

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Efeitos da ingestão dos sucos de laranja das variedades Pera e
Moro sobre o proteoma de camundongos submetidos à dieta
hiperlipídica e suplementada com leite condensado

Manuela de Souza Brito Siqueira

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Efeitos da ingestão dos sucos de laranja das variedades Pera e
Moro sobre o proteoma de camundongos submetidos à dieta
hiperlipídica e suplementada com leite condensado

Manuela de Souza Brito Siqueira

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo

2022

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S774e Siqueira, Manuela de Souza Brito
Efeitos da ingestão dos sucos de laranja das variedades Pera e Moro sobre o proteoma de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e suplementada com leite condensado / Manuela de Souza Brito Siqueira. - São Paulo, 2022.
71 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto

1. suco de laranja. 2. resistência à insulina. 3. metabolismo de lipídeos. 4. proteoma. 5. tecido hepático. I. T. II. Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto, orientador.

Manuela de Souza Brito Siqueira

Efeitos da ingestão dos sucos de laranja das variedades Pera e Moro sobre o proteoma de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e suplementada com leite condensado

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr.
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2022.

Dedicatória

A Deus, por colocar pessoas admiráveis no meu caminho
Ao meu filho Felipe que me ensinou sobre amor e empatia
Aos meus filhos Beatriz e Rafael, e meu marido William
pelo amor, paciência e incentivo
Aos meus pais Ilva e Manoel, sempre presentes

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF, por oferecer os recursos necessários para a execução do projeto e possuir um corpo docente de excelência para meu crescimento acadêmico.

À minha orientadora, Prof. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto, que foi a pessoa mais importante para a conclusão deste trabalho. Serei eternamente grata pelo aprendizado, por sua dedicação e amor à pesquisa, e igualmente importante, por sua generosidade, incentivo e disponibilidade durante essa longa jornada.

Ao professor Wiliam Tadeu Lara Festuccia e sua equipe do Laboratório de Fisiologia Molecular e Metabolismo, que contribuíram com conhecimento sobre o tema trabalhado e com o ensaio de proteômica.

Ao professor Thomas Prates Ong e aos alunos do seu laboratório por compartilharem experiências sobre ensaio animal utilizando dieta hiperlipídica suplementada com leite condensado.

À equipe do Biotério da FCF-USP, em especial a Flávia Ong, pelo comprometimento, treinamentos e sugestões durante o ensaio animal.

À técnica de laboratório Lucia Helena Justino por compartilhar seus conhecimentos e pela importante ajuda com a autanásia dos animais.

Aos colegas de pós-graduação pelas trocas de experiências, pela disponibilidade de participarem da eutanásia dos animais e pelo ambiente de trabalho agradável.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SIQUEIRA, MSB. **Efeitos da ingestão dos sucos de laranja das variedades Pera e Moro sobre o proteoma de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica e suplementada com leite condensado.** 71f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2022.

RESUMO

Diversos estudos apontam que o consumo de laranja, por ser fonte de compostos bioativos, pode exercer importante papel na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da ingestão de suco de laranja Moro e suco de laranja Pera sobre o perfil proteômico do fígado de camundongos submetidos ao modelo de resistência à insulina induzida por obesidade. Ambos os sucos foram extraídos de laranjas do mesmo lote e fornecidos pela Fundecitrus, Araraquara - SP. A hesperidina e a narirutina foram identificados como compostos majoritários em ambos os sucos e a presença predominante da antocianina cianidina 3-glicosídeo no suco de laranja Moro. Camundongos C57BL/6 foram divididos em quatro grupos que, ao longo de 15 semanas, foram alimentados *ad libitum* com a dieta controle AIN 93-G ou dieta hiperlipídica e leite condensado. Concomitantemente, dois grupos receberam suco de laranja Moro ou Pera *ad libitum*, em substituição à água, no bebedouro. O ganho de peso, consumo de ração, água e sucos foram acompanhados durante todo o protocolo. O ipITT e o ipGTT foram realizados nas duas semanas que antecederam à eutanásia. A ração hiperlipídica somada ao leite condensado reduziu a sensibilidade à insulina e o suco de laranja Pera aumentou a sensibilidade a insulina e melhorou a tolerância à glicose, efeitos que não foram observados no suco de laranja Moro. Tanto o suco Pera e Moro reduziram o acúmulo de gordura hepática. No estudo proteômico do fígado, o suco de laranja Pera e Moro modularam *down-regulated* várias enzimas do metabolismo de carboidratos (via glicolítica e do piruvato) e do metabolismo de lipídeos, com redução da lipogênese *de novo*, reduzindo o acúmulo de gordura hepática. Assim, o suco de laranja Pera e Moro apresentaram ação benéfica sobre a resistência à insulina induzida pela obesidade e distúrbios metabólicos associados.

Palavras-chave: suco de laranja, obesidade, resistência à insulina, metabolismo de lipídeos, proteoma, tecido hepático.

SIQUEIRA, MSB. **Impact of orange juices (Var. Pera and Moro) on the proteome of mice liver feed with high fat high carbohydrate diet** . 71f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2022.

ABSTRACT

Orange juice is rich in bioactive compounds and their consumption has been associated with reduction of several chronic diseases. We investigated the potential for the orange juices, variety Pera (PO) and Moro (MO), to attenuate obesity associated metabolic disorders and the effect on the liver proteome. Three groups of mice (C57Bl/6) were fed with a high-fat diet and high carbohydrate (condensed milk) diet (HLLC) for 13 weeks. Concomitantly to the diets, two groups received Pera and Moro orange juices (HLLC-PO and HLLC-MO, respectively) in replacement of water. The flavonoids hesperitin and narirutin were the main flavanones in both juices. In addition, cyanidin 3-glucoside was the major anthocyanin in Moro orange juice, responsible for the purple color of the fruit. The consumption of high-fat and high carbohydrate diet promoted body weight gain, insulin intolerance and glucose, observed in ipITT and ipGTT, respectively, and insulin resistance. Orange juice cv. Pera attenuated metabolic parameters such as glycemic response and insulin sensitivity. In hepatic tissue, both orange juices were able to reduce triglyceride accumulation. The proteomic analysis identified 1,506 proteins. In HLLC-PO group 48 and 8 proteins were found down- and up-regulated, respectively. In HLLC-MO group 80 and 4 proteins were found down- and up-regulated, respectively. The pathway analysis suggested stimulation of peroxisomal β -oxidation, and inhibition of *de novo* lipogenesis (Acetyl-CoA carboxylase e Fatty acid synthase down-regulation) and glycolysis and pyruvate pathways in both orange juices treated groups. Our results indicate that both orange juices induced metabolic hepatic adjustment, mitigating the harmful effects of a high-fat and high-carbohydrate diet, improving the insulin resistance and lipid hepatic accumulation, with significant modification on hepatic proteome.

Keywords: Orange juice, obesity, insulin resistance, lipid metabolism, proteome, liver tissue

