15 minutos a 4°C) e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C. A proteína foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976).

- **Atividade da SOD:** A técnica utilizada para determinação da SOD foi baseada na auto-oxidação do pirogalol, sendo definida como 1 unidade de SOD a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. A reação foi composta por 20 μ L de homogeneizado de cérebro, 8 μ L de pirogalol a 24 mmol/L e 4 μ L de catalase a 30 μ mol/L, completando para 200 μ L de tampão Tris 0,01 M (pH 7,4). Esta reação foi incubada a 37°C por 5 minutos, sendo a leitura realizada a 420 nm. Através da curva padrão, com cinco concentrações distintas de SOD (1U a 5U), foi obtida a equação da reta para a realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1995).

- **Peroxidação lipídica:** A determinação de malondialdeído (MDA) foi avaliada segundo o teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). A reação contendo 400 μ l de homogeneizado de cérebro, 1 ml de ácido tricloroacético 20% e 400 μ l de ácido tiobarbitúrico 1,6% foi incubada a 95°C / 1hora, em seguida foi adicionado 1,6 ml de n-butanol, sendo a mistura centrifugada a 3000 r.p.m / 10 min. A leitura foi realizada em 510, 532, e 560 nm a fim de minimizar interferências de pigmentos contidos na amostra (PYLES et al., 1993). Para o cálculo dos valores finais utilizou-se a seguinte equação:

$$MDA_{532} = 1,22 [(A_{532}) - (0,56) (A_{510}) + (0,44) (A_{560})].$$

A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978), sendo os resultados expressos em nmol de MDA / mg de proteína.

2.3.2. Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi averiguada por meio da expressão gênica de marcadores pró e anti-inflamatórios HSP72, CB₁, PPAR α , NF κ B, TNF- α , IL10, pela concentração de TNF- α e pela atividade do NF κ B (p65).

Expressão Gênica de CB₁, PPAR α , NF κ B, TNF- α , IL10 e HSP72: O RNA total do cérebro foi obtido por meio do método Trizol® (Invitrogen, CA, USA), sendo 2 μ g deste utilizado para a síntese do cDNA utilizando o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, USA), seguindo protocolo do fabricante. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por meio da reação reversa da cadeia de polimerase (RT-PCR) pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001). Para esta análise foi utilizado o equipamento AB StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) e o reagente 2X SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystem). Foram analisadas as transcrições de HSP72 (Fw-AGGCCAACAAGATCACCATC, Rv-TAGGACTCGAGCGCATTCTT), CB₁ (Fw-ATATTCTCTGGAAGGCTCACAGCC, Rv-GAGCATACTGCAGAATGCAAACACC), NF κ B (Fw-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA, Rv-TCGCACTTGTAACGGAAACG), PPAR α (Fw-CCTGCCTTCCCTGTGAACT, Rv-ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA), TNF- α (Fw-ACGGCATGGATCTCAAAGAC, Rv-AGATAGCAAATCGGCTGACG). Foi utilizado como controle endógeno o gene GAPDH (Fw-GGTTGTCTCCTGTCACTTC, Rv-CTGTTGCTGTAGCCATATTC).

- Atividade de NF κ B (p65) e concentração de TNF- α : Preparou-se o homogeneizado do cérebro utilizando o kit NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction (Pierce Biotechnology / Thermo Fisher Scientific Inc, MA, EUA), com o qual se separou o extrato nuclear e o citoplasmático, sendo o primeiro utilizado para análise de atividade de p65 e o segundo para determinar a concentração de TNF- α .

A determinação da atividade de NF κ B (p65) foi realizada na fração nuclear do homogeneizado do cérebro utilizando o kit *NF κ B (p65) Transcription Factor Assay*

(Cayman Chemical), seguindo instruções do fabricante. A quantidade de NFκB p65 foi avaliada a 450 nm em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific), sendo o resultado dado em unidades arbitrárias de acordo com a absorvância do controle positivo.

A concentração de TNF-α na fração citoplasmática foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit Rat Cytokine capture beads (BD Biociences), com o qual foi preparado a curva padrão e as reações contendo as amostras de homogeneizados de cérebro, seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados (pg/ml) foram analisados no Software FCAP Assay (BD Biociences, CA, EUA).

2.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. Para análise descritiva dos dados e testes de comparação de grupos independentes utilizou-se o software Sigma Plot 11.0. Para avaliação da distribuição das variáveis foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv, sendo aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-wallis em comparações de variâncias múltiplas e o teste de Wilcoxon para comparação de dois grupos independentes quando as distribuições não apresentaram normalidade. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal foi realizada análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey ou Dunnett para variáveis múltiplas e o teste T para dois grupos independentes. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

O presente estudo avaliando as possíveis alterações cerebrais decorrentes da ingestão de dieta hiperlipídica e a reversão destas pelo tratamento com extrato de folhas de *M. indica* e mangiferina demonstrou que a dieta rica em gordura saturada, mesmo consumida por curto período de tempo, 13 dias, levou a um aumento expressivo da peroxidação lipídica no cérebro dos animais (figura 1). Enquanto que todos os tratamentos, administrados por cinco (5) dias, promoveram uma redução significativa da concentração de malondialdeído.

O grupo que recebeu a mangiferina apresentou valores de MDA igual ao dos animais que não receberam a dieta hiperlipídica. A administração do GW9662 tendeu a aumentar o MDA comparado a mangiferina, enquanto a administração do rimonabanto®

levou a uma diminuição expressiva do MDA, mesmo resultado apresentado pela administração de ambos os antagonistas, sendo estes valores significativamente menores que dos animais controle negativo (DCOM) (Figura 1).

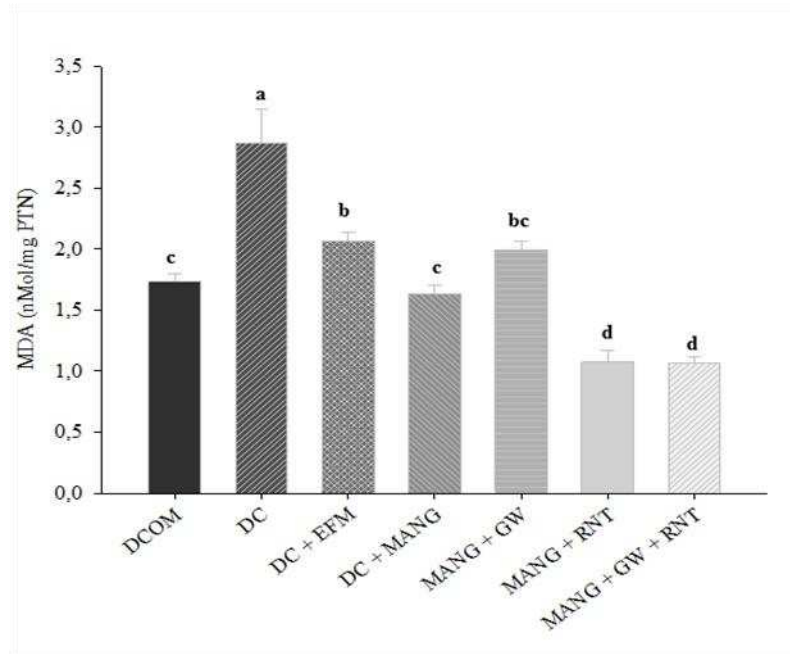


Figura 1. Concentração de malondialdeído em homogeneizado de cérebro de animais alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). PTN: Proteína total; MDA: Malondialdeído. DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de *Mangifera indica* (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de CB_1 : 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

A dieta hiperlipídica não alterou a atividade da SOD comparado ao grupo que recebeu a ração comercial, no entanto os tratamentos oferecidos provocaram o aumento desta atividade. O grupo em que foi administrado o antagonista dos receptores CB_1 juntamente com a mangiferina apresentou atividade da SOD maior que o grupo que recebeu somente a mangiferina (Figura 2).

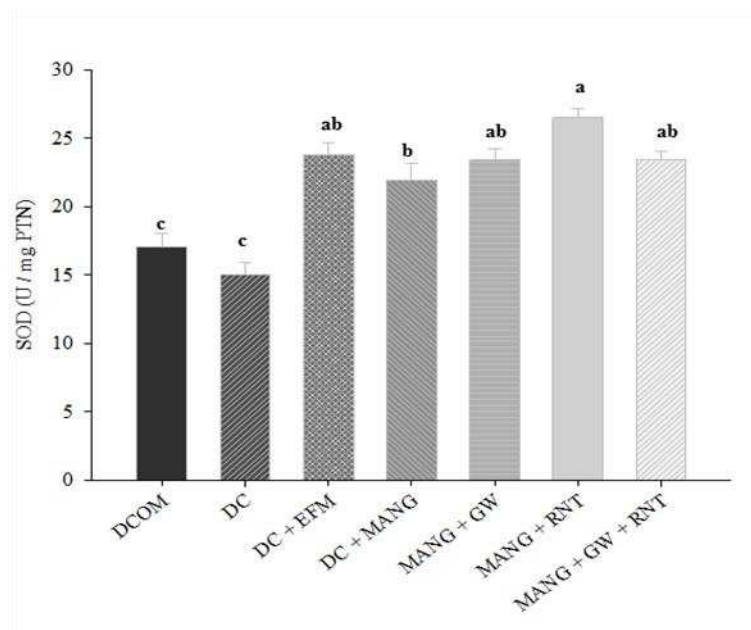


Figura 2. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em homogeneizado de cérebro de animais alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). PTN: Proteína total. DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de CB_1 : 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

Os resultados da expressão dos genes avaliados foram demonstrados de forma que se compararam os grupos controles (positivo e negativo) com os grupos que receberam o tratamento com o extrato e com a mangiferina (figuras 3, 4 e 6). Enquanto que os grupos que receberam a mangiferina juntamente com os antagonistas foram analisados separadamente (figura 7).

O grupo que recebeu a dieta hiperlipídica apresentou uma expressão de mRNA de HSP72 menor que os demais grupos. Os tratamentos com mangiferina e extrato levaram a um aumento da expressão desta chaperona, destacando-se o primeiro por apresentar um valor de mRNA de HSP72 superior ao grupo que não recebeu a dieta hiperlipídica (Figura 3).

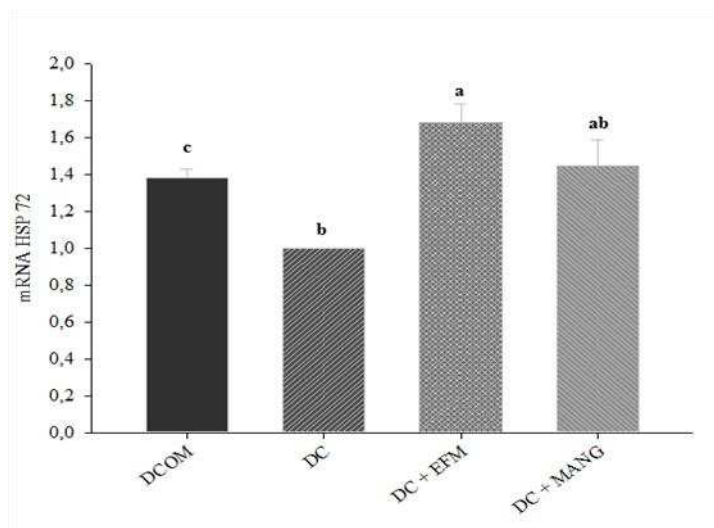


Figura 3. Expressão de mRNA de HSP72 no cérebro de animais alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)).

A dieta hiperlipídica elevou os marcadores pró-inflamatórios (NFκB p65 e TNF-α) no cérebro dos animais comparado aos animais que não receberam esta dieta (figura 4).