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
<i>CITRUS SINENSIS</i>	13
<i>RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA POR OBESIDADE</i>	15
<i>AÇÃO BIOLÓGICA DA LARANJA</i>	18
2. OBJETIVO	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 <i>AMOSTRA</i>	22
3.2 <i>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUCOS DE LARANJA</i>	23
3.2.1 <i>Preparo das Amostras</i>	23
3.2.2 <i>Identificação e Quantificação de Flavonoides</i>	23
3.2.3 <i>Identificação e quantificação de ácidos orgânicos</i>	24
3.2.4 <i>Quantificação de açúcares</i>	24
3.3 <i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</i>	24
3.3.1 <i>Autorização Ética</i>	24
3.3.2 <i>Animais</i>	25
3.3.3 <i>Grupos experimentais</i>	25
3.4 <i>TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)</i>	27
3.5 <i>OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO</i>	28
3.6 <i>ANÁLISES DOS PARÂMETROS SÉRICOS</i>	29
3.7 <i>TRIGLICERÍDEOS NO TECIDO HEPÁTICO</i>	29
3.8 <i>ANÁLISE PROTEÔMICA NO TECIDO HEPÁTICO</i>	29
3.8.1 <i>Preparo das amostras</i>	29
3.8.2 <i>Condições LC-qToF-MS/MS</i>	30
3.8.3 <i>Identificação e quantificação das proteínas</i>	31
3.8.4 <i>Análise bioinformática dos dados proteômicos</i>	31
3.9 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	32
4. RESULTADOS	33
4.1 <i>COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DE FLAVONOIDES DO SUCO DE LARANJA PERA E MORO</i>	33
4.2 <i>PESO CORPORAL, PESO DOS COXINS ADIPOSOS, INGESTÃO ALIMENTAR E EFICIÊNCIA ENERGÉTICA</i>	35
4.3 <i>EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS</i>	37
4.4 <i>EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO SOBRE A homeostase da glicose</i>	38
4.5 <i>EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO SOBRE O PESO DO FÍGADO E CONTEÚDO LIPÍDICO HEPÁTICO</i>	39
4.6 <i>EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HEPÁTICAS</i>	41
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	59
ANEXO	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURAS DAS AGLICONAS NARINGENINA E HESPERITINA E SEUS PRINCIPAIS RESPECTIVOS GLICOSÍDEOS ENCONTRADOS NA LARANJA: NARIRUTINA E HESPERIDINA.	14
FIGURA 2. ESTRUTURAS DAS ANTOCIANINAS ENCONTRADAS NO SUCO DE LARANJA SANGUÍNEA.	15
FIGURA 3. INTERFERÊNCIA DIRETA DAS VIAS INFLAMATÓRIAS NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA.	18
FIGURA 4. SUCO DE LARANJA PERA (ESQUERDA) E SUCO DE LARANJA MORO (DIREITA) FORNECIDOS PELA FUNDECITRUS, SP.	22
FIGURA 5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.	27
FIGURA 6. CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CLAE-DAD DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO. FLAVANONAS IDENTIFICADAS A 270 NM: PICOS 1. NARIRUTINA; 2. HESPERIDINA; 3. DIDIMINA NO SUCO PERA (A) E NO SUCO MORO (B). ANTOCIANINAS IDENTIFICADAS A 525 NM: PICOS 1. CIANIDINA 3-O-GLUCOSÍDEO; 2. CIANIDINA 3-O-(6"MALONIL GLICOSÍDEO) NO SUCO MORO (C).	35
FIGURA 7. (A) CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SANGUÍNEA DURANTE O IPGTT (B) CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SANGUÍNEA TOTAL DURANTE O IPGTT EXPRESSO PELA AUC. (C) CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE SANGUÍNEA DURANTE O IPITT. (D) CONSTANTE DE DECAIMENTO DA GLICOSE SANGUÍNEA (KITT) DURANTE O IPITT.	39
FIGURA 8. (A) PESO FINAL DOS CAMUNDONGOS POR GRUPO. (B) IMAGENS REPRESENTATIVAS DOS ANIMAIS NO DIA DA EUTANÁSIA. (C) PESO DO FÍGADO (D) IMAGENS REPRESENTATIVAS DOS FÍGADOS NO DIA DA EUTANÁSIA. (E) CONCENTRAÇÃO DO TRIGLICERÍDEO TOTAL HEPÁTICO.	40
FIGURA 9. ANÁLISE DE PCA DAS 507 PROTEÍNAS VALIDADAS EM AMOSTRAS TRATADAS COM SUCO DE LARANJA PERA E MORO.	41
FIGURA 10. HIERARCHICAL CLUSTERING.	42
FIGURA 11. VOLCANO PLOTS DA ABUNDÂNCIA DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ENTRE OS GRUPOS. (A) HLLC VERSUS CON; (B) HLLC+SM VERSUS HLLC; (C) HLLC+SP VERSUS HLLC. NO GRÁFICO É PLOTADO NO EIXO X LOG ₂ FOLD CHANGES (FC) E NO EIXO Y LOG P-VALOR (TESTE T DE STUDENT ENTRE OS GRUPOS CITADOS). PONTOS VERMELHOS: PROTEÍNAS UP-REGULATED (LOG ₂ FC ≥ 0,378; P<0,05). PONTOS VERDES: PROTEÍNAS DOWN-REGULATED (LOG ₂ FC ≤ -0,378; P<0,05). PONTOS CINZAS: PROTEÍNAS QUE NÃO ATENDERAM ESSES CRITÉRIOS.	43
FIGURA 12. DIAGRAMA DE VENN DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS CONSIDERANDO FOLD CHANGE.	43
FIGURA 13. ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO GENE ONTOLOGY (GO) DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS CONSIDERANDO AS COMPARAÇÕES DOS GRUPOS HLLC/CON, HLLC+SP/HLLC E HLL+SM/HLLC. (A) GO PROCESSO BIOLÓGICO, (B) GO FUNÇÃO MOLECULAR, (C) GO COMPONENTE CELULAR.	45
FIGURA 14. ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DAS VIAS METABÓLICAS AVALIADAS PELO KEEG CONSIDERANDO AS COMPARAÇÕES.	48
FIGURA 15. INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DO METABOLISMO LIPÍDICO E DE CARBOIDRATOS COMUNS ÀS TRÊS COMPARAÇÕES.	51
FIGURA 16. FOLD CHANGES DAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS DAS VIAS METABÓLICAS DE LIPÍDEOS E CARBOIDRATOS ENRIQUECIDAS – KEEG.	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DA DIETA CONTROLE (AIN-93G), DA DIETA HIPERLIPÍDICA E DO LEITE CONDENSADO	26
TABELA 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DE FLAVONOIDES DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO	34
TABELA 3. PESO CORPORAL, INGESTÃO ALIMENTAR, CONSUMO DE LÍQUIDOS, EFICIÊNCIA ENERGÉTICA E PESO DOS TECIDOS ADIPOSOS.	37
TABELA 4. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS DE ANIMAIS TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E INTERVENÇÃO COM SUCO DE LARANJA PERA E MORO.	38

1. INTRODUÇÃO

A exposição à fatores de risco relacionados ao estilo de vida, como as dietas hipercalóricas, o cigarro, o álcool, a radiação, os poluentes e os agentes infecciosos induzem a um complexo processo de inflamação generalizada e subclínica, que quando persistente, pode causar alterações metabólicas e teciduais, com consequente aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), entre elas o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças com características inflamatórias.

Os efeitos pró-inflamatórios da obesidade podem induzir a resistência à insulina, por alterar a via de sinalização deste hormônio, prejudicando suas ações anabólicas, caracterizando a intolerância à glicose e dislipidemia, fatores que em conjunto aumentam o risco do DM2. Diversos estudos têm sugerido que o consumo de compostos bioativos, tais como os flavonoides, podem diminuir o risco de DCNT por seus efeitos positivos em aumentar a sensibilidade à insulina dos tecidos periféricos, prevenir a dislipidemia e hipertensão arterial.

Neste contexto a laranja, por ser fonte de flavonoides e outros compostos bioativos, se apresenta como um alimento com potencial na melhora nos fatores de risco associados as DCNT. Os principais compostos flavonoides da laranja são a hesperidina e a narirutina, pertencentes à classe das flavanonas, além da antocianina cianidina 3-O-glucosídeo que está presente nas laranjas sanguíneas, sendo estes compostos conhecidos por suas atividades anti-inflamatória e antioxidante. Em adição aos possíveis efeitos biológicos dos componentes da laranja, o Brasil é o principal produtor da fruta e sua aceitação é ampla pelos brasileiros, tanto no consumo *in natura* ou suco processado, o que torna interessante a investigação dos efeitos do seu consumo sobre as disfunções metabólicas associadas à obesidade, cujo aumento da prevalência está relacionado ao crescente número de casos de DCNT, bem como sobre o processo inflamatório e via de sinalização à insulina.

CITRUS SINENSIS

A laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é a fruta cítrica mais produzida no mundo, sendo possivelmente, o suco de fruta mais reconhecido e aceito pelos consumidores (FAO, 2014). Essa espécie abrange as variedades mais importantes, do ponto de vista econômico, e podem ser classificadas em três grupos conforme sua coloração: laranja clara ou branca, laranja sanguínea e a laranja falsa-sanguínea (BITTERS, 1961; XU et al., 2006).

O cultivo de laranjas no Brasil, o maior produtor mundial da fruta e o principal exportador do suco processado, é predominantemente das cultivares de laranja clara, destacando-se as variedades Pera, Valência, Natal e Hamlin (FAO, 2014; NEVES, 2010). Já a laranja sanguínea é típica da região da Sicília, Califórnia e Espanha, representando, na Itália, 70% da produção de laranja doce, cujos principais cultivares são a Tarocco, Moro e Sanguinello (GROSSO et al., 2013; RAPISARDA et al., 2003).

As laranjas claras e as laranjas sanguíneas, além de serem ricas em vitamina C são fontes de compostos bioativos, como os carotenoides e os compostos fenólicos. Dentre os compostos fenólicos, se sobressaem os ácidos hidroxicinâmicos, que incluem os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e o cafeico, e os flavonoides, cuja a atividade antioxidante e anti-inflamatória vem sendo demonstradas em vários estudos (PROTEGGENTE et al., 2003; GROSSO et al., 2013; COELHO et al., 2013).

No Brasil, estudo de consumo de fenólicos pela população mostrou que os ácidos hidroxicinâmicos são a principal classe de fenólicos consumidos (299 mg/dia), seguido pela classe de flavanonas (86,5 mg/dia), onde o suco de laranja é o principal contribuinte de flavanonas (CARNAUBA et al., 2020), o que configura um fator importante para impulsionar pesquisas sobre o impacto do consumo de diferentes variedades de laranja na redução do risco de desenvolvimento das DCNT.

A subclasse majoritária dos flavonoides nas laranjas é representada pelas flavanonas, principalmente, a hesperidina (hesperitina-7-*O*-rutinosídeo) e a narirutina (naringenina-7-*O*-rutinosídeo) (Figura 1), que são compostos glicosilados a um dissacarídeo, no caso a rutinose, nas agliconas hesperitina e naringenina, respectivamente (KHAN et al., 2014; GIORDANO et al., 2012; PROTEGGENTE et al., 2003; RAPISARDA et al., 2008). No organismo, as flavanonas glicosiladas não são hidrolisadas pelas glicosidases endógenas e alcançam o colón onde são hidrolisadas pelas α -ramnosidases e β -glicosidases bacterianas liberando as agliconas e

posteriormente absorvidas pelos colonócitos. Ainda no colonócito, e posteriormente no fígado, são metabolizados pelas enzimas de fase II onde são conjugados a ácido glicurônico e sulfatos. Ainda, as agliconas podem ser metabolizadas a ácidos fenólicos e também serem absorvidos. Assim, principais compostos circulantes são conjugados glicuronidados ou sulfatados de naringenina e hesperitina e os ácidos fenólicos (3'-hidroxifenilacético, 4'-hidroxifenilacético, e 3(4-hidroxifenil) propiônico) (CORREA et al., 2019; NISHIOKA et al., 2021; FRAGA et al., 2021)).