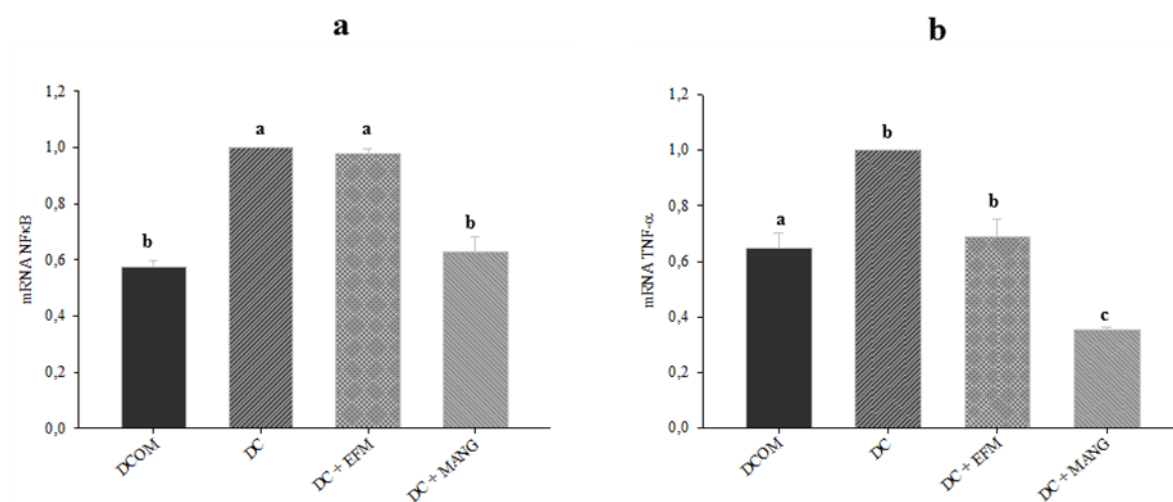


Figura 4. Expressão de mRNA de NFκB p65 e TNF-α no tecido cerebral de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. (a) Expressão de mRNA NFκB (p65) por qRT-PCR; (b) Expressão de mRNA de TNF-α por qRT-PCR. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). DCOM: ração comercial,

DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)).

A mangiferina demonstrou reverter esse efeito levando a diminuição de ambos os genes, enquanto o tratamento com o extrato não diminuiu a expressão de NFκB p65 (figura 4).

A atividade de NFκB p65, no extrato nuclear, foi maior no grupo que recebeu a dieta de cafeteria comparada ao que recebeu a ração comercial. Os grupos que receberam tanto o extrato de folha de manga quanto à mangiferina não apresentaram diminuição desta atividade, apesar de demonstrar uma tendência a isto. No entanto, ao se administrar a mangiferina junto com o rimonabanto houve uma redução da atividade de p65, o mesmo ocorrendo quando foram oferecidos ambos os antagonistas (figura 5a).

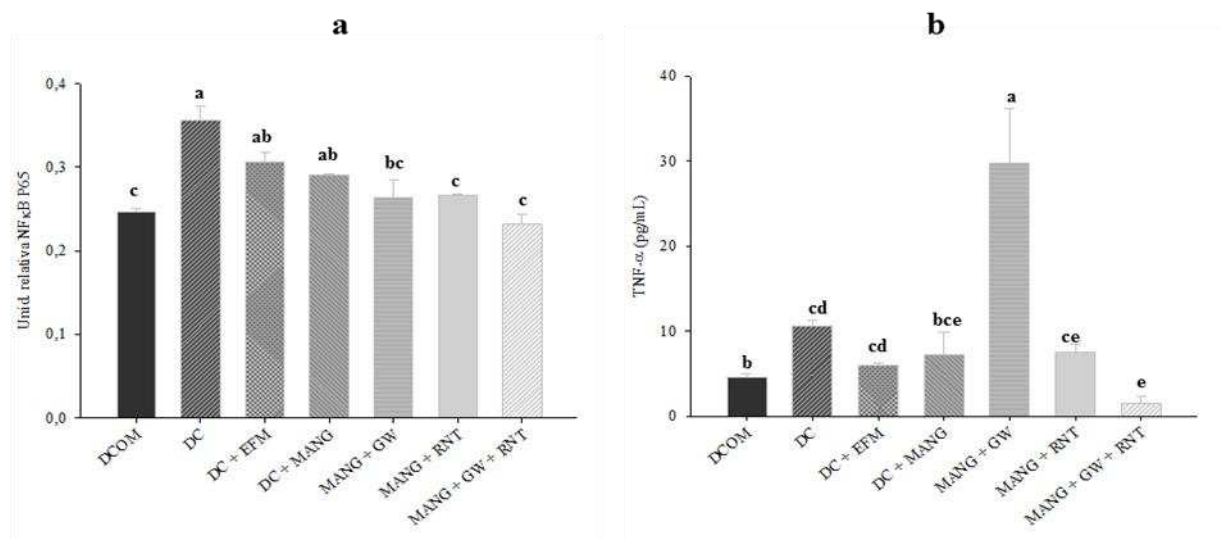


Figura 5. Atividade de NFκB (p65) e concentração de TNF-α no tecido cerebral de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. (a) Atividade de NFκB (p65) (unidades relativas) na fração nuclear de homogeneizado de cérebro. (a) Concentração de TNF-α na fração citoplasmática de homogeneizado de cérebro. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)), MANG + GW9662: DC + mangiferina + antagonista de PPAR (3 mg/kg de peso do animal), MANG + RNT: DC + mangiferina + rimonabanto (antagonista de

CB₁: 10 mg/kg de peso do animal) e MANG + GW + RNT: DC + mangiferina + GW9662 + rimonabanto.

O tratamento com o extrato reduziu a concentração de TNF- α , elevada pela dieta hiperlipídica, a valores iguais aos dos animais que não receberam esta dieta. Já a mangiferina não reduziu esta concentração, a qual foi extremamente elevada quando se administrou junto a essa, o antagonista de PPAR. Entretanto ao se administrar ambos os antagonistas este aumento foi revertido (figura 5b).

A dieta hiperlipídica alterou a expressão gênica dos receptores provocando um aumento de CB₁ e uma diminuição de PPAR- α . O tratamento com o extrato reverteu esta alteração em ambos os receptores a valores iguais ao apresentado pelos animais que não receberam esta dieta. Já a mangiferina não interferiu na expressão gênica destes receptores (figura 6).

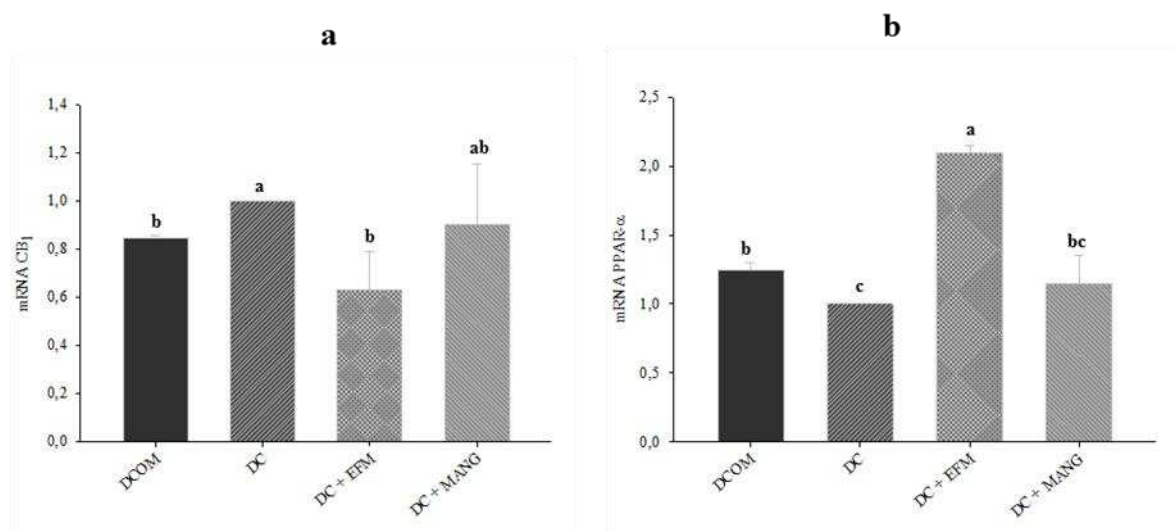


Figura 6. Expressão de mRNA do receptor CB₁ e PPAR- α no cérebro de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. (a) Expressão de mRNA de CB₁ por qRT-PCR; (a) Expressão de mRNA de PPAR- α por qRT-PCR. Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa (p<0,05). DCOM: ração comercial, DC: dieta de cafeteria, DC + EFM: dieta de cafeteria + extrato de folha de Mangifera indica (250 mg/kg de peso do animal), DC + MANG (dieta de cafeteria + mangiferina (40 mg/kg de peso)).

No que se refere a uma das propostas do estudo em verificar se a ação da mangiferina, na expressão dos genes relacionados à inflamação, ocorre pela via dos receptores PPAR- α e CB₁, percebeu-se que na maioria deles o bloqueio destes receptores alterou a ação desta xantona. A administração do antagonista de CB₁ (rimonabanto) levou a uma maior expressão deste receptor e menor do PPAR. Além disso, aumentou o mRNA de NF κ B, TNF- α e HSP72 (figura 7).

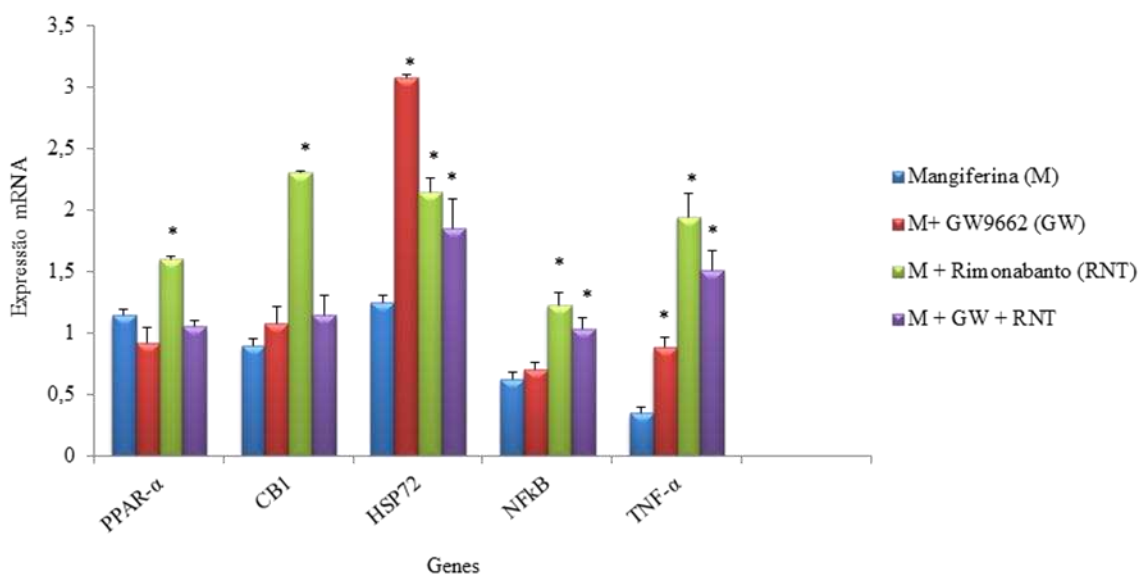


Figura 7. Efeito da mangiferina na presença dos antagonistas dos receptores PPAR e CB₁ sobre a expressão de mRNA de genes relacionados com a inflamação no tecido cerebral de ratos alimentados com dieta de cafeteria por 13 dias e submetidos aos diferentes tratamentos, do 8º ao 13º dia. *Médias \pm DP que diferem do controle (Mangiferina) apresentando diferença significativa pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). GW9662: antagonista do receptor PPAR; Rimonabanto: antagonista do receptor CB₁.

Já o bloqueio do receptor PPAR pelo uso de GW9662 não interferiu na expressão gênica de ambos os receptores, no mRNA de NF κ B, mas aumentou o mRNA de TNF- α e HSP72. Já a administração de ambos os antagonistas não alterou a expressão gênica destes receptores, no entanto, elevou o mRNA de NF κ B, TNF- α e HSP72 como ocorreu na presença somente do rimonabanto (figura 7).

4. DISCUSSÃO

A dieta rica em gordura saturada é conhecida por provocar várias desordens metabólicas no organismo, como a obesidade e hiperlipidemia levando a síndrome metabólica. Estas desordens são caracterizadas pela presença de estresse oxidativo e um quadro de inflamação crônica de grau leve. Estudos relatam que o hipotálamo é alvo desse processo inflamatório, com ativação de astrogliia e microglia e produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, levando a uma desregulação da homeostase energética.