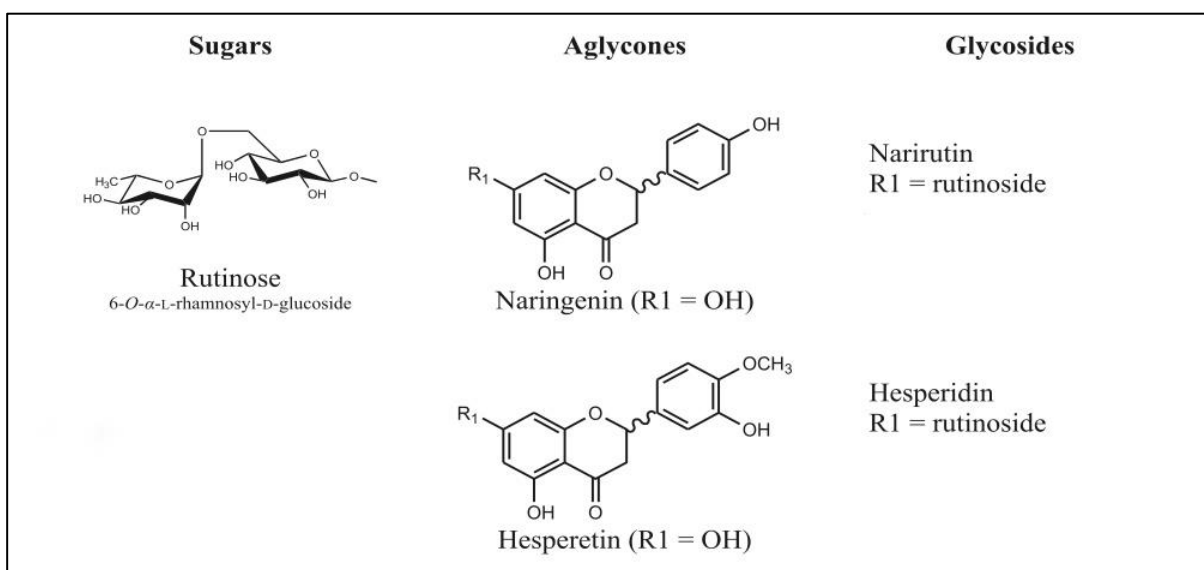


Figura 1. Estruturas das agliconas naringenina e hesperitina e seus principais respectivos glicosídeos encontrados na laranja: narirutina e hesperidina.

Fonte: Adaptado de KHAN et al. (2014).

A laranja sanguínea também é caracterizada pela presença das antocianinas (Figura 2), uma subclasse de flavonoides que confere uma intensa cor violácea a essa fruta (TITTA et al., 2010). Os principais compostos dessa subclasse presentes na laranja sanguínea são a cianidina 3-O-glicosídeo (C3G) e cianidina 3-(6''malonil)-glicosídeo que constituem mais de 75% do total de antocianinas, seguidas dos derivados glicosilados de delphinidina, peonidina e traços de petunidina (HILLERBRAND et al., 2004; LEE et al., 2002; PROTEGGENTE et al., 2003; KELEBEK et al., 2008). A cor e o sabor característicos das laranjas sanguíneas, somados aos seus possíveis efeitos biológicos, fazem com que estas apresentem grande potencial para uso comercial no mercado brasileiro, onde o nível de aceitação do suco de laranja clara já é alto (NEVES, 2010).

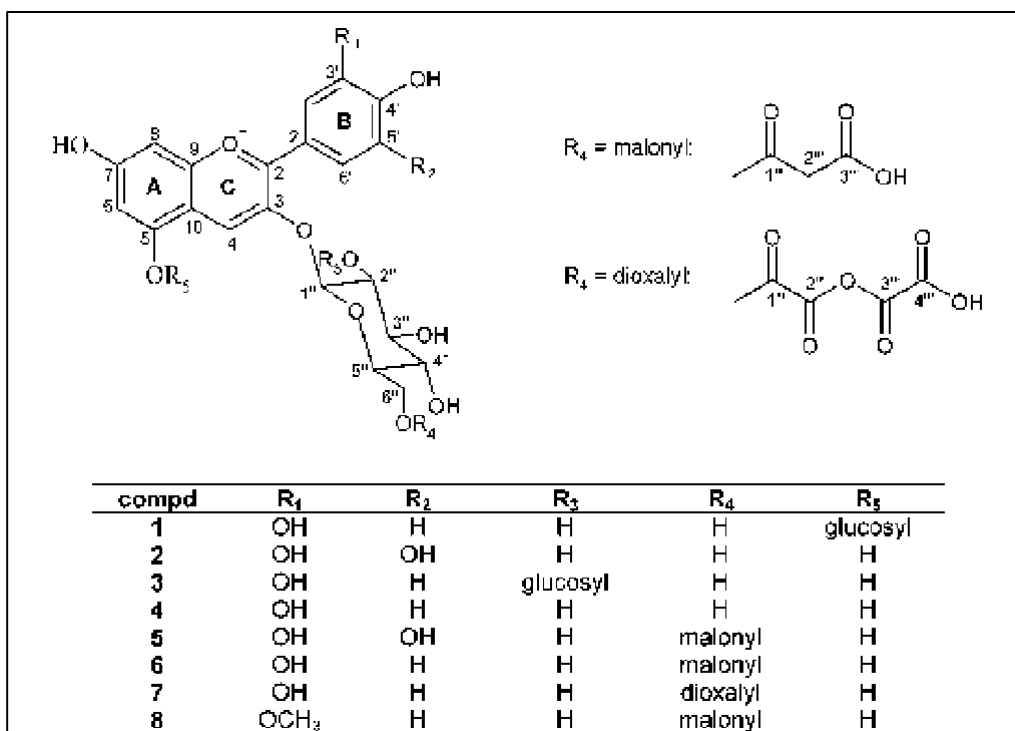


Figura 2. Estruturas das antocianinas encontradas no suco de laranja sanguínea.

Cianidina 3,5-diglicosídeo (1), delfindina 3-glicosídeo (2), cianidina 3-soforosídeo (3), **cianidina 3-glicosídeo (4)**, delfindina 3-(6"-malonil glicosídeo) (5), **cianidina 3-(6"-malonil glicosídeo) (6)**, cianidina 3-(6"- dioxalil glicosídeo) (7) e peonidina 3-(6"-malonil glicosídeo) (8).

Fonte: HILLEBRAND et al. (2004).

RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA POR OBESIDADE

A obesidade está associada a resistência insulínica, dislipidemia, redução da tolerância à glicose e hipertensão arterial, tais distúrbios metabólicos aumentam o risco de desenvolvimento das DCNT, como o DM2, contribuindo para as altas taxas de morbidade e mortalidade (REAVEN, 2010)

A resistência à insulina precede a manifestação do DM2 e é acompanhada por hiperinsulinemia compensatória, a qual quando prolongada resulta no início da disfunção das células β do pâncreas, prejudicando, assim, a homeostase da glicose, com consequente manifestação da hiperglicemia crônica, que determina a instalação do DM2 e as complicações associadas a ela (SRINIVASAN et al., 2005). A obesidade está intimamente relacionada com a diminuição das respostas dos tecidos periféricos à ação da insulina em concentrações fisiológicas, prejudicando, primariamente, a captação de glicose pelas células do tecido muscular e adiposo e a inibição da produção de glicose pelo fígado. Para compensar a resposta deficiente dos tecidos periféricos à insulina, observa-se a presença da hiperinsulinemia com o objetivo de

manter a tolerância à glicose dentro da normalidade (CHEN et al., 2013; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDE, 2006).

A insulina é fundamental na manutenção da normoglicemia por regular o metabolismo da glicose, bem como o metabolismo de lipídeos. No período pós-prandial, a insulina, um hormônio polipeptídico endógeno, atua como regulador primário da homeostase da glicose no sangue, pois estimula a captação da glicose nos tecidos muscular e adiposo e inibe a sua produção pelo fígado, através da supressão da glicogenólise e gliconeogênese e do aumento da síntese de glicogênio hepático e muscular. Nos tecidos periféricos a insulina também estimula a lipogênese e inibe a lipólise, promovendo, desta forma, o armazenamento de lipídeos (RASK-MADSEN; KAHN, 2012; SALTIEL & KAHN, 2001).

As células β pertencentes às ilhotas de Langerhans são responsáveis pela síntese e liberação da insulina. A glicose é o principal substrato estimulador da secreção deste hormônio, cujo mecanismo é iniciado com a sua entrada na célula β , através do transportador de glicose (GLUT) desta célula, o GLUT2 em humanos e o GLUT1 em roedores (DE VOS et al., 1995).

Para promover os efeitos metabólicos nos tecidos muscular, hepático e adiposo, a insulina secretada pelas células β pancreáticas se liga a um receptor específico, localizado na membrana das células destes tecidos, denominado receptor de insulina (IR). Essa ligação ativa o IR e, conseqüentemente, inicia-se uma cascata de fosforilações/desfosforilações de proteínas que são responsáveis por diferentes efeitos metabólicos, como a captação de glicose (SALTIEL & KAHN, 2001).