O presente trabalho visando avaliar o efeito do extrato de folhas de *M. indica* (manga, variedade Ubá) e da mangiferina em reverter possíveis alterações decorrentes da ingestão da dieta de cafeteria sobre o cérebro demonstrou que estes exerceram atividade antioxidante, uma vez que aumentaram a atividade da SOD e diminuíram a peroxidação lipídica. No entanto, ao administrar o GW9662, houve um aumento dos níveis de MDA comparada ao grupo que recebeu a mangiferina isolada demonstrando que o bloqueio do receptor PPAR diminui a ação da mangiferina em reverter a lipoperoxidação.

Estudos relatam que vários extratos de plantas ricas em antioxidantes e também seus compostos bioativos isolados, aumentam as defesas antioxidantes do organismo, como a SOD, e conseqüentemente reduz a peroxidação lipídica (ONYEKA et al., 2012; EZA et al., 2015). A mangiferina é capaz de limitar a ativação da microglia (células fagocitárias do SNC) induzida por lipopolissacarídeo, levando a uma redução da produção de prostaglandina E2, a formação de radicais livres e a síntese de ciclo-oxigenase-2 (BHATIA et al., 2008) demonstrando a ação desta xantona sobre o SNC.

No presente estudo verificou-se que a dieta hiperlipídica diminuiu a expressão gênica da HSP72, sendo esta revertida pelos tratamentos com extrato de folha de manga e mangiferina. Este dado favorece a idéia de que estes tratamentos podem diminuir os efeitos deletéricos provocados por este tipo de dieta, visto que estas chaperonas são responsáveis por protegerem as proteínas mantendo sua conformação estrutural e auxiliando na translocação destas aos seus locais específicos de ação. Portanto, o aumento da HSP72 está relacionado com a diminuição do estresse e da inflamação. Este resultado foi confirmado com a avaliação dos marcadores inflamatórios, uma vez que o aumento do mRNA da HSP72 pelo extrato e pela mangiferina estão relacionados com uma redução da concentração e da expressão gênica de TNF- α , além de uma redução do mRNA de NF κ B

pela mangiferina. Estes tratamentos ainda apresentaram uma tendência em reduzir a atividade de NFκB (p65).

Kim e colaboradores (2014) verificaram que a super expressão de HSP72 favorece a neuroproteção por interagirem com as proteínas IκB e JNK impedindo a fosforilação destas e conseqüentemente bloqueando a via de sinalização do NFκB. Dados estes que estão de acordo com o presente estudo.

Na literatura é encontrado que os receptores PPARs e os endocanabinóides podem agir sobre a neuroproteção podendo ser alvos em diversas doenças que causam danos ao cérebro. No presente estudo foi verificado que o extrato interferiu na expressão dos receptores PPAR-α e CB₁ levando, respectivamente, a um aumento e diminuição destes. Enquanto a mangiferina não interferiu na expressão gênica destes receptores.

É relatado que ligantes dos receptores CB₁ exercem efeito anti-inflamatório por modularem a produção de citocina pró-inflamatórias pela células da glia, principalmente o TNF-α considerado o maior contribuinte para fisiopatologias no tecido cerebral. Os PPARs, também apresentam importante papel na atenuação da neuro-inflamação do SNC por promoverem a inativação do NFκB inibindo assim a transcrição de genes pró-inflamatórios (STAHEL et al., 2008).

O presente estudo buscou verificar se o bloqueio destes receptores (PPAR e CB₁) interfere na ação da mangiferina no SNC, e foi visto que a administração de GW9662 (antagonista de PPAR) e de rimonabanto (antagonista de CB₁) provocou um aumento da expressão gênica de NFκB e TNF-α favorecendo a neuro-inflamação. Além disso, os resultados encontrados demonstraram que a mangiferina pode ter sua ação via receptores CB₁ e PPAR, uma vez que na ausência dos antagonistas apresentou efeitos anti-inflamatórios no tecido cerebral diminuindo a expressão de mRNA de NFκB e TNF-α, o qual foi revertido na presença dos antagonistas destes receptores.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a ingestão da dieta hiperlipídica por um período curto de tempo, 13 dias, promoveu um estresse oxidativo e aumento da expressão de genes pró-inflamatórios no tecido cerebral de ratos. Ao mesmo tempo foi verificado que os tratamentos dos animais com o extrato de folhas de *M.indica* e mangiferina, por 5 dias, reverteram as alterações causadas pela ingestão desta dieta. O estudo destaca ainda que o

efeito anti-inflamatório da mangiferina está relacionado com a via de sinalização dos receptores CB₁ e PPAR, uma vez que o bloqueio destes receptores levou ao aumento da expressão gênica de marcadores pró-inflamatório. Diante disto, acredita-se que a mangiferina possa exercer um importante papel na terapia da neuro-inflamação ocorrente em diversas doenças neurológicas.

6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

BHATIA, H.S; CANDELARIO-JALIL, E.; OLIVEIRA, A.C.P. Mangiferin inhibits cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in activated rat microglial cells. **Archives of biochemistry and Biophysics**. 477(2):253-258, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72(1-2):248-254, 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 52: 302-310, 1978.

BURNEIKO, R.C.M.; DINIZ, Y.S, GALHARDI, C.M.; RODRIGUES, H.G.; EBAID, G.M.X.; FAINE, L.A. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chemistry and Toxicology**. 44:1167–1172, 2006.

CAMPOS-ESPARZA, M.R.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V.; MATUTE, C. Food and Chemical Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. **Cell Calcium**. 45: 358–368, 2009.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Revista Brasileira de Clinica Medica**. 9(2):138-45, 2011.

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**. 28, 596–600, 2005.

EZE E. D.; ALIYU, M.; YUSUF, T.; ABUBAKAR, A. Effect of lycopene on kidney antioxidant enzyme activities and functions in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Cell Biology**. 3(1):1-13, 2015.

FRANCISCHETTI, E. M.; ABREU, V. G. O sistema endocanabinóide: Novas perspectivas no controle de fatores de risco cardiometabólico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 87: 548-558, 2006.

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

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

GOTTLIEB, M.; LEAL-CAMPANARIO, R.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SANCHEZ-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**. 23:374–386, 2006.

GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPADHYAY, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. **Chemotherapy**. 42: 443–451, 1996.

KOSHIYAMA H, SHIMONO D, KUWAMURA N, et al. Rapid communication: inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 86(7):3452-6, 2011.

KIM, J.Y.; YENAREI, M.A.; LEE, J.E. Regulation of inflammatory transcription factors by heat shock protein 70 in primary cultured astrocytes exposed to oxygen–glucose deprivation. **Neuroscience**. 286: 272-280, 2014.

KLEIN, T.W.; CABRAL, G.A. Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. **Journal Neuroimmune Pharmacology**. 1:50–64, 2006.

KOHN, H.I., LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and manadione. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**. 82: 292-300, 1944.

KRETSCHMER, B.D.; SCHELLING, P.; BEIER, N.; LIEBSCHER, C.; TREUTEL, S.; KRUGER, N. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Science**. 76:1553–1573, 2005.

LINDQVIST, A; MOHAPEL, P.; BOUTER, B.; FRIELING, H.; PIZZO, D.; BRUNDIN, P.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. **European Journal of Neurology**. 13(12):1385-1388, 2006.

LIONETTI, L.; MOLLICA, M. P.; LOMBARDI, A.; CAVALIERE, G.; GIFUNI, G.; BARLETTA, A. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. 19:146–152, 2009.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)). **Methods**. 25(4):402-408, 2001.

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research** (CRC Press Boca Raton FL), p.243-247, 1985.

MASIBO, M.; H.E, Q. Mango Bioactive compounds and related nutraceutical properties - A Review. **Food Reviews International**. 25(4): 346–370, 2009.

MATOS, A. F. G.; GUEDES, E. P.; SOUZA, L. L.; VALÉRIO, C. M. O sistema endocanabinóide: Novo paradigma no tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 50:390-399, 2006.

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**. 176:165–173, 2002.

ONYEKA CA, ALIGWEKWE AU, NWAKANMA AA, BAKARE AA, OFOEGO UC. Effects of ethanolic root bark extract of *Chrysophyllum albidum* serum superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde in rat. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. 3(3):347-351, 2012.

O’SULLIVAN, S. E.; KENDALL, D.A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. **Immunobiology**. 215 (8):611-616, 2010.

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**. 55: 351–358, 2007.

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**. 57:79–86, 2008.

PARDO-ANDREU, G.L.; DELGADO, R.; VELHO, J.A.; CURTI, C.; VERCESI, A.E. Mangiferin, a natural occurring glycosyl xantone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 439:184–193, 2005.

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**. 23: 756–760, 2009.

PYLES, L.A.; STEJSKAL, E.J.; EINZIG, S. Spectrophotometric measurement of plasma 2-thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 202(19), 1993.

RIBEIRO, E. B. Studying the central control of food intake and obesity in rats. **Revista de Nutrição**. 22(1):163-171, 2009.

SANGEETHA, K. N.; SUJATHA, S.; MUTHUSAMY, V. S.; ANAND, S.; NITHYA, N.; VELMURUGAN, D.; BALAKRISHNAN, A.; LAKSHMI, B. S. 3β -taraxerol of *Mangifera indica*, a PI3K dependent dual activator of glucose transport and glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1800:359-366, 2010.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **Journal of Clinical Investigation**. 118, 2992–3002, 2008.

SIPE, J. C.; WAALEN, J.; GERBER, A.; BEUTLER, E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). **International Journal of Obesity**. 29:755-759, 2005.

STAHEL, P. F.; SMITH, W. R.; BRUCHIS, J.; RABB, C. H. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: “Key” Regulators of Neuroinflammation after Traumatic Brain Injury. **PPAR Research**, 2008.

SIDHU, J.S., COWAN, D., KASKI, J.C. The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients. **Journal of the American College Cardiology**. 42(10):1757-63, 2003.

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

VAN GAAL LF, RISSANEN AM, SCHEEN AJ, et al. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. **The Lancet**. 365:1389-1397, 2005.

VELLOSO, L.A. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 53(2):151-158, 2009.

TANASESCU, R.; CONSTANTINESCU, C.R. Cannabinoids and the immune system: An overview. **Immunobiology**. 215(8):588-597, 2010.

CAPÍTULO 4: EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Mangifera indica* E MANGIFERINA SOBRE O CÉREBRO DE ANIMAIS ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA

Efeito protetor do extrato de *Mangifera indica* e mangiferina sobre o cérebro de animais alimentados com dieta de cafeteria

Protective effect of *Mangifera indica* extract and mangiferin on the brain of animals fed with cafeteria diet

RESUMO

As dietas ricas em lipídios são tidas como um dos principais fatores que desencadeiam diversas doenças crônicas, como a obesidade. Além disso, estudos relatam que este tipo de dieta pode estar relacionado com inflamação no sistema nervoso central (SNC), uma vez que os ácidos graxos saturados podem se ligar aos receptores TLR4 (toll-like receptor 4). O organismo dispõe de mecanismos que podem regular o processo inflamatório como a via de sinalização dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) e o sistema endocanabinóide (SECB). Pesquisas com diversas partes da planta *Mangifera indica* relatam suas propriedades terapêuticas como antioxidante e anti-inflamatória, sendo a mangiferina, presentes nestes extratos, o maior responsável por estes efeitos. O estudo teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante e anti-inflamatório do extrato de folha de manga (variedade Ubá) e da mangiferina, sobre o cérebro de animais alimentados com dieta hiperlipídica. O estudo foi composto por três grupos experimentais; DC: dieta de cafeteria (DC), EFM + DC: DC + extrato da folha de manga (250 mg/kg) e MANG + DC: DC + mangiferina (40 mg/kg), os quais receberam os tratamentos por oito dias. O extrato e a mangiferina diminuíram a concentração de malondialdeído (MDA), aumentaram a expressão gênica da HSP72, e diminuíram o mRNA de NFκB e a sua ativação. O extrato diminuiu o mRNA de TNF-α, enquanto a mangiferina induziu um aumento expressivo do mRNA de IL-10. Estes tratamentos aumentaram a expressão gênica do receptor PPAR-α, enquanto que não interferiram no mRNA de CB₁. Os dados demonstraram que a mangiferina e o extrato de folha de *M. indica* exerceram atividade antioxidante e anti-inflamatória nos cérebros de animais alimentados com dieta de cafeteria, podendo ser utilizadas na neuroproteção contra danos no tecido cerebral.

Palavras chave: Mangiferina, *Mangifera indica*, inflamação, antioxidante, dieta de cafeteria.