A partir da ligação da insulina ao IR, ocorre a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS) em resíduos de tirosina, formando sítios de ligação para proteínas com domínios com homologia Src 2 (SH2), como a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Figura 3). A PI3K desencadeia fosforilações de diversas proteínas até a ativação da proteína quinase B (Akt /PKB), sendo esta via responsável pelo aumento da captação de glicose pelas células, por estimular a translocação das vesículas contendo o transportador de glicose 4 (GLUT 4) para a membrana celular no tecido muscular e adiposo (HOLMAN & KASUGA, 1997). A via PI3K/ Akt também estimula a síntese de glicogênio no tecido hepático e muscular e inibe a produção e liberação de glicose hepática (SALTIEL & KAHN, 2001).

O equilíbrio energético também envolve a regulação do metabolismo de lipídeos pela insulina. A glicose captada pelos hepatócitos é convertida em glicogênio e o excesso é direcionado para a glicólise, que fornecerá carbono para a síntese de ácidos graxos e triglicerídeos. A insulina aumenta a expressão de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos por regular a transcrição e ativação do fator de transcrição denominado SREBP-1c (proteína 1c ligadora do elemento regulatório de esterol), o qual estimula a expressão de genes lipogênicos importantes (SHIMOMURA et al., 2000).

Um componente central para o acometimento da resistência à insulina é o estabelecimento de um estado inflamatório crônico de baixa intensidade. Hotamisligil et al. (1995) mostraram um aumento da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α em tecido adiposo de indivíduos obesos e sua influência direta na resistência à insulina induzida pela obesidade. A obesidade está associada a expansão do tecido adiposo devido ao acúmulo de lipídeos nos adipócitos, que se tornam hipertrofiados e passam a produzir citocinas/ quimiocinas pró-inflamatórias, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007; KERN et al., 2001). A adipocina MCP-1 induz a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, que secretam altas quantidades de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α e as interleucina-6 e -1 β (IL-6 e IL-1 β), permitindo que este recrutamento de macrófagos, fortemente relacionado com o grau de obesidade, esteja associado à inflamação sistêmica e resistência à insulina (ESSER et al., 2014; WEISBERG et al., 2003). TNF- α e IL-6 ativam as cascatas pró-inflamatórias relacionadas à resistência à insulina, por estimular as vias de sinalização inflamatória I κ B quinase- β (IKK- β)/fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e da via c-Jun aminoterminal quinase (JNK). (DONATH et al., 2011; KANDA et al., 2006; LUCA & OLEFSKY, 2008; UYSAL et al., 1997). A ativação das proteínas IKK- β e Jnk1 pode prejudicar a transdução do sinal da insulina por induzir a fosforilação das proteínas IRS em resíduos de serina, reduzindo as fosforilações em resíduos de tirosina e, promovendo, dessa forma, a resistência insulínica em diversos tecidos (Figura 3). (HIROSUMI et al, 2001; CAI et al., 2005).

As vias de sinalização do processo inflamatório NF- κ B/ IKK- β e JNK/PAI-1 também são ativadas, através do receptor de membrana Toll-like 4 (TLR 4) estimulada tanto por lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina liberada por bactérias gram-negativas, como também pelos ácidos graxos livres (AGL), ambos presentes em

concentrações elevadas em obesos, resultando na expressão e secreção de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e MCP-1 (LUCA & OLEFSKY, 2008; SHI et al., 2006).

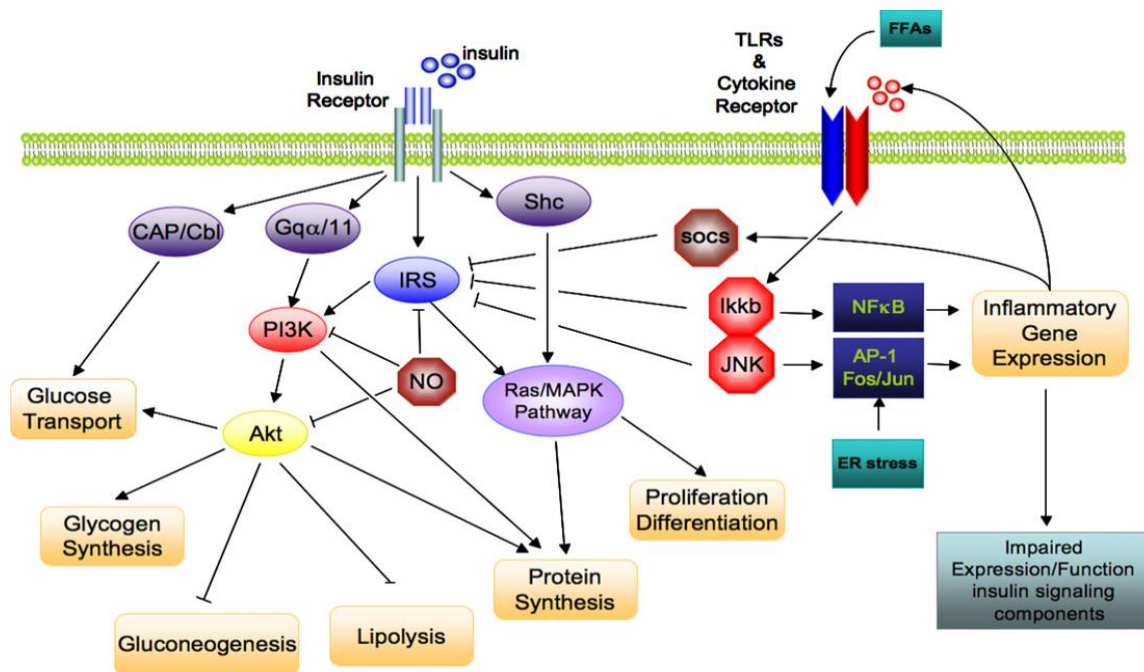


Figura 3. Interferência direta das vias inflamatórias na sinalização da insulina. Fonte: LUCA & OLEFSKY (2008).

A resistência à insulina uma vez instalada provoca uma redução da capacidade desse hormônio em suprimir a lipólise, liberando ácidos graxos que incitam a resposta inflamatória e aumenta os níveis de citocinas, o que agrava o quadro de resistência insulínica e, conseqüentemente, acelera a manifestação do DM2 (LI et al., 2006; HIRAI et al., 2010). Além disso, a hiperinsulinemia que acompanha a resistência insulínica aumenta o estímulo à lipogênese, que se mantém sensível à insulina, elevando o acúmulo lipídico no fígado, característica da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (MADSEN; KAHN, 2012).

AÇÃO BIOLÓGICA DA LARANJA

Diversos mecanismos estão relacionados as propriedades biológicas dos polifenóis na promoção à saúde, incluindo a modulação de enzimas do sistema antioxidante (Anhê et al. 2015; Diaz-Rubio et al., 2015), da via de sinalização inflamatória, regulação de genes do metabolismo lipídico, da lipogênese de novo, da oxidação de ácidos graxos, redução no acúmulo de triglicerídeo hepático (Shimoda et

al., 2009 ; Anê et al., 2017; Song et al., 2016), controle da glicemia e melhora na sensibilidade a insulina e melhora da tolerância a glicose (Aranaz et al., 2019; Teixeira et al., 2021).

A laranja doce, incluindo a laranja sanguínea, podem modular a resposta inflamatória por regular a via de sinalização do NF- κ B, reduzindo a quantidade de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- α (BARRECA et al., 2014; BONINA et al., 2002; BUSCEMI et al., 2012; CARDILE et al., 2010; KELEBEK et al., 2008; PROTEGGENTE et al., 2003). Por conseguinte, é possível que o consumo dessas frutas possa aumentar a sensibilidade insulínica, reduzindo a hiperinsulinemia e a dislipidemia associadas à resistência à insulina, e assim retardar ou evitar o desenvolvimento do DM2 (CHEN et al., 2013; LI et al., 2006). Em nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a ingestão concomitante de suco de laranja com uma dieta hiperlipídica, além do controle glicêmico (CHAVES et al., 2027), modulou a expressão de microRNAs plasmáticos associado a função celular de células β -pancreática, como a miR-375 (QUINTANILHA et al., 2022), podendo ser um dos mecanismos de proteção dos bioativos do suco de laranja.

A laranja pode modular a resposta inflamatória por outro mecanismo identificado por Ghanim et al. (2010) que avaliaram o efeito da ingestão de suco de laranja na inflamação pós-prandial, em indivíduos saudáveis, e observaram que o suco diminuiu a concentração da endotoxina LPS, além de suprimir a expressão do receptor TLR-4, receptor de membrana desta endotoxina. O LPS, assim como o TNF- α , quando ligados a um receptor, ativam a resposta inflamatória do organismo, através do estímulo da via de sinalização do NF- κ B, elevando, dessa forma, a quantidade de mediadores inflamatórios que estão relacionados com a instalação e progressão da resistência à insulina até culminar no DM2 (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; PRASATH; SUNDARAM; SUBRAMANIAN, 2013).

Estudo em nosso grupo de pesquisa também demonstrou que o suco de laranja (500 mL) modula o perfil proteômico de células de sangue periférico aumentando significativamente a expressão de diversas proteínas, principalmente a proteína promielocítica; e também reduzindo a expressão de proteínas da via de sinalização de citocinas inflamatórias (Chaves et al., 2017). A proteína promielocítica pode reduzir o processo inflamatório atenuando a ativação do sistema inflamassoma, que regula a ativação da pro-IL-1 β e IL-18 (Maarifi et al., 2014). Ainda, estudo transcriptômico demonstrou que o suco de laranja, e especificamente a hesperitina, modulou

positivamente a expressão de diversos genes em células de sangue periférico envolvidos em processos de quimiotaxia, adesão, infiltração e de transporte de lipídeos (MILENKOVIC et al., 2011).

O interesse pela laranja sanguínea é crescente por apresentar excelente qualidade sensorial e por desempenhar atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* significativas, relacionadas ao alto conteúdo de fenólicos, incluindo as antocianinas. Resultados interessantes sobre o efeito anti-inflamatório da laranja sanguínea foram encontrados por Buscemi et al. (2012), nos quais, após a ingestão do suco por indivíduos com alto risco cardiovascular, houve uma redução nas concentrações dos marcadores proteína-C reativa, IL-6 e TNF- α , o que pode ter atenuado a sinalização da via de sinalização inflamatória com potenciais efeitos benéficos na progressão da aterosclerose.

Vale destacar que a laranja sanguínea, diferentemente da laranja clara, caracteriza-se por conter altas concentrações de antocianinas, com o predomínio da C3G. Provavelmente esta é a antocianina mais conhecida e investigada, podendo ser encontrados estudos que demonstraram sua capacidade na regulação da via de sinalização da insulina, auxiliando, dessa forma, na prevenção e controle de doenças associadas à resistência insulínica (SCAZZOCCHIO et al., 2011; TITTA et al., 2010). Em concordância com esses relatos, a C3G foi relacionada à melhora do quadro de obesidade e de intolerância à glicose, em roedores, prevenindo o acometimento do DM2 (SALAMONE et al., 2012; TSUDA et al., 2008; TITTA et al., 2010).

Estudos com flavonoides de citrus, tais como a hesperitina, nobiletina e eridictiol, demonstram que estes podem reduzir o acúmulo de lipídeos em células HepG2, o qual foi associado a modulação da expressão de dos microRNA miR-122 e miR-33; supressão da síntese de ácidos graxos; e aumento da expressão da carnitina palmitoil transferase 1 (SU et al., 2019), enzima esta responsável pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a matriz mitocondrial; além de aumentar a expressão de enzimas chaves da β -oxidação (CHENG et al., 2019).

Em nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que o consumo de suco de laranja aumentou as acil carnitinas de cadeia curta plasmática, sugerindo um aumento da β -oxidação de ácidos graxos peroxisomal e mitocondrial (MOREIRA et al., 2018).

2. OBJETIVO

Tendo em vista que:

(1) O consumo crônico de dietas hipercalóricas ricas em gordura e açúcares simples é um dos fatores determinantes na promoção da obesidade e demais disfunções metabólicas associadas a ela, que incluem resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão arterial e esteatose hepática;

(2) O suco de laranja possui diversos compostos bioativos, atenção especial às flavanonas, com propriedades biológicas;

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ingestão de suco de laranja Moro e suco de laranja Pera sobre o perfil do proteoma de fígado em camundongos submetidos ao modelo de resistência à insulina induzida por obesidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

Os sucos pasteurizados das laranjas (*C. sinensis*) sanguínea do cultivar Moro e clara do cultivar Pera foram fornecidos pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) situada em Araraquara, SP (Figura 4).

Estas amostras foram armazenamento a -20 °C e depois descongeladas e centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4 °C para a caracterização e uso no ensaio biológico.



Figura 4. Suco de laranja Pera (esquerda) e suco de laranja Moro (direita) fornecidos pela FUNDECITRUS, SP.

3.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUCOS DE LARANJA

3.2.1 Preparo das Amostras

Amostras de 10 ml de suco Pera e Moro foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram reservados para as análises de caracterização, que incluem quantificação de açúcares solúveis, ácidos orgânicos e de flavonoides.

3.2.2 Identificação e Quantificação de Flavonoides

3.2.2.1 Extração em fase sólida (SPE)

As amostras centrifugadas foram eluídas em colunas de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology) e pré-condicionadas com 20 ml de metanol seguida de 50 ml de água deionizada. Após a passagem das amostras, as colunas foram lavadas com água deionizada e a eluição dos flavonoides foi realizada com metanol (suco de laranja Pera) e metanol acidificado com HCl 0,3% (suco de laranja Moro). Os eluatos foram concentrados, através de rotaevaporação (Rotavapor, RE 120, Büchi, Flawil, Suíça) a vácuo a 40 °C, até a completa remoção dos solventes, para em seguida, serem ressuspensos em metanol grau cromatográfico ou metanol acidificado (suco de laranja Moro) e então, filtrados em membranas de PVDF (0,45 µm) para análise por CLAE/DAD.

3.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector com arranjo de diodo (CLAE-DAD)

A identificação e quantificação dos flavonoides foram realizadas por CLAE em cromatógrafo (Infinity 1260, *Agilent Technologies*) com injetor automático e equipado com detector de diodo (DAD). A coluna utilizada foi a Prodigy 5 µ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL/min, 25 °C, e a eluição foi realizada com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5% em água e B: ácido fórmico 0,5% em acetonitrila. Para a identificação e quantificação de antocianinas o fluxo foi de 0,8 mL/min e a fase móvel foi estabelecida por A: água/ácido fórmico/acetonitrila (96:1:3, v/v/v) e B: água/ácido fórmico/acetonitrila (48:1:51, v/v/v). As corridas foram monitoradas nos comprimentos de onda de 270 nm

e 525 nm. Os picos foram identificados por comparação do tempo de retenção e similaridade dos espectros de absorção dos padrões comerciais, previamente inseridos nos métodos. A quantificação foi realizada a partir de curvas de calibração preparadas como padrões de flavonoides narirutina, hesperidina, didimina (Sigma-Aldrich) e cianidina 3-O-glucosídeo (Extrasynthese, Genay, France) e os resultados expressos em mg flavonoide/L de suco.

3.2.3 Identificação e quantificação de ácidos orgânicos

Os sobrenadantes do suco Pera e Moro foram filtrados em membrana Millipore® de 0,45 µm e diluídos uma vez com ácido metafosfórico para análise. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Hewlett Packard Series 1100) utilizando coluna SUPELCOGEL C-610H (30 cm x 7.8 mm) e fase móvel em condição isocrática composta por ácido fosfórico 0,1 % (w/v), com fluxo de 0,5 mL/minuto. A detecção foi realizada a 210 e 240 nm. A quantificação e identificação foram realizadas a partir das curvas de calibração dos ácidos ascórbico, cítrico e málico. Os resultados foram expressos em mg/100 mL suco.

3.2.4 Quantificação de açúcares

Os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Cordenunsi, Shiga e Lajolo (2008). Os sobrenadantes do suco pera e moro foram filtrados em membrana Millipore® de 0,45 µm e diluídos em água deionizada para a detecção dos açúcares por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência – HPAEC (Dionex, DX500) com detecção amperométrica pulsada (PAD), utilizando-se uma coluna PA1 (Dionex). A fase móvel foi constituída de 100% de NaOH 20 mM com fluxo constante de 1,0 mL/min a 30 °C. A quantificação foi realizada a partir de curvas de calibração de glicose, frutose e sacarose e os resultados expressos em mg/mL de suco.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Autorização Ética

Todos os procedimentos realizados em animais descritos neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP, protocolo número 525), que segue as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3.2 Animais

Camundongos machos C57Bl/6 (3 a 4 semanas de idade, $11,74 \pm 0,52$ g), obtidos do Biotério da FCF-USP, foram mantidos em condições ambientais controladas, em salas com temperatura entre 23 a 25°C, umidade relativa de $55 \pm 10\%$ e ciclo de iluminação 12h claro/12 h escuro.

3.3.3 Grupos experimentais

Quarenta camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais contendo dez animais cada, e estes foram distribuídos em três gaiolas por grupo. Os animais foram alimentados com a dieta controle (carboidrato: 64% da composição energética, sendo 10 % sacarose), descrita pelo *American Institute of Nutrition*, AIN 93-G (REEVES et al., 1993) ou com a dieta hiperlipídica (gordura: 45% das calorias da dieta) e leite condensado (carboidrato: 72% da composição energética, sendo 55% sacarose) (Nestlé), cujo conteúdo de vitaminas e minerais foram corrigidos semanalmente com o *mix* correspondente da AIN 93-G. As composições das dietas estão discriminadas na Tabela 1.

Concomitantemente, dois grupos experimentais da dieta hiperlipídica e leite condensado receberam suco de laranja Moro ou Pera em substituição à água. Os sucos foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 min e os sobrenadantes foram oferecidos aos camundongos. A ração, a água e os sucos de laranja foram ministrados *ad libitum* durante 15 semanas. Os camundongos que receberam ração hiperlipídica tiveram livre acesso ao leite condensado, que foi colocado em potes de vidro dentro das gaiolas.