ABSTRACT

High diets fat is considered one of the main factors that trigger various chronic diseases such as obesity. Moreover, studies have reported that this type of diet may be associated with inflammation in the central nervous system (CNS), since the saturated fatty acids can bind to TLR4 receptor (Toll-like receptor 4). The body has mechanisms that may regulate the inflammatory process as the signaling pathway of PPARs receptors (peroxisome proliferator-activated receptor) and the endocannabinoid system (ESCB). Research with the *Mangifera indica* plant report their therapeutic properties as antioxidant and anti-inflammatory, and mangiferin, present in these extracts, largely responsible for these effects. The study aimed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effect of mango leaf extract (variety Ubá) and mangiferin on the brain of animals fed high-fat diet. The study consisted of 3 groups; DC: cafeteria diet, EFM + DC: DC + mango leaf extract (250 mg/kg) and MANG + DC: DC + mangiferin (40 mg/kg), with treatment for 8 days. The extract and mangiferin decreased malondialdehyde concentration, increased gene expression of HSP72, and decreased NF κ B mRNA and their activation. The extract decreased TNF- α mRNA, while mangiferin induced a significant increase in IL-10 mRNA. These treatments increased the gene expression of PPAR- α receptor, whereas no significant effect on mRNA CB $_1$. The data demonstrate that mangiferin and *M. indica* leaf extract showed antioxidant and anti-inflammatory activity in brain of animals fed a cafeteria diet may be used for neuroprotection of damage to brain tissue.

Keywords: mangiferin, *Mangifera indica*, inflammation, antioxidant, diet cafeteria

1. INTRODUÇÃO

A *Mangifera indica*, é uma espécie conhecida em todo o mundo, sendo o seu fruto (manga), apreciado para o consumo na forma in natura, além de ser amplamente utilizado na indústria para a obtenção de sucos e néctares. Esta espécie, da família Anacardiaceae, destaca-se por apresentar uma grande variedade de compostos bioativos, como flavonóides e xantonas, os quais estão presentes não só na polpa do fruto, mas também nas diversas partes da *M. indica* (casca da fruta, semente, folha, etc.) (RIBEIRO et al., 2008). Estes compostos bioativos exercem várias propriedades farmacológicas como analgésica, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, entre outras. Estas atividades são, em sua

maioria, causadas pela ação da mangiferina, considerada o principal composto bioativo da *M. indica* (MARTINEZ et al., 2001; GARCÍA et al., 2002; GARRIDO et al., 2004; NÚÑEZ-SELLÉZ et al., 2007; PARDO-ANDREU et al., 2008).

As dietas ricas em lipídios são tidas como um dos principais fatores que desencadeiam diversas doenças crônicas, como a obesidade, hiperlipidemia, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, entre outras. Além disso, este tipo de dieta pode estar relacionado com uma inflamação no sistema nervoso central (SNC), uma vez que os ácidos graxos saturados podem se ligar aos receptores TLR4 (toll-like receptor 4), presentes na membrana dos neurônios. Estes receptores normalmente servem para a ligação de antígenos, no entanto, na presença de altos níveis de ácidos graxos saturados ocorre a ligação destes com os receptores, desencadeando o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias com conseqüente processo de inflamação. Este quadro inflamatório interfere nos sinais dos hormônios insulina e leptina e promove a morte dos neurônios orexígenos (centro da fome) e anorexígeno (centro da saciedade). Foi verificado que no processo inflamatório do SNC ocorre um maior número de mortes dos neurônios anorexígenos, o que favorece a ocorrência da obesidade (MILANSKI et al., 2009).

A inflamação do SNC pode levar ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2) devido a sinalização defeituosa da insulina. No entanto, esta doença metabólica também é considerada fator de risco para a demência em idosos (LEIBSON et al., 1997; OTT et al., 1999) devido ao aumento da neuroinflamação decorrente dos efeitos da DM2 mal controlada que leva ao desencadeamento da ativação de NF- κ B e a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas ativam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais intensificam a via do NF- κ B, levando a um ciclo vicioso (SONNEN et al., 2009; GRANIC et al., 2009).

O organismo dispõe de mecanismos que podem regular o processo inflamatório como a via de sinalização dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) e o sistema endocanabinóide (SECB). Este sistema é constituído pelos receptores CB₁ e CB₂, os endocanabinóides endógenos (N-aracdonoil etanolamina e a 2-aracdonoil glicerol) e as enzimas responsáveis pela síntese e degradação destes.

Os receptores CB₁ são encontrados em vários tecidos, no entanto, sua prevalência ocorre no SNC, sendo considerado o receptor de membrana ligado a proteína G mais abundante no cérebro. Enquanto o CB₂ está presente nas células do sistema imunológico (DI MARZO et al., 2004; HOWLETT et al., 2004).

Os receptores endocanabinóides e PPARs podem ser ativados por uma série de compostos (endógenos e exógenos). Sugere-se que os canabinóides agem tanto nos receptores CBs quanto nos receptores PPARs, apresentando efeito benéfico no processo inflamatório envolvido em diversas desordens metabólicas (RANDALL et al., 2007). Estudos relatam que a combinação de ligantes destes dois receptores pode ter um importante papel terapêutico no tratamento da neuro-inflamação (STAHHEL et al., 2008).

A inflamação e o estresse oxidativo, tanto nos tecidos periféricos quanto no SNC, podem ser controlados por mecanismos de defesas endógenos. A superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa do organismo para combater as espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que esta é responsável pela dismutação dos ânions superóxidos, os quais são os principais radicais livres produzidos pelas mitocôndrias em situações de estresse (RIBEIRO et al., 2005).

Além das enzimas antioxidantes, as proteínas de choque térmico HSP70 (Heat Shock Proteins) apresentam um importante papel na defesa do organismo contra o estresse metabólico, situação na qual ocorre maior expressão desta chaperona. Estudos relatam que estas proteínas podem apresentar efeitos benéficos nos processos inflamatórios regulando negativamente a transcrição do gene TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e bloqueando a via de sinalização do fator de transcrição NF κ B (fator nuclear kappa B) (TANAKA et al., 2014).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato da folha de *M. indica* e mangiferina na proteção do SNC de animais alimentados com dieta rica em ácidos graxos saturados verificando a expressão gênica da proteína HSP72, dos receptores CB₁ e PPAR- α e a expressão e concentração de genes pró e anti-inflamatórios (TNF- α , NK κ B e IL-10), além da atividade da SOD e análise da peroxidação lipídica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do extrato e da Mangiferina

As folhas de *Mangifera indica* L., variedade Ubá, foram coletadas no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, e a exsiccata, depositada no Herbário da Universidade Federal de Viçosa (VIC nº 37.611). As folhas foram secas à temperatura ambiente e trituradas obtendo-se um pulverizado que foi utilizado para obtenção do extrato etanólico 95% por percolação exaustiva e concentração a vácuo em evaporador rotativo, a 60°C. O

concentrado foi então liofilizado, com um rendimento final de aproximadamente 27% a partir da droga vegetal seca.

Para o isolamento da mangiferina foi feito o mesmo procedimento de obtenção do extrato, sendo a amostra anteriormente desengordurada em soxhlet, utilizando como solvente o éter de petróleo, durante 12 horas. Após esse processo, o extrato foi submetido a sucessivas recristalizações com acetato de etila tendo um rendimento final de 3,6% de mangiferina a partir da droga vegetal seca. O procedimento de purificação foi monitorado por cromatografia de camada delgada e a pureza do composto avaliada por HPLC comparando-se o cromatograma ao padrão de mangiferina (Sigma Aldrich). A metodologia utilizada nesses processos foi adaptada de Muruganandan et al., 2002.

2.2. Ensaio Biológico

O estudo foi realizado após ser aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 28/2012). Foram utilizados 24 ratos Wistar, machos, com 25 dias de idade, submetidos a um período experimental de duas semanas. Os animais foram divididos em três grupos constituídos de oito animais cada (n= 8). Tanto o extrato das folhas de manga da variedade Ubá, quanto à mangiferina isolada, foram oferecidos aos animais por gavagem, na concentração de 250 mg/Kg e 40 mg/Kg, respectivamente, utilizando como veículo o composto dimetil sulfoxido (DMSO).

Os animais foram distribuídos em gaiolas coletivas, com ventilação apropriada, e mantidos em sala climatizada com temperatura média de 22°C e foto período (claro/escuro) de 12 horas. Os ratos foram alimentados, durante sete dias, com ração comercial, e a partir daí foi ofertada a dieta de cafeteria e os tratamentos por um período de oito dias.

A distribuição calórica da dieta continha 9,8% de proteínas, 31,4% de carboidratos e 58,8% de lipídios, sendo constituída dos seguintes alimentos: patê de presunto, batata palha, bacon, mortadela, biscoito maisena, achocolatado, leite em pó integral e ração comercial nas proporções de 2:1:1:1:1:1:1. Durante todo o experimento, os animais receberam dieta e água ad libitum.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: DC (dieta de cafeteria + DMSO), EFM + DC (dieta de cafeteria + extrato de folha de manga) e MANG + DC (dieta de cafeteria + mangiferina).

Após oito dias de tratamento, os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas e em seguida eutanasiados e o cérebro coletado, pesado e armazenado a -80°C para as

análises de peroxidação lipídica (malondialdeído), atividade da superóxido dismutase, atividade de NFκB (p65) e a expressão gênica de: CB₁, PPARα, NFκB, HSP72, IL-10 e TNF-α.

2.3. Análises Realizadas

2.3.1. Peso Relativo do Cérebro:

Determinado pela relação entre o peso do cérebro e o peso corporal, sendo definido pela fórmula:

$$\text{PRC} = (\text{peso do cérebro} / \text{peso corporal}) \times 100$$

2.3.2. Parâmetros Avaliados no Homogeneizado do Cérebro

O homogeneizado do cérebro foi preparado com 500 mg do tecido em 5 mL de tampão Tris (0,01 M, pH 7,4) utilizando um homogeneizador com banho de gelo. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados sob refrigeração e o sobrenadante retirado e armazenado a -80°C.

- Concentração de malondialdeído (MDA): A determinação de MDA foi feita pelo teste de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (KOHN; LIVERSEDGE, 1944). Foram adicionados em 400 µl de sobrenadante do homogeneizado, 1 ml de ácido tricloroacético 20% e 400 µl de ácido tiobarbitúrico 1,6%. A mistura foi incubada por uma hora, a 95°C, sendo em seguida acrescentados 1,6 ml de n-butanol, e centrifugada por 10 minutos a 3000 r.p.m com a retirada da fase orgânica, na qual foi determinada a absorvância em 510, 532, e 560 nm. Para o cálculo dos valores finais utilizou-se a seguinte equação, proposta para minimizar a interferência de pigmentos na dosagem de MDA (PYLES et al., 1993):

$$\text{MDA}_{532} = 1,22[(A_{532}) - (0,56) (A_{510}) + (0,44) (A_{560})]$$

A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE; AUST, 1978), sendo os resultados expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína (MDA/PTN). A proteína total do homogeneizado do cérebro foi quantificada, segundo o método de Bradford (1976).

- **Atividade da superóxido dismutase (SOD):** A atividade desta enzima é dada em unidades relativas, sendo uma unidade de SOD definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do pirogalol. No meio de reação foram utilizados 20 µL de homogeneizado do cérebro, 8µL de pirogalol 24 mmol/L e 4 µL de catalase 30 µmol/L, completando para 200 µL com tampão Tris-HCl-EDTA 0,01 M (pH 7,4). Os cálculos foram realizados segundo a equação linear obtida pela curva padrão, a qual teve cinco concentrações de SOD (1U – 5U). A leitura de absorvância foi feita a 420 nm, sendo os resultados expressos em U de SOD / mg de proteína (MARKLUND, 1985).

Análise de NFκB (p65): A atividade de p65 foi determinada utilizando um kit específico *NFκB (p65) Transcription Factor Assay* (Cayman Chemical). O extrato nuclear do tecido cerebral foi preparado utilizando o kit NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction, segundo instruções do fabricante. O extrato nuclear, 10 µL, foi incubado durante a noite em placa de 96 poços contendo uma sequência específica de dsDNA, na qual ocorre a ligação do NFκB (p65) contido na amostra. Este é então detectado por incubação com um anticorpo primário específico para a forma ativada de p65, que é, em seguida, incubada com anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase. A quantidade de NFκB (p65) foi avaliada a 450 nm em espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Scientific), sendo o resultado obtido de acordo com a absorvância do controle positivo.