Os quatro grupos, portanto, consistem em:

- 1) Grupo CON (dieta controle): camundongos alimentados com a dieta controle (CON) AIN 93-G e de administrado água;
- 2) Grupo HLLC (dieta obesogênica): camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HL) e leite condensado (LC) e administrado de água;

- 3) Grupo HLLC + suco Pera: camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HL) e leite condensado (LC) e administrado de suco de laranja Pera (SP);
- 4) Grupo HLLC + suco Moro: camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HL) e leite condensado (LC) e administrado de suco de laranja Moro (SM)

Tabela 1. Composição da dieta controle (AIN-93G), da dieta hiperlipídica e do leite condensado

Dieta	AIN-93G (CON)	HIPERLIPÍDICA (HL)	LEITE CONDENSADO (LC)
Macronutrientes	% Kcal	% Kcal	% Kcal
Proteína	20,5	20,2	9
Carboidrato	63,6 10 (sacarose)	34,9 5 (sacarose)	72 55 (sacarose)
Gordura	15,9	44,9 29,2 (banha de porco)	19
Ingredientes (em 100 g de dieta)	(g)	(g)	
Amido de milho	39,75	25,98	
Maltodextrina	13,20	8,63	
Sacarose	10,00	6,54	
Banha de porco	0,00	15,28	
Óleo de soja	7,00	8,23	
Caseína	20,00	23,52	
L-cisteína	0,30	0,35	
Celulose	5,00	5,88	
Mix de minerais	3,50	4,12	
Mix de vitaminas	1,00	1,18	
Bitartarato de colina	0,25	0,30	
Energia	3,96 kcal/g	4,71 Kcal/g	3,13 Kcal/g

Os camundongos eram pesados 3 vezes por semana. O peso das rações, do leite condensado, da água e dos sucos de laranja eram registrados a cada 2 dias, e em seguida, substituídos. O ganho de peso dos animais foi calculado pela diferença entre o peso final e inicial do experimento. O consumo das rações e leite condensado [alimento repostado (g) - alimento remanescente (g)], o consumo de água e sucos de

laranja Pera e Moro [líquido repostado (g) - líquido remanescente (g)] e a ingestão calórica [consumo de ração (g) x Kcal/g da CON ou HL] + [consumo de leite condensado (g) x Kcal/g de LC] + [ingestão de sucos de laranja (ml) x Kcal/ml de SP ou SM], foram calculados por semana para cada grupo experimental. Para o cálculo da eficiência alimentar, considerou-se o ganho de peso dividido pelas quilocalorias consumidas durante período experimental completo, multiplicado por 100.

Nas 12^o e 13^o semanas foram realizados o teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT) e o teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT), respectivamente (Figura 5). A eutanásia de todos os animais ocorreu na 15^o semana do início do tratamento.

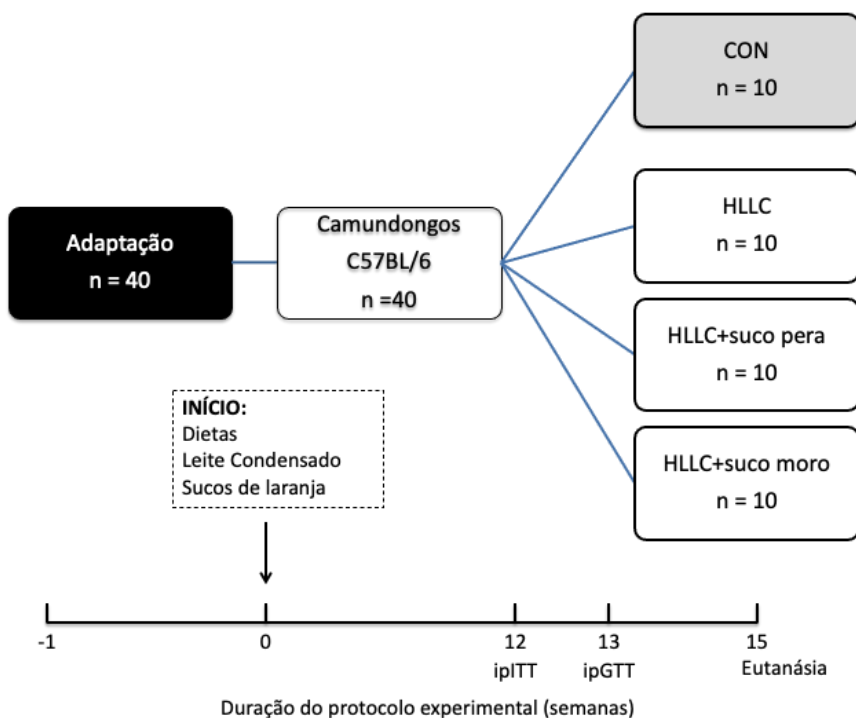


Figura 5. Protocolo experimental.

3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

O ITT foi realizado durante a décima segunda semana do protocolo. Após o jejum de seis horas, a insulina (Novolin R, 0,75 U/kg peso corporal) foi injetada, via intraperitoneal, e uma gota sangue foi coletada da cauda para a determinação da

glicemia nos tempos 0 (basal-antes da aplicação da insulina), 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 90 minutos. A constante de decaimento da glicose (Kitt) foi calculada pela fórmula $0,693/t_{1/2}$, em que $t_{1/2}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva, obtida durante a fase linear de decaimento da glicose plasmática detectada nos tempos de 5 a 30 minutos após infusão de insulina (BONORA et al., 1989). Quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, maior a sensibilidade a insulina.

Para o GTT, realizado na décima terceira semana de protocolo, os camundongos foram mantidos em jejum noturno de 12 horas, recebendo, em seguida, injeção intraperitoneal de uma solução de glicose 25% (2g glicose/kg peso corporal). Após esse procedimento, uma gota de sangue foi retirada da cauda para a determinação da glicemia nos tempos 0 (basal-antes da aplicação da insulina), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. O cálculo da área sob a curva (AUC) foi utilizado para avaliar a tolerância à glicose.

A medida das glicemias durante o ITT e GTT foi realizada através do glicosímetro *Accu-Chek Advantage II* (Roche Diagnostics, Basel, Suíça).

3.5 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Após 12 horas de jejum, durante a 15ª semana do protocolo, todos os camundongos foram eutanasiados por decapitação, sendo inicialmente sedados com isoflurano. O sangue dos camundongos foi coletado, através da veia caudal 30 min antes da eutanásia, centrifugado e retirado o plasma para determinação da glicemia e insulina de jejum.

Para o estímulo de insulina, cinco camundongos de cada grupo experimental receberam, 5 minutos antes da eutanásia, 0,75 unidade (U) de insulina regular humana (Novolin R) por kg peso corporal.

O sangue coletado logo após a decapitação foi centrifugado a 3.500 rpm/10 min/ 4 °C para as análises bioquímicas. O fígado e os tecidos adiposos periepididimal e retroperitoneal foram devidamente coletados, dissecados e pesados. O plasma e os tecidos foram armazenados em *ultrafreezer* a -80°C.

3.6 ANÁLISES DOS PARÂMETROS SÉRICOS

A glicose e a insulina foram analisadas no sangue dos camundongos, após o jejum noturno de 12 horas. Para medir a glicose foi utilizado o glicosímetro *Accu-Chek Advantage II* (Roche Diagnostics, Basel, Suíça). Já a insulina foi dosada por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), através de um kit comercial (#EZRMI 13K; Merck Millipore, St. Louis, MO, USA).

A sensibilidade à insulina foi avaliada através do modelo matemático HOMA-IR (*homeostasis model assessment of basal insulin resistance*), que calcula um índice a partir do produto entre as concentrações plasmáticas de glicose (mM) e insulina (U) em jejum dividido por 22,5. Maior sensibilidade à insulina é indicado por valores mais altos de HOMA-IR, enquanto valores mais baixos correspondem a menor sensibilidade à insulina, e portanto, resistência à insulina.

O Colesterol e os triglicerídeos (TG) foram dosados por método colorimétrico, utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, BR).

3.7 TRIGLICERÍDEOS NO TECIDO HEPÁTICO

Os lipídeos hepáticos foram extraídos do homogenato do tecido, preparado na concentração de 100mg/mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, (pH 7,4, adicionado de mesilato de deferoxamina 100 µM), de acordo com o método *methyl tert-butyl ether* (MTBE), com modificações (MATYASH et al., 2008). Em seguida, o extrato lipídico foi analisado para triglicerídeos (TG), por meio do método colorimétrico enzimático, utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, BR).

3.8 ANÁLISE PROTEÔMICA NO TECIDO HEPÁTICO

3.8.1 Preparo das amostras

Para o preparo dos extratos proteicos, foram homogeneizados 100 mg de fígado em tampão Tris-Ureia (Tris 50mM pH 8,1, Urea 8M e NaCl 75mM). O homogenato foi, então, centrifugado a 12.000 rpm por 20 min a 4° C, e no sobrenadante coletado (extrato proteico), dosou-se o conteúdo de proteínas, por meio do Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Em seguida, a fim de proceder à digestão de proteínas, aliquotou-se o volume de sobrenadante referente a 100 µg de proteínas e a solução final foi completada para 100 µL com água ultrapura. As

proteínas foram precipitadas com acetona P.A. 4:1 (vol. extrato:vol.acetona), incubadas a -30°C por 2 horas e centrifugadas a 14.000 rpm a 4°C . O precipitado proteico foi dissolvido em 20 μL de ureia 8M, corrigido o pH para estar entre 7 e 8 e, em sequencia, reduzido com 0,5 μL de ditioneitol (DTT) 1M a 56°C por 30 min. Após a etapa de redução, as proteínas foram alquiladas com 5 μL de iodoacetamida (IAA) 200mM em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. O *quenching* da reação de alquilação foi realizada adicionando 2 μL de DTT 1M com incubação de 15 minutos em temperatura ambiente, na ausência de luz. A fim de reduzir a concentração de ureia para 1,6M, as amostras foram diluídas em 1:5 de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50mM. Após a adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,1M, as amostras seguiram para a etapa de digestão, para a qual foi utilizada uma solução de tripsina (Promega, Fitchburg, WI, USA) 20 ng/ μL , na proporção de 1:50 (enzima:substrato), sob incubação por 16 horas a 37°C . A digestão foi interrompida, através da adição de ácido trifluoacético (TFA) a 0,4% (pH para menor que 2), e as amostras, então, foram dessalinizadas em colunas de extração em fase sólida OASIS HLB (Waters), evaporadas em *Speedy Vac* e armazenadas a -20°C para posterior análise em espectrometria de massas (MS).

3.8.2 Condições LC-qToF-MS/MS

A mistura de peptídeos foi dissolvida em 0,1% de ácido fórmico em água e analisada em UPLC-Nexera LC-30AD (Shimadzu, Kyoto, Japan) acoplada a espectrômetro de massas do tipo QTOF (model Impact II, Bruker Daltonics, Germany) e interface com fonte CaptiveSpray nanoBooster (Bruker). As condições cromatográficas foram: pré-coluna C18 (Acclaim PepMap RSLC Nano-Trap column; 3 μm , 100 \AA , 75 $\mu\text{m} \times 20\text{ mm}$, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e coluna C18 (Acclaim PepMap RSLC column; 2 μm , 100 \AA , 75 $\mu\text{m} \times 150\text{ mm}$, Thermo Fisher Scientific), gradiente linear de 7% fase móvel B (80% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico) para 45% em 50 min, com fase móvel contendo 0,1% de ácido fórmico. O espectro de massas foi adquirido a 2 Hz, m/z 50–2200, com seleção de íon precursor entre m/z 300–2200. O ciclo MS foi fixado em 3,0 s. A energia de colisão foi ajustada entre 23–65 eV como uma função do valor de m/z.

3.8.3 Identificação e quantificação das proteínas

Os dados brutos de proteômica gerados no espectrômetro de massas foram processados, quantitativamente, por meio do *software* MaxQuant versão 1.6.3.4 (COX e MANN, 2008). Para a identificação das proteínas, os espectros MS/MS foram utilizados pelo algoritmo Andromeda integrado ao MaxQuant (COX et al., 2011), que executou a busca na base de dados universal de sequências de proteínas Uniprot para o organismo *Mus musculus* (85.159 sequências em novembro/2018). As configurações padrão do *software* foram utilizadas, incluindo os seguintes parâmetros: especificidade enzimática para tripsina/P com tolerância de duas clivagens não digeridas pela enzima, a oxidação de metionina (M) e a acetilação de proteínas N-terminal foram definidas como modificações variáveis, bem como a carbamidometilação de cisteína (C) foi fixada como modificação fixa, e o comprimento mínimo do peptídeo foi definido em 7 aminoácidos. A taxa de falsos positivos (*False Discoverer Rate*, FDR) foi de 1% para peptídeos (*peptides spectral match*, PSM) e proteínas. A aplicação do método de quantificação livre de marcadores (*label-free quantification*, LFQ), baseada na intensidade normalizada do espectro, gerou valores de abundância relativa para todas as proteínas identificadas nas amostras (COX et al., 2014).

3.8.4 Análise bioinformática dos dados proteômicos

O processamento e a análise estatística dos dados de identificação e quantificação das proteínas, gerados no MaxQuant, foram executados usando o *software* de bioinformática Perseus versão 1.6.15.0 (TYANOVA e COX, 2018). Inicialmente, as proteínas identificadas somente pelo sítio de modificação, pelo banco reverso e os contaminantes foram removidas. Os valores de intensidade LFQ foram transformados para \log_2 . Para as análises posteriores, foram consideradas as proteínas detectadas na triplicata de pelo menos um grupo experimental e os valores ausentes foram imputados segundo uma distribuição normal. A fim de comparar os quatro grupos amostrais, os dados, então, foram exportados para serem submetidos à análise do componente principal (PCA), executada na plataforma online MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>). A significância estatística das variações na abundância das proteínas entre os grupos amostrais foi medida pelo teste t de Student, com valores-p ajustados, através da taxa de falsa descoberta (FDR)

baseada no teste de permutação, utilizando FDR a 5%. Foram consideradas, para as análises de enriquecimento de vias metabólicas e ontologia genética (*Gene Ontology*, GO), as proteínas diferencialmente expressas (DEPs) que tiveram valores de *fold changes* (FC) maior que 1,3 e menor que 0,769, calculadas no Microsoft Excel e visualizadas no gráfico Volcano. Para o *hierarchical clusterig*, as DEPs foram obtidas por meio de uma ANOVA *one-way* com valor de $p < 0,05$.

A análise de enriquecimento funcional dos processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares das proteínas diferencialmente expressas foram realizados utilizando o *Gene Ontology* (GO), por meio da plataforma online Panther (<https://www.pantherdb.org/>). O enriquecimento de vias metabólicas foi através da plataforma online DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) utilizando o banco de dados do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes*) (<http://www.genome.jp/kegg/>). A interação proteína-proteína foi analisada utilizando o software String versão 11.5 (<https://string-db.org/>).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram tabulados em planilhas do programa Excel (Microsoft Office, EUA) para em seguida, a análise estatística ser realizada no programa GraphPad Prism (GraphPad Prism Software Inc., CA, EUA).

Os resultados de caracterização das amostras foram expressos em média \pm desvio-padrão, sendo que as análises foram realizadas em triplicata. Para os resultados do ensaio biológico, inicialmente, todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, o teste t de Student foi executado para comparar dieta HLLC e CON, e a análise de variância de uma via (ANOVA) foi utilizada para verificação de diferenças entre os grupos HLLC+SP e HLLC+SM com dieta HLLC e em caso de diferença significativa, análises *post hoc* foram realizadas com o teste de Tukey. Em todas as análises o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DE FLAVONOIDES DO SUCO DE LARANJA PERA E MORO

Os principais açúcares presentes nos sucos de laranja foram a sacarose, glicose e frutose, que somados corresponderam a 48,38 g/L e 39,14 g/L no suco de laranja Pera e Moro, respectivamente (Tabela 2). A sacarose está presente em maior quantidade em ambos os sucos, representando 46% na variedade Pera e 51% na variedade Moro. Em menores proporções, a glicose e a frutose juntas compõem o perfil de açúcares. A razão sacarose: glicose: frutose foi de 2:1:1, padrão encontrado nos sucos de laranja (LEE & COATES, 2000).

Dois ácidos orgânicos foram identificados e quantificados nos sucos de laranja, o ácido cítrico e o ácido ascórbico (Tabela 2). O ácido cítrico apresentou concentração de 10,85 g/L e 12,83 g/L no suco de laranja Pera e Moro, respectivamente. Por sua vez, a concentração de ácido ascórbico foi de 240 mg/L e 300 mg/L para os sucos Pera e Moro, respectivamente.

Tabela 2. Composição química e de flavonoides dos sucos de laranja Pera e Moro

Compostos	Suco de Laranja Pera	Suco de Laranja Moro
Açúcares Solúveis (g.L⁻¹)		
Sacarose	22,05 ± 0,47	19,87 ± 3,25
Glicose	12,18 ± 0,16	9,26 ± 0,86
Frutose	14,15 ± 0,05	10,02 ± 2,01
Total	48,38 ± 0,68	39,14 ± 6,12
Ácidos Orgânicos (g.L⁻¹)		
Ácido Cítrico	10,61 ± 0,04	12,53 ± 0,14
Ácido Ascórbico	0,24 ± 0,01	0,30 ± 0,01
Total	10,85 ± 0,05	12,83 ± 0,15
Fenólicos Totais (mg.L⁻¹)	768,81 ± 23,23	963,94 ± 21,03
Flavanonas (mg.L⁻¹)		
Narirutina	19,29 ± 1,04	12,30 ± 2,91
Hesperidina	199,7 ± 15,53	148,37 ± 9,61
Didimina	5,4 ± 0,51	13,18 ± 3,57
Total	224,39 ± 17,08	173,85 ± 16,09
Antocianinas (mg.L⁻¹)		
Cianidina 3-Glicosídeo (C3G)*	-	30,49 ± 2,58
Total	-	30,49 ± 2,58

*Corresponde a soma da cianidina-3-O-glucosídeo e cianidina 3-O-(6"malonil glicosídeo). Resultados expresso como média ± DP

Flavanona é a principal classe de flavonoides encontrados em *citrus*. Três flavanonas foram identificadas (Figura 6) e quantificadas (Tabela 2) em ambos os sucos, a narirutina, hesperidina e didimina. A heperidina foi a flavanona mais abundante presente tanto no suco de laranja Pera (199,7 mg/L) quanto no suco de laranja Moro (148,37 mg/L). Em concentração inferior, a narirutina correspondeu a 19,29 mg/L no suco de laranja Pera e 12,30 mg/L no suco de laranja Moro. As antocianinas, responsáveis pela coloração violácea do suco de laranja Moro, foram identificadas como cianidina 3-O-glucosídeo (C3G) e cianidina 3-O-(6"malonil glicosídeo) (Figura 6), correspondendo a um total de 30,49 mg/L (Tabela 2).