2.3.3. Expressão Gênica de HSP72, CB₁, PPAR α , NFκB, TNF- α , IL10:

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, CA, USA), sendo este quantificado a 260 nm, e analisado quanto à pureza pela relação 260nm e 280nm em espectrofotômetro Multiskan Go (Thermo Scientific, DE, USA), e quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose. Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Brasil Ltda.), seguindo protocolo do fabricante. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) utilizando o equipamento AB StepOne Real Time PCR System e o reagente 2X SYBR Green Máster Mix (Applied Biosystems, CA, USA). O volume final de cada reação foi de 10 µl, sendo 2 µl do cDNA; 0,8 µl da mistura dos iniciadores a 2,5 µM

(senso e antisenso), 5,0 µl do reagente Sybr Green e 2,2 µl de água ultra pura. Os parâmetros utilizados na corrida foram 15 min a 95° C e em seguida 40 ciclos de 95° C (15s), 60° C (30s) e 72° C (30s), seguido pela análise da curva de melting. Os iniciadores foram: HSP72 (Fw-AGGCCAACAAGATCACCATC, Rv-TAGGACTCGAGCGCATTCTT), CB1 (Fw-ATATTCTCTGGAAGGCTCACAGCC, Rv-GAGCATACTGCAGAATGCAAACACC), NFκB (Fw-CTTCTGGGCCATATGTGGAGA, Rv-TCGCACTTGTAACGGAAACG), PPARα (Fw-CCTGCCTTCCCTGTGAACT, Rv-ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA), TNF-α (Fw-ACGGCATGGATCTCAAAGAC, Rv-AGATAGCAAATCGGCTGACG), IL10 (Fw-ACTACCATAGCCACAACGCA, Rv-TTTCTGTTTCCTACGGCGCT). Foi utilizado como controle endógeno o gene GAPDH (Fw-GGTTGTCTCCTGTCCTTC, Rv-CTGTTGCTGTAGCCATATTC). Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), de acordo com os requisitos para PCR em tempo real.

2.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. Para análise descritiva dos dados e testes de comparação de grupos independentes utilizou-se o software Sigma Plot 11.0. As variáveis apresentaram distribuição normal, sendo realizada análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey para variáveis múltiplas. O nível de significância adotado foi de 95% com valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mostrado na tabela 1, o extrato de folhas de *M. indica* e a mangiferina provocaram diminuição significativa dos teores de MDA, sendo o extrato o que apresentou melhor resultado com valores menores que a mangiferina. Não houve diferença na atividade da SOD apesar dos tratamentos apresentarem uma tendência em aumentá-la. Verificou-se que os animais que não receberam o tratamento apresentaram concentração de proteína total menor que os grupos do extrato e da mangiferina, o que pode ter mascarado a diminuição da atividade da SOD provocado pela dieta hiperlipídica, uma vez que o valor

desta é em relação à proteína total. A mangiferina e o extrato não alteraram o peso relativo do cérebro em comparação com a dieta hiperlipídica (tabela 1).

Tabela 1. Proteína total, concentração de malondialdeído, atividade da superóxido dismutase e peso relativo do cérebro (PRC) de ratos alimentados com dieta de cafeteria e submetidos a diferentes tratamentos por 8 dias.

| Grupos | PTN (mg/mL) | MDA (nMol/mg PTN) | SOD (U/mg PTN) | PRC |
|-----------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| DC | 2,32 ± 0,28 ^b | 4,66 ± 0,29 ^a | 25,48 ± 7,66 ^a | 1,72 ± 0,09 ^a |
| DC + EFM | 3,37 ± 0,37 ^a | 1,55 ± 0,32 ^c | 33,55 ± 7,98 ^a | 1,61 ± 0,10 ^a |
| DC + MANG | 3,53 ± 0,40 ^a | 2,74 ± 0,20 ^b | 35,38 ± 10,70 ^a | 1,64 ± 0,13 ^a |

Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05). PTN: Proteína total; MDA: Malondialdeído; SOD: atividade da superóxido dismutase; PRC = (peso do cérebro / peso corporal) x 100; DC: Dieta de cafeteria + DMSO; DC + EFM: DC + extrato da folha de manga (250 mg/kg); DC + MANG: DC + mangiferina (40 mg/kg).

Vários estudos relatam o potencial antioxidante tanto de extratos da *M. indica* quanto da mangiferina destacando seu efeito no aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase levando a diminuição da peroxidação lipídica. Ling e colaboradores (2009) demonstraram que o extrato etanólico da folha de manga apresentou maior capacidade contra a peroxidação lipídica comparado aos antioxidantes comerciais BHT (butylated hydroxytoluene) e o extrato de sementes de uva. Sanchez et al. (2000) verificou que o extrato da casca de *M. indica* (Vimang®) apresentou melhor efeito que a mangiferina na redução das espécies reativas de oxigênio em tecido hepático e cerebral de camundongos induzidos ao estresse. Dado este que corrobora com o presente estudo, onde o extrato da folha de manga promoveu maior efeito na diminuição dos níveis de MDA comparado à mangiferina.

Os tratamentos levaram a uma maior expressão do mRNA de HSP72 reforçando o efeito benéfico destes na prevenção da inflamação no tecido cerebral, uma vez que estas chaperonas exercem efeito citoprotetor. Novamente o extrato demonstrou exercer maior efeito que a mangiferina (figura 1).

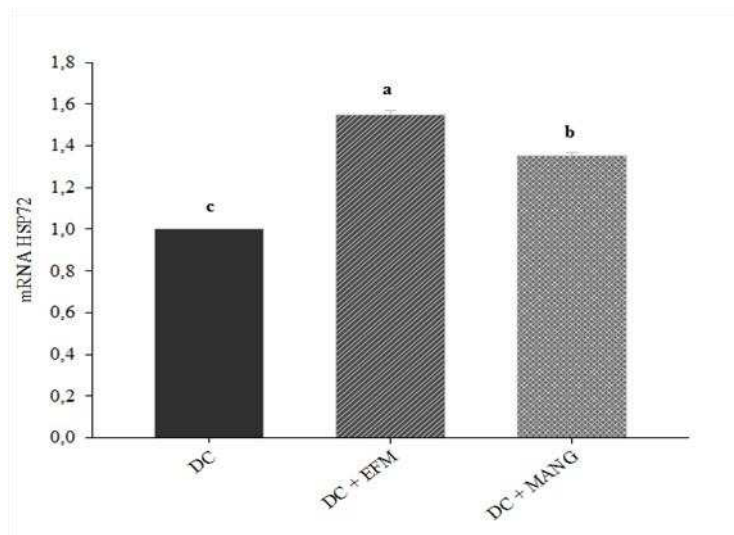


Figura 1 – Expressão gênica da HSP 72 no tecido cerebral de ratos submetidos a diferentes tratamentos, durante 8 dias. DC: Dieta de cafeteria + DMSO; DC + EFM: DC + extrato da folha de manga (250 mg/kg); DC + MANG: DC + mangiferina (40 mg/kg). Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Na literatura são encontrados vários estudos que relatam a importância das proteínas HSP70 na proteção do organismo em processos inflamatórios atuando na inibição de vias de sinalização intracelular, tais como a da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do NF- κ B (SINGLETON et al., 2005), reduzindo a ativação de sinais de tradução e expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β e o TNF- α . Chung e colaboradores (2008) demonstraram que a indução de super expressão de HSP70 impediu a ativação da c-jun N-terminal quinase (JNK) e o desenvolvimento de resistência à insulina em ratos alimentados com dieta rica em gordura. Ozcan et al (2006) também verificaram a ação destas chaperonas na redução da inflamação em modelos de ratos de diabetes mellitus tipo 2.

O extrato de folhas de *M. indica* e a mangiferina demonstraram agir negativamente sobre o fator de transcrição pró-inflamatório, NF κ B, diminuindo tanto a expressão gênica de p65 (figura 2a) quanto a sua atividade (figura 2b). Este dado ressalta o potencial destes tratamentos na proteção contra a inflamação, visto que eles demonstram bloquear uma das principais vias de sinalização pró-inflamatória do SNC.

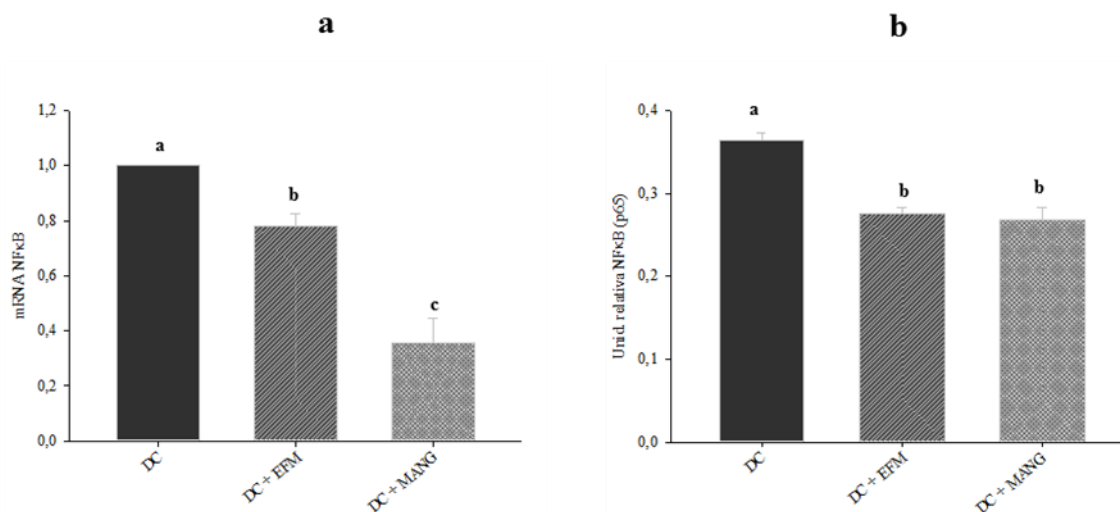


Figura 2. Expressão gênica e atividade de NFκB p65 no cérebro de ratos submetidos aos diferentes tratamentos. (a) Expressão de mRNA NFκB (p65) por qRT-PCR. (b) Atividade de NFκB p65 no extrato nuclear cerebral. DC: Dieta de cafeteria + DMSO; DC + EFM: DC + extrato da folha de manga (250 mg/kg); DC + MANG: DC + mangiferina (40 mg/kg). Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Leiro e colaboradores (2004a; 2004b) demonstraram, em estudos *in vitro*, que a mangiferina e o extrato aquoso da casca do caule de *M. indica* (Vimang®) apresentam efeitos anti-inflamatórios por promoverem redução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e do TNF- α , além de aumentar a expressão da citocina anti-inflamatória TNF- β (fator de necrose tumoral-beta).

Ambos os tratamentos demonstraram exercer atividade anti-inflamatória, onde o extrato diminuiu a expressão gênica do marcador pró-inflamatório TNF- α , porém não interferiu na expressão do mRNA da interleucina anti-inflamatória, IL-10. Já a mangiferina agiu de forma contrária, uma vez que não reduziu o mRNA de TNF- α , mas elevou extremamente o mRNA de IL-10 (figura 3). É de consenso na literatura que existe uma correlação entre a produção de IL-10 e TNF- α . Esta citocina anti-inflamatória age na modulação do TNF- α tanto a nível transcricional quanto pós transcricional (O'NEILL et al., 2001). A IL-10 exerce sua atividade anti-inflamatória limitando diretamente a produção de TNF- α a um nível pós-transcricional, como também através da redução da transcrição de IL-6 por meio do bloqueio do fator de transcrição I κ B (ROSSATO et al., 2012). No presente estudo a indução da expressão de IL-10 pela mangiferina apesar de não

ter diminuído a transcrição do TNF- α , essa modulação negativa pode ter ocorrido ao nível pós transcricional como relatado por O'NEILL et al. (2001) e ROSSATO et al. (2012).

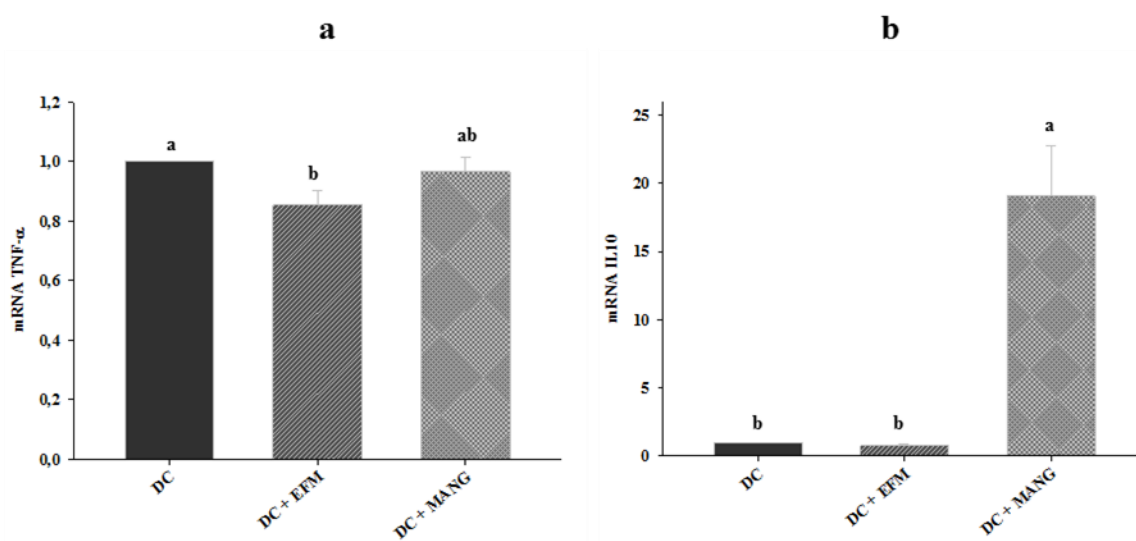


Figura 3. Expressão do gene pró-inflamatório, TNF- α , e do anti-inflamatório, IL-10, no cérebro de ratos submetidos aos diferentes tratamentos. (A) Expressão de mRNA de TNF- α e (B) Expressão de mRNA de IL-10 no cérebro de ratos submetidos a diferentes tratamentos. DC: Dieta de cafeteria + DMSO; DC + EFM: DC + extrato da folha de manga (250 mg/kg); DC + MANG: DC + mangiferina (40 mg/kg) Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os tratamentos não interferiram na expressão gênica dos receptores endocanabinóide CB₁, enquanto levou a um aumento expressivo do mRNA do PPAR- α .

Estudos tanto in vitro quanto in vivo demonstraram que a administração de agonistas de PPARs desempenham papel importante na neuroproteção podendo agir tanto na reversão dos danos cerebrais, por diminuir a peroxidação lipídica (COLLINO et al., 2006), quanto na prevenção destes por meio de pré-tratamento contra estresse oxidativo induzido por glutamato ou peróxido de hidrogênio (AOUN et al., 2003). Além disso, a ativação do PPAR- α atenua a expressão de diversas citocinas inflamatórias no tecido cerebral isquêmico devido ao bloqueio da via de sinalização da MAPK e do NF κ B (PEREIRA et al., 2006).

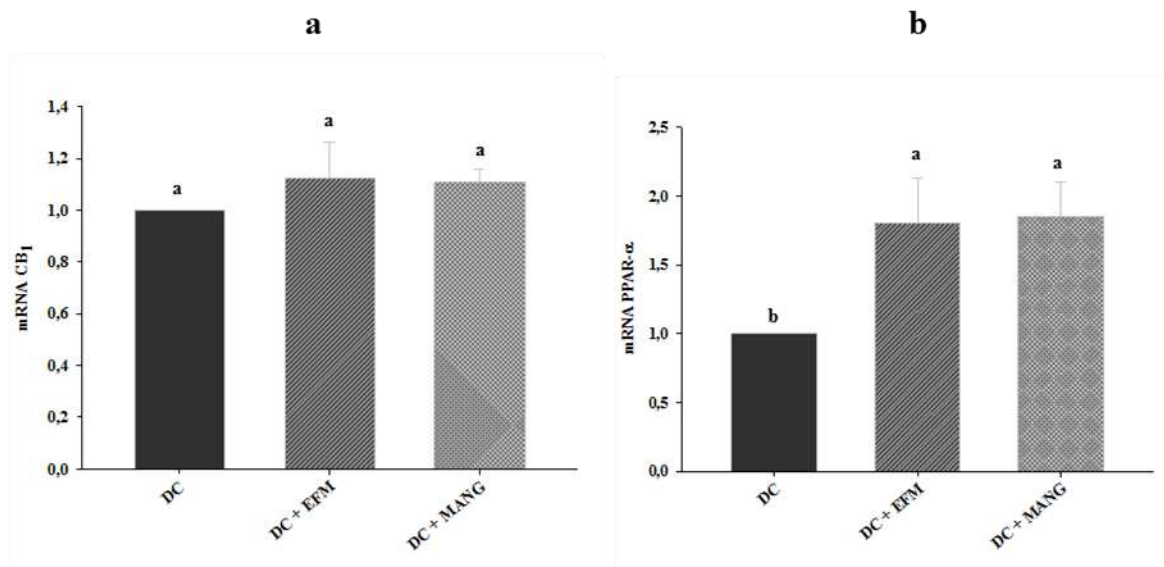


Figura 4. Expressão gênica do receptor endocanabinóide CB₁ e PPAR- α no cérebro de ratos submetidos a diferentes tratamentos. (A) Expressão de mRNA de CB₁ e (B) Expressão de mRNA de PPAR- α no cérebro de ratos submetidos a diferentes tratamentos. DC: Dieta de cafeteria + DMSO; DC + EFM: DC + extrato da folha de manga (250 mg/kg); DC + MANG: DC + mangiferina (40 mg/kg) Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Portanto, a indução da expressão destes receptores, pelo extrato de folha de manga e mangiferina, intensifica o potencial anti-inflamatório destes tratamentos.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que tanto o extrato etanólico da folha de *M. indica* quanto à mangiferina agiram de modo a prevenir possíveis danos ao tecido cerebral decorrentes da ingestão de dieta rica em gorduras saturadas, uma vez que reduziram a peroxidação lipídica e tenderam a aumentar a atividade da SOD, além de terem diminuído a expressão gênica e a atividade do NF κ B (p65) e aumentado a transcrição dos genes HSP72 e PPAR- α .

5. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOUN, P.; WATSON, D.G.; SIMPKINS, J.W. Neuroprotective effects of PPAR γ agonists against oxidative insults in HT-22 cells. **The European Journal of Pharmacology**. 3(472):65–71, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254, 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 52: 302-310, 1978.

CHUNG, J.; NGUYEN, A. K.; HENSTRIDGE, D. C.; HOLMES, A. G.; CHAN, M. H.; MESA, J. L.; LANCASTER, G. I.; SOUTHGATE, R. J.; BRUCE, C. R.; DUFFY, S. J.; HORVATH, I.; MESTRIL, R.; WATT, M. J.; HOOPE, P. L.; KINGWELL, B. A.; VIGH, L.; HEVENER, A.; FEBBRAIO, M. A. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 105:1739–1744, 2008.

COLLINO, M.; M. ARAGNO, M.; MASTROCOLA, R.; BENETTI, E.; GALLICCHIO, M.; DIANZANI, C.; DANNI, O.; THIEMERMANN, C.; FANTOZZI, R. Oxidative stress and inflammatory response evoked by transient cerebral ischemia/reperfusion: effects of the PPAR-alpha agonist WY14643. **Free Radical Biology and Medicine**. 41(4):579-589, 2006.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery** 3:771-84, 2004.

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**. 2:797–806, 2002.

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**. 50:143–149, 2004.

GRANIC, I.; DOLGA, A. M.; NIJHOLT, I. M.; VAN DIJK, G.; EISEL, U. L. Inflammation and NF-kappaB in Alzheimer's disease and diabetes. **Journal of Alzheimer's Disease**. 16: 809–821, 2009.

HOWLETT, A.C.; BREIVOGEL, C.S.; CHILDERS, S.R.; DEADWYLER, S.A., HAMPSON RE, PORRINO LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. **Neuropharmacol**. 47:345-58, 2004.

KOHN, H.I., LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and manadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 82: 292-300, 1944.

LEIBSON, C. L.; ROCCA, W. A.; HANSOM, V. A.; CHA, R.; KOKMEN, E.; O'BRIEN, C.; PALUMBO, P. J. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. **American Journal of Epidemiology**. 145: 301–308, 1997.

LEIRO, J.; ARRANZ, J. A.; YÁÑEZ, M.; UBEIRA, F.M.; SANMARTÍN, M.L.; ORALLO, F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. **International Immunopharmacology**. 4: 763–778, 2004a.

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**. 4: 991–1003, 2004b.

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

MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research** (CRC Press Boca Raton FL), p.243-247, 1985.

MARTÍNEZ, G.; GIULIANI, A.; LEÓN, O. S.; PÉREZ, G.; NÚÑEZ-SELLES, A. J. Effect of *Mangifera indica* L. Extract (QF808) on Protein and Hepatic Microsome Peroxidation. **Phytotherapy Research**. 15: 581–585, 2001.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D.E.; TSUKUMO, D.M.L.; ANHE, G.; AMARAL, M.E.; TAKAHASHI, H.K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H.C.; CARVALHEIRA, J.B.C.; BORDIN, S.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. **The Journal of Neuroscience**. 29(2):359–370, 2009.

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**. 176:165–173, 2002.

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**. 55: 351–358, 2007.

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**. 57:79–86, 2008.

O'NEILL, L.A.; SHEEDY, F.J.; MCCOY, C.E. MicroRNAs: The fine-tuners of Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology** 11(3):163–175, 2011.

OTT, A.; STOLK, R. P.; VAN HARSKAMP, F.; POLS, H. A.; HOFMAN, A.; BRETELER, M. M. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam Study. **Neurology**. 53:1937–1942, 1999.

ÖZCAN, U.; YILMAZ, E.; ÖZCAN, .L; FURUHASHI, M.; VAILLANCOURT, E.; SMITH, R. O.; GÖRGÜN, C. Z.; HOTAMIŞLIGIL, G. S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**. 313:1137–1140, 2006.

PEREIRA, M. P.; HURTADO, O.; CÁRDENAS, A.; BOSCA, L.; CASTILLO, J.; DÁVALOS, A.; VIVANCOS, J.; SERENA, J.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I.; MORO, M. A. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14- prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. 26(2): 218-29, 2006.

PYLES, L.A; STEJSKAL, E.J.; EINZIG, S. Spectrophotometric measurement of plasma 2-thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 202(19), 1993.

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

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZIO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. 21(3):133-149, 2005.

RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**. 110:620-626, 2008.

ROSSATO, M.; CURTALE, G.; TAMASSIAA, N.; CASTELLUCCIA, M.; MORIB, L.; GASPERINIA, S.; MARIOTTIA, B.; DE LUCAB, M.; MIROLOB, M.; CASSATELLAA, M.A.; LOCATIB, M.; BAZZONIA, F. IL-10–induced microRNA-187

negatively regulates TNF- α , IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v.109, n.45, 2012.

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**. 42:565–573, 2000.

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Shock**; 24:583-589, 2005.

SONNEN, J. A.; LARSON, E. B.; BRICKELL K.; CRANE, P. K.; WOLTJER, R.; MONTINE T. J.; CRAFT S. Different patterns of cerebral injury in dementia with or without diabetes. **Archives of Neurology**. 66(3):298–299., 2009

STAHEL, P. F.; SMITH, W. R.; BRUCHIS, J.; RABB, C. H. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: “Key” Regulators of Neuroinflammation after Traumatic Brain Injury. **PPAR Research**, 2008.

TANAKA, T.; SHIBAZAKI, A.; ONO, R.; KAISHO, T. HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor κ B to inhibit inflammatory signaling. **Science Signaling**. 7(119), 2014.

4. CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho com a proposta de investigar o efeito da mangiferina e do extrato de folhas de manga (*Mangifera indica* L. variedade Ubá) na modulação gênica da inflamação do SNC e do fígado de animais alimentados com dieta de cafeteria verificou que estes tratamentos apresentaram grande potencial anti-inflamatório e antioxidante em ambos os tecidos. O estudo com o objetivo de avaliar o efeito protetivo e reversivo do extrato e da mangiferina contra alterações decorrentes do consumo da dieta de cafeteria, verificaram que:

Fígado: Ação protetora

- **Extrato de folha de manga:** apresentou atividade antioxidante com aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) e diminuição do peso relativo do fígado (ISH); e atividade anti-inflamatória com diminuição da atividade de NFκB (p65) e tendência em reduzir a concentração de TNF-α, além de ter aumentado a concentração de IL-10.
- **Mangiferina:** apresentou atividade antioxidante com aumento da atividade SOD e proteção contra estresse oxidativo com aumento da expressão gênica da proteína HSP72. Ação anti-inflamatória, com diminuição da atividade de NFκB (p65) e aumento da concentração de IL-10, além de ter demonstrado tendência em reduzir a expressão e concentração de TNF-α. Esta xantona interferiu na expressão gênica dos receptores canabinóides CB₁ e do PPAR-α, levando ao aumento da transcrição destes.

Fígado: Ação reversiva

- **Extrato de folha de manga:** apresentou efeitos contra o estresse oxidativo com diminuição da peroxidação lipídica e do IHS, e aumentou atividade de SOD e expressão gênica de HSP72. O extrato demonstrou potencial anti-inflamatório com redução da expressão dos genes NFκB e TNF-α. Além disso, interferiu na transcrição dos receptores PPAR-α e CB₁ promovendo, respectivamente, aumento e redução destes.
- **Mangiferina:** aumentou a atividade da SOD e diminuiu o IHS. Esta xantona desempenhou atividade anti-inflamatória com diminuição da expressão e da concentração de TNF-α e redução da atividade e do mRNA de NFκB (p65). A mangiferina, assim como o extrato, alterou a expressão gênica dos receptores CB₁ e PPAR-α com redução e aumento destes, respectivamente.

- **Mangiferina + GW9662:** a administração do antagonista do receptor PPAR levou a uma diminuição da atividade da SOD, ao aumento da atividade de NFκB (p65) e da concentração e expressão gênica de TNF-α, e a redução do mRNA de PPAR-α. Diante disto, acredita-se que a mangiferina possa ser um agonista do receptor PPAR, visto que na presença do antagonista os efeitos exercidos pela mangiferina foram interrompidos.

- **Mangiferina + Rimonabanto:** a presença do antagonista do receptor CB₁ levou a diminuição do IHS, aumento da atividade de NFκB (p65) e diminuição da expressão gênica do receptor PPAR-α.

- **Mangiferina + GW9662 + Rimonabanto:** a administração de ambos os antagonistas levou a diminuição de IHS, aumento da transcrição de NFκB, TNF-α, PPAR e HSP72 e da atividade de NFκB (p65). Estes resultados são semelhantes ao desempenhado pela administração isolada do GW9662 favorecendo a idéia de que a ação da mangiferina envolve o receptor PPAR.

Cérebro: Ação protetora

- **Extrato de folha de manga:** reduziu a peroxidação lipídica, aumentou a expressão gênica de HSP72 e apresentou tendência em aumentar a SOD, demonstrando o efeito benéfico do extrato na prevenção do estresse oxidativo. Além disso, este agiu sobre genes inflamatórios com redução da transcrição de NFκB e TNF-α e diminuiu a atividade de NFκB (p65). A administração do extrato aumentou a expressão gênica do receptor PPAR-α favorecendo sua ação anti-inflamatória, visto que a ativação destes receptores inibi a via de sinalização de NFκB.

- **Mangiferina:** verificou-se que este composto bioativo da *Mangifera indica* apresentou os mesmos efeitos que o extrato no cérebro dos animais, com exceção da diminuição da expressão gênica de TNF-α podendo indicar que o extrato foi mais eficiente no controle da inflamação.

Cérebro: Ação reversiva

- **Extrato de folha de manga:** o tratamento com o extrato promoveu atividade antioxidante, com aumento da atividade da SOD, aumento da HSP72 e diminuição da peroxidação lipídica. Além disso, exerceu atividade anti-inflamatória com diminuição da transcrição do gene TNF-α. O extrato interferiu na expressão dos receptores CB₁ e PPAR-α, com diminuição e aumento destes, respectivamente, reforçando a ação anti-inflamatória do extrato, visto que estes receptores estão diretamente ligados a sinalização de NFκB.

- **Mangiferina:** a ação desta xantona foi semelhante ao verificado com a administração do extrato. No entanto, esta não interferiu na expressão dos receptores CB₁ e PPAR- α .
- **Mangiferina + GW9662:** a administração do antagonista do receptor PPAR- α , reverteu a ação da mangiferina, com aumento da expressão gênica e concentração de TNF- α , além de apresentar tendência em aumentar a peroxidação lipídica. Este dado reforça novamente que esta xantona possa exercer sua ação anti-inflamatória via sinalização de PPAR.
- **Mangiferina + Rimonabanto:** a administração do antagonista do receptor CB₁ promoveu diminuição da peroxidação lipídica e aumento da atividade da SOD e do mRNA da HSP72, desempenhando, portanto, atividade antioxidante. Com relação aos genes inflamatórios apesar de ter aumentado a expressão do mRNA de TNF- α e de NF κ B promoveu a diminuição da atividade de NF κ B (p65). Além disso, demonstrou exercer efeitos sobre a expressão dos genes CB₁ e PPAR- α , com aumento da transcrição destes receptores.
- **Mangiferina + GW9662 + Rimonabanto:** a administração de ambos os antagonistas interferiu de forma semelhante de quando estes foram oferecidos de maneira isolada levando ao aumento da expressão gênica de TNF- α e NF κ B.

O presente estudo demonstrou que a ingestão da dieta de cafeteria, por período curto de tempo, exerceu efeitos pró-oxidativos e inflamatórios no fígado e cérebro de ratos, sendo estes revertidos pela administração do extrato da folha de *Mangifera indica* L, variedade Ubá, e da mangiferina. Além disso, o estudo demonstrou que a ação anti-inflamatória da mangiferina ocorre via sinalização do receptor PPAR, visto que o bloqueio destes reverteu a ação desta xantona.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADERIBIGBE, A. O.; EMUDIANUGHE, T. S.; LAWAL, B. A. Antihyperglycemic effect of *Mangifera indica* in rat. **Phytotherapy Research**. 13:504–507, 1999.

ALVES, N.E.G.; VALDÉS, S.T.; SILVEIRA, C.M.M.; MARTINO, H.S.D.; MILAGRO, F.I.; MORENO-ALIAGA, M.J.; RIBEIRO, S.M.R. Studies on Mechanistic Role of Natural Bioactive Compounds in the Management of Obesity An Overview. **The Open Nutraceuticals Journal**. 5:193-206, 2012.

ALEMANY, M. Relationship between energy dense diets and white adipose tissue inflammation in metabolic syndrome. **Nutrition Research**. 33:1-11, 2013.

AOUN, P.; WATSON, D.G.; SIMPKINS, J.W. Neuroprotective effects of PPAR γ agonists against oxidative insults in HT-22 cells. **The European Journal of Pharmacology**. 3(472):65–71, 2003.

ATALAY, M.; OKSALA, N. K. J.; LAAKSONEN, D. E.; KHANNA. S.; NAKAO, C.; LAPPALAINEN, J.; ROY, S.; HÄNNINEN, O.; SEM, C. K. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. **Journal of Applied Physiology**. 97:605–611, 2004.

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**. 45: 54–58, 2007.

BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; WISNIEWSKA, A.J.; MARCINIAK, A. Resistance to acute NO-mimetic and EDHF-mimetic effects of leptin in the metabolic syndrome. **Life Sciences**. 85:557-567, 2009.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual Review of Medicine**. 53:409-35, 2002.

BOTTING, K. J.; YOUNG, M. M.; PEARSON, A. E.; HARRIS, P. J.; FERGUSON, L. R. Antimutagens in food plants eaten by Polynesians: Micronutrients, phytochemicals and protection against bacterial mutagenicity of the heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo(4, 5-f) quinoline. **Food and Chemical Toxicology**. 37:95–103, 1999.

BRAISSANT, O.; FOUFELLE, F.; SCOTTO, C.; WAHLI, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR): tissue distribution of PPAR α , δ and γ the adult rat. **Endocrinology**. 137:354-66, 1996.

BRUCE, C. R.; CAREY, A. L.; HAWLEY, J. A.; FEBBRAIO, M. A. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. **Diabetes**. 52:2338–2345, 2003.

BRUNETTI, L.; LEONE, S.; ORLANDO, G.; RECINELLA, L.; FERRANTE, C.; CHIAVAROLI, A.; NISIO, C.D.; MICHELE, P.; VACCA, M. Effects of obestatin on feeding and body weight after standard or cafeteria diet in the rat. **Peptides**. 30:1323-1327, 2009.

BURG, M. B.; FERRARIS, J. D.; DMITRIEVA, N. I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiological Research**. 87:1441-74, 2007.

BURNEIKO RCM, DINIZ YS, GALHARDI CM, RODRIGUES HG, EBAID GMX, FAINE LA, et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chemistry and Toxicology**. 44:1167–1172, 2006.

CAMPOS-ESPARZA, M.R.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V.; MATUTE, C. Food and Chemical Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. **Cell Calcium**. 45: 358–368, 2009.

CHRISTIE, M. J.; Vaughan, C. W. Neurobiology: Cannabinoids act backwards. **Nature**. 410:527-530, 2001.

CHU, B.; ZHONG, R.; SONCIN, F.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases C alpha and C zeta. **Journal of Biological Chemistry**. 273:18640–18646, 1998.

CHUNG, J.; NGUYEN, A. K.; HENSTRIDGE, D. C.; HOLMES, A. G.; CHAN, M. H.; MESA, J. L.; LANCASTER, G. I.; SOUTHGATE, R. J.; BRUCE, C. R.; DUFFY, S. J.; HORVATH, I.; MESTRIL, R.; WATT, M. J.; HOOPE, P. L.; KINGWELL, B. A.; VIGH, L.; HEVENER, A.; FEBBRAIO, M. A. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 105:1739–1744, 2008.

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

COLLINO, M.; M. ARAGNO, M.; MASTROCOLA, R.; BENETTI, E.; GALLICCHIO, M.; DIANZANI, C.; DANNI, O.; THIEMERMANN, C.; FANTOZZI, R. Oxidative stress and inflammatory response evoked by transient cerebral ischemia/reperfusion: effects of the PPAR-alpha agonist WY14643. **Free Radical Biology and Medicine**. 41(4):579-589, 2006.

CRISTIANO, L.; BERNARDO, A.; CERU, M. P. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. **Journal Neurocytology**. 30(8): 671-683, 2001.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Revista Brasileira de Clinica Medica**. 9(2):138-45, 2011.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**. 25 (4), 2004.

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**. 28, 596–600, 2005.

DEMUTH, D.G.; MOLLEMAN, A. Cannabinoid signalling. **Life Science**. 78: 549–563, 2006.

DESPRES, J.P.; GOLAY, A.; SJOSTROM, L. Rimonabant in obesity-lipids study group: effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. **New England Journal of Medicine**. 353, (2121), 2005.

DEVARAJ, S.; ROSENSON, R. S.; JIALAL, I. Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. 33 (431), 2004.

ECHARRI, N.P.; MATUTE, P.P.; GÓMEZ, B.M.; MARTI, A.; MARTÍNEZ, J.A.; ALIAGA, M.J.M. Down-regulation in muscle and liver lipogenic genes: EPA ethyl ester treatment in lean and overweight (high-fat-fed) rats. **Journal of Nutrition Biochemistry**. 20:705-714, 2009.

ESPOSITO, K. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in metabolic syndrome: a randomized trial. **Journal of the American Medical Association**. 292: 1440, 2004.

ESPOSITO, K. Effect of rosiglitazone on endothelial function and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**. 29: 1071, 2006.

FARAONI, A. S., RAMOS, A. M., STRINGHETA, P. C. Caracterização da manga orgânica cultivar Ubá. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. 11 (1):9-14, 2009.

FILHO, W. P. C.; ALVES, H. S.; MAZZEII, A. R. Mercado de manga no Brasil: contexto mundial, variedades e estacionalidade. **Informações Econômicas**, SP, 34 (5), 2004.

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

FRANCISCHETTI, E. M.; ABREU, V. G. O sistema endocanabinóide: Novas perspectivas no controle de fatores de risco cardiometabólico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 87: 548-558, 2006.

FUNG, A.; VIZCAYCHIPI, M.; LLOYD, D.; WAN, Y.; MA, D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: Mechanistic prospects. **Brain Research**. 1446:144-55, 2012.

GABAI, V. L.; SHERMAN, M. Y. Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**. 92:1743-8, 2002.

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**. 50:143–149, 2004.

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

GOTTLIEB, M.; LEAL-CAMPANARIO, R.; CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SANCHEZ-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**. 23:374–386, 2006.

GUERRINI, L.; BLASI, F. E.; DENIS-DONINI, S. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. **Proceeding of the National Academy of Science of United States of America**. 92:9077–9081, 1995.

GUHA, S.; GHOSAL, S.; CHATTOPADHYAY, U. Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. **Chemotherapy**. 42: 443–451, 1996.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Química Nova**. 29:318-325, 2006.

HOOPER, P. L.; HOOPER, P. L. Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes. **Cell Stress and Chaperones**. 14:113–115, 2009.

HOTAMIŞLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**; 444:860–867, 2006.

HOWLETT, A.C.; MUKHOPADHYAY, S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. **Chemistry and Physics of Lipids**. 108:53-70, 2000.

ICHIKI, H.; MIURA, T.; KUBO, M.; ISHIHARA, E.; KOMATSU, Y.; TANIGAWA, K.; OKADA, M. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 21, 1389–1390, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 de fevereiro, 2015.

JANKE, J.; ENGELI, S.; GORZELNIAK, K.; LUFT, F.C.; SHARMA, A.M. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. **Obesity**. 10: 1-5, 2002.

JASINSKA, M.; OWCZAREK, J.; ORSZULAK-MICHALAK, D. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. **Pharmacological Reports**. 59:483–499, 2007.

JOY, J. E.; WATSON, S. J.; BENSON, J.A. Marijuana and medicine: assessing the science base. **National Academy Press**. New York, 1999.

KAVANAGH, K.; NELSON, C.; JENKINS, K. A.; ZHANG, L.; FLYNN, D. M.; BUTLER, P. C.; WAGNER, J. D. Decreased chaperone protein HSP70 in diabetic monkeys results from hyperglycemia-associated impairment of heat shock factor-1 induction and activation. **Diabetes**. 57, 2008.

KERN, P.A.; RANGANAYHAN, S.; LI, C.; WOOD, L.; RANGANATHAN, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolism**. 280, 745, 2001.

KRETSCHMER BD, SCHELLING P, BEIER N, LIEBSCHER C, TREUTEL S, KRUGER N, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. **Life Science**. 76:1553–1573, 2005.

KUROYANAGI, K.; KANG, M.-S.; GOTO, T. Citrus auraptene acts as an agonist for PPARs and enhances adiponectin production and MCP-1 reduction in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 366:219–225, 2008.

LARSEN, T. M.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. PPAR γ agonists in the treatment of type II diabetes is increased fatness commensurate with long-term efficacy? **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**. 27:147-61, 2003.

LEIRO, J.; ARRANZ, J. A.; YÁÑEZ, M.; UBEIRA, F.M.; SANMARTÍN, M.L.; ORALLO, F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. **International Immunopharmacology**. 4: 763–778, 2004a.

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**. 4: 991–1003, 2004b.

LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signaling. **Biochemical Society Transactions**. 31(1152), 2003.

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

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal Ethnopharmacology**. 78:133–137, 2001.

MARTÍNEZ, G.; GIULIANI, A.; LEÓN, O. S.; PÉREZ, G.; NÚÑEZ-SELLES, A. J. Effect of *Mangifera indica* L. Extract (QF808) on Protein and Hepatic Microsome Peroxidation. **Phytotherapy Research**. 15: 581–585, 2001.

MARZO, V.; MATIAS, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. **Nature Neuroscience**. 8:585-859, 2005.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 62:670-684, 2005.

MATOS, A. F. G.; GUEDES, E. P.; SOUZA, L. L.; VALÉRIO, C. M. O sistema endocanabinóide: Novo paradigma no tratamento da Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 50:390-399, 2006.

MCALLISTER, S. D.; GLASS, M. CB1 and CB2 receptors mediated signalling: a focus on endocannabinoids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. 66:161-171, 2002.

MILAGRO, F. I.; CAMPIO'N, J.; MARTINEZ, J. A. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. **Obesity**. 14:1118–1123, 2006.

MORENO, S.; FARIOLI-VECCHIOLI, S.; CERU, M. P. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. **Neuroscience**. 123(1): 131-145, 2004.

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**. 176, 165–173, 2002.

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

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**. 55: 351–358, 2007.

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 *Magnifera indica* and *Azadirachta indica*. **African Journal of Biotechnology**. 8:2968-2972, 2009.

O’SULLIVAN, S. E.; KENDALL, D.A. Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: Potential for modulation of inflammatory disease. **Immunobiology**. 215 (8):611-616, 2010.

ÖZCAN, U.; YILMAZ, E.; ÖZCAN, .L; FURUHASHI, M.; VAILLANCOURT, E.; SMITH, R. O.; GÖRGÜN, C. Z.; HOTAMIŞLIGIL, G. S. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. **Science**. 313:1137–1140, 2006.

PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**. 58:389–462, 2006.

PACHER, P.; MACKIE, K. Interplay of cannabinoid 2 (CB2) receptors with nitric oxide synthases, oxidative and nitrative stress, and cell death during remote neurodegeneration. **Journal of Molecular Medicine**. 90(4):347-351, 2012.

PACKER, L.; SIES, H. Oxidative stress and inflammatory mechanisms in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome. CRC Press; 1^a ed 344p, 2007.

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**. 57:79–86, 2008.

PARDO-ANDREU, G.L.; DELGADO, R.; VELHO, J.A.; CURTI, C.; VERCESI, A.E. Mangiferin, a natural occurring glycosyl xantone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 439:184–193, 2005.

PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T.; CHIN, S. T.; MALLAK, A. C.; LOUNDS-SINGLETON, A.; PETTIT-MOORE, J. Neoplastic transformation of BALB/3T3 cells and cell cycle of HL-60 cells are inhibited by mango (Mangifera indica L.) juice and mango juice extracts. **Journal of Nutrition**. 136:1300–1304, 2006.

PEREIRA, M. P.; HURTADO, O.; CÁRDENAS, A.; BOSCA, L.; CASTILLO, J.; DÁVALOS, A.; VIVANCOS, J.; SERENA, J.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I.; MORO, M. A. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta^{12,14}- prostaglandin J₂ cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. 26(2): 218-29, 2006.

PETROCELLIS, L.; CASCIO, M. G.; MARZO, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. **British Journal of Pharmacology**. 141:765-774, 2004.

POYNTER, M. E.; DAYNES R. A. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. **Journal of Biological Chemistry**. 273(49): 32833-32841, 1998.

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**. 11(107):126–133, 2006.

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**. 23: 756–760, 2009.

PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E. RIFAI, N.; BURING, J. E.; RIDKER, P. M. C-reactive protein, interleukin-6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **Journal of the American Medical Association**. 286:327, 2001.

PRASAD, S.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Hepatoprotective effects of lupeol and mango pulp extract of carcinogen induced alteration in Swiss albino mice. **Molecular Nutrition & Food Research**. 51(3):352–359, 2007.

RADAK, Z.; CHUNG, H. Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radical Biology & Medicine**. 44:153–159, 2008.

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

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ J. H.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CAMPOS, F. M.; SANT’ANA, H. M. P. Antioxidant in mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Plant Foods for Human Nutrition**. 62:13-17, 2007.

RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**. 110:620-626, 2008.

ROCHE, H. M. Dietary lipids and gene expression. **Biochemical Society Transactions**. 32(999), 2004.

ROSS, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **American Heart Journal**. 138: S419–S420, 1999.

RUIZ, A.G.; MIGUEL, C.; CAMPIÓN, J.; MARTÍNEZ, J.A.; MILAGRO, F.I. Time-dependent regulation of muscle caveolin activation and insulin signalling in response to high-fat diet. **FEBS Letters**. 583:3259-3264, 2009.

SANGEETHA, K. N.; SUJATHA, S.; MUTHUSAMY, V. S.; ANAND, S.; NITHYA, N.; VELMURUGAN, D.; BALAKRISHNAN, A.; LAKSHMI, B. S. 3 β -taraxerol of *Mangifera indica*, a PI3K dependent dual activator of glucose transport and glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1800:359-366, 2010.

SALAM, N.K.; HUANG, T.H.-W.; KOTA, B.P.; KIM, M.S.; LI, Y.; HIBBS, D.E. Novel PPAR-gamma agonists identified from a natural product library: a virtual screening, induced-fit docking and biological assay study. **Chemical Biology & Drug Design**. 71:57–70, 2008.

SARNE, Y.; KEREN, O. Are cannabinoid drugs neurotoxic or neuroprotective. **Medical Hypotheses**. 63:187-192, 2004.

SCHIFFRIN, E. L. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. 288(3):H1037-43, 2005.

SCHUPP, M.; CURTIN, J.C.; KIM, R.J.; BILLIN, A.N.; LAZAR, M.A. A widely used retinoic acid receptor antagonist induces peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. **Molecular Pharmacology**. 71:1251–1257, 2007.

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

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**. 14:1098–1110, 2009.

SHARMA, L. D.; BAHGA, H. S.; SRIVASTAVA, P. S. In vitro anthelmintic screening of indigenous medicinal plants against *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) Cobbold, 1898 of sheep and goats. **Indian Journal of Animal Research**. 5:33–38, 1971.

SHARMA, S. R.; DWIVEDI, S. K.; SWARUP, D. Hypoglycemic potential of *Mangifera indica* leaves in rats. **International Journal of Pharmacology**. 35:130–133, 1997.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**. 116:1793–1801, 2006.

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

SINGLETON, K. D.; BECKEY, V. E.; WISCHMEYER, P. E. Glutamine prevents activation of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Schock**; 24:583-589, 2005.

SIPE, J. C.; WAALEN, J.; GERBER, A.; BEUTLER, E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). **International Journal of Obesity**. 29:755-759, 2005.

SMITH, S. R.; TERMINELLI, C.; DENHARDT, G. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 293(1):136-50, 2000.

SMITH, S. R.; DENHARDT, G.; TERMINELLI, C. The anti-inflammatory activities of cannabinoid receptor ligands in mouse peritonitis models. **European Journal of Pharmacology**. 432(1):107-119, 2001.

STAHEL, P. F.; SMITH, W. R.; BRUCHIS, J.; RABB, C. H. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: “Key” Regulators of Neuroinflammation after Traumatic Brain Injury. **PPAR Research**, 2008.

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

TANASESCU, R.; CONSTANTINESCU, C.R. Cannabinoids and the immune system: an overview. **Immunobiology**. **215**: 588-597, 2010.

TAWFIK, V. L.; WHITE, R. E.; GIFFARD, R. Glial Cells, Inflammation and Heat Shock Proteins in Cerebral Ischemia. **In: Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke**. InTech, p.177-192, 2012.

THIRUMANGALAKUDI, L.; PRAKASAM, A.; ZHANG, R.; BIMONTE-NELSON, H.; SAMBAMURTI, K.; KINDY, M. S.; BHAT, N. R. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. **Journal of Neurochemistry**. 106:475–485, 2008.

TOYAMA, T.; NAKAMURA, H.; HARANO, Y.; YAMACHI, N.; MORITA, A.; KIRISHIMA, T.; MINAMI, M.; ITOH, Y.; OKANOUE, T. PPAR α ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 324(2): 697-704, 2004.

TRIPATHY, D.; MOHANTY, P.; DHINDSA, S. et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. **Diabetes**. 52(2882), 2003.

UPHAM, B.L.; RUMMEL, A.M.; CARBONE, J.M.; TROSKO, J.E.; OUYANG, Y.; CRAWFORD, R.B. Cannabinoids inhibit gap junctional intercellular communication and activate ERK in a rat liver epithelial cell line. **International journal Cancer**. 104: 12-18, 2003.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; NICHOLS, A.; ROSS J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial

role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal Clinical Investigation**. 112(12): 1821-1830, 2003.

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

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM M.; LEIBEL, R. L.; JR FERRANTE, A. W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal Clinical Investigation**. 112(12):1792-1808, 2003.

WISCHMEYER, P. E. Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition**; 18:225-228, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fact sheet: obesity and overweight. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/>. Acesso em: 24 Fevereiro, 2015.