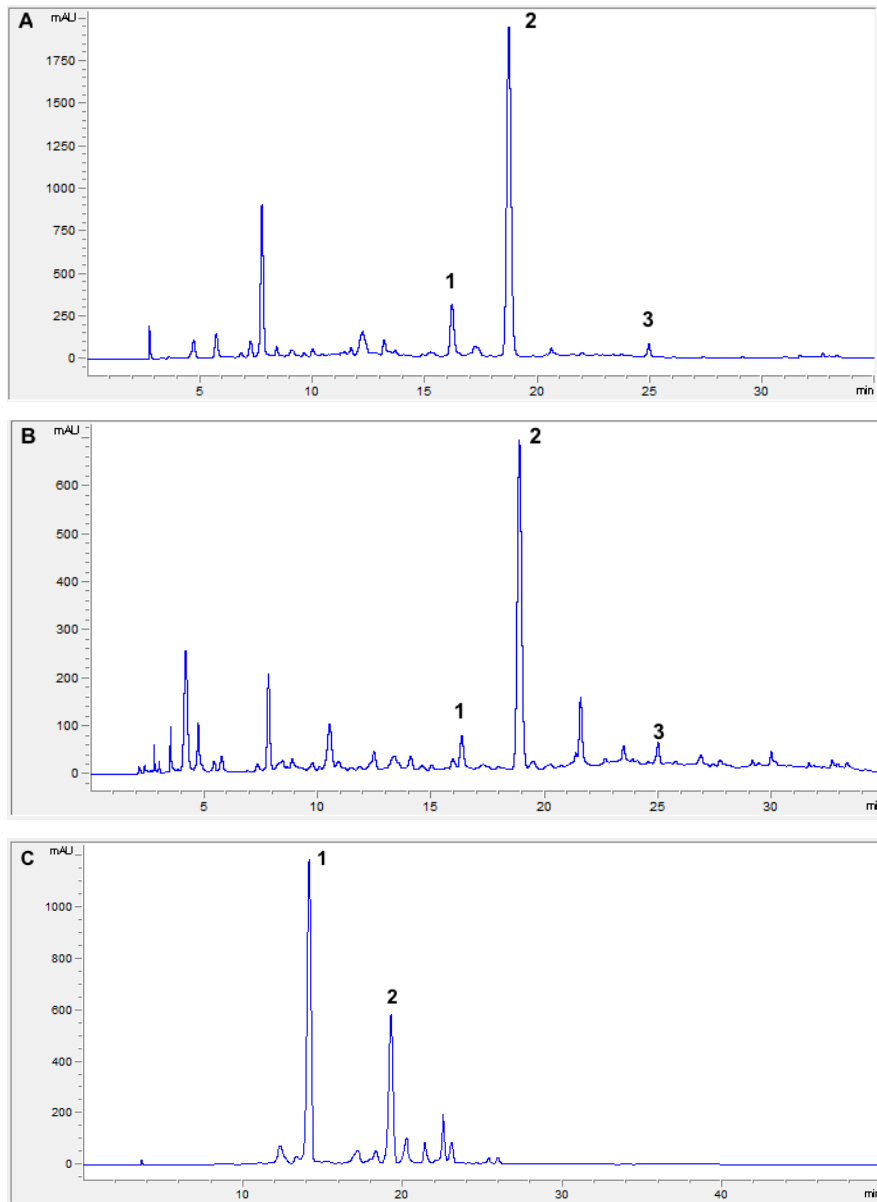


Figura 6. Cromatogramas obtido por CLAE-DAD dos sucos de laranja Pera e Moro. Flavanonas identificadas a 270 nm: picos 1. narirutina; 2. hesperidina; 3. didimina no suco Pera (A) e no suco Moro (B). Antocianinas identificadas a 525 nm: picos 1. Cianidina 3-O-glucosídeo; 2. cianidina 3-O-(6"malonil glicosídeo) no suco Moro (C).

4.2 PESO CORPORAL, PESO DOS COXINS ADIPOSOS, INGESTÃO ALIMENTAR E EFICIÊNCIA ENERGÉTICA

A dieta hiperlipídica e leite condensado (HLLC) induziu à obesidade, como pode ser visto na Tabela 3. O grupo HLLC apresentou ganho de peso corporal 63% maior do que os animais que consumiram a dieta controle (CON) ($p < 0,0001$), após quinze semanas de protocolo experimental. No entanto, entre os grupos HLLC, os animais tratados com suco de laranja Pera (HLLC+SP) e suco de laranja Moro

(HLLC+SM) não apresentaram diferença significativa no ganho de peso em relação aos que beberam água. Igualmente, a dieta hiperlipídica com leite condensado também aumentou a adiposidade dos camundongos, que foi constatado pelo maior peso dos tecidos adiposos (TA) epididimal, retroperitoneal e mesentérico. Enquanto nos grupos tratados com ambos os sucos de laranja, não foi observada diferença significativa no peso destes tecidos, comparado ao grupo HLLC (Tabela 3).

A ingestão de ração pelo grupo HLLC foi menor do que o grupo CON (-72%, $p < 0,0001$), por outro lado o consumo energético foi similar entre os grupos devido à compensação pela ingestão de leite condensado (LC) do grupo HLLC (Tabela 3). Por sua vez, o grupo HLLC+SP ingeriu menor quantidade de ração (-14%, $p < 0,05$) e, em contrapartida, aumentou a ingestão de LC (+15%, $p < 0,001$) em relação ao grupo HLLC, enquanto o grupo HLLC+SM não apresentou diferença significativa para consumo de ração e LC. Dessa forma, o maior consumo energético do grupo HLLC+SP (+46%, $p < 0,01$) e HLLC+SM (+38%, $p < 0,01$) em relação ao grupo HLLC, foi devido as quilocalorias dos sucos de laranja consumidas pelos animais desses dois grupos. Os camundongos que se alimentaram da dieta HLLC beberam menos água do que os alimentados com a dieta CON (-41%, $p < 0,001$), assim como o consumo de suco de laranja Pera e suco de laranja Moro também foi menor (-17%, $p < 0,001$ e -23%, $p < 0,0001$, respectivamente) do que o consumo de água pelo grupo HLLC (Tabela 3).

Como observado na Tabela 3, o ganho de peso significativo dos camundongos do grupo HLLC em relação ao grupo CONT não seguiu acompanhado do consumo energético, e conseqüentemente, a eficiência alimentar, ganho de peso por quilocaloria consumida, também foi maior para esses animais (+54%, $p < 0,001$). Apesar do maior consumo energético dos animais dos grupos HLLC+SP e HLLC+SM, proveniente das quilocalorias dos sucos, os mesmos apresentaram o ganho de peso similar ao grupo HLLC, resultando em menor eficiência alimentar em ambos os grupos (-36%, $p < 0,0001$ e -35%, $p < 0,0001$, respectivamente), o que indica que os sucos de laranja não provocaram aumento do ganho de peso.

Tabela 3. Peso corporal, ingestão alimentar, consumo de líquidos, eficiência energética e peso dos tecidos adiposos.

	CON	HLLC	HLLC+SP	HLLC+SM
Peso corporal inicial (g)	16.9 ± 1.05	16.6 ± 0.99	17.2 ± 1.11	17.4 ± 0.80
Ganho de peso corporal (g)	15.0 ± 1.45	24.5 ± 1.03****	22.6 ± 1.63	21.8 ± 1.37
Peso do TA epididimal (g)	0.71 ± 0.09	1.61 ± 0.09****	1.50 ± 0.11	1.54 ± 0.10
Peso do TA retroperitoneal (g)	0.24 ± 0.03	0.47 ± 0.02****	0.45 ± 0.03	0.49 ± 0.03
Peso do TA mesentérico (g)	0.31 ± 0.04	0.90 ± 0.12***	0.79 ± 0.09	0.98 ± 0.07
Ingestão de ração (g/sem/cam)	23.1 ± 0.45	6.38 ± 0.26****	5.48 ± 0.21 [#]	6.44 ± 0.24
Ingestão de LC (g/sem/cam)	-	20.5 ± 0.54	23.6 ± 0.77 ^{###}	21.8 ± 0.65
Consumo de líquidos (ml/sem/cam)	27.0 ± 1.16	15.8 ± 0.43****	13.1 ± 0.45 ^{####}	12.1 ± 0.47 ^{####}
Consumo energético (Kcal/cam)	1280 ± 93.68	1353 ± 18.4	1976 ± 67.53 ^{###}	1865 ± 65.7 ^{###}
Eficiência alimentar (%)	1.18 ± 0.12	1.82 ± 0.08***	1.16 ± 0.09 ^{####}	1.18 ± 0.08 ^{####}

CON, dieta controle AIN 93-G; HLLC, dieta hiperlipídica e leite condensado; HLLC+SP, dieta HLLC tratados com suco de laranja Pera; HLLC+SM, dieta HLLC tratados com suco de laranja Moro. Dados expressos como média ± EPM (n=9-10/grupo). ***p<0,001 e ****p<0,0001 vs. CON; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 e ####p<0,0001 vs. HLLC.

4.3 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS

O grupo HLLC apresentou glicose de jejum, insulina, HOMA-IR e perfil lipídico maior do que o grupo COM (p<0,0001) (Tabela 4) demonstrando que a dieta high fat e leite condensado promoveu a RI.

A glicemia de jejum do grupo HLLC foi significativamente maior do que os do grupo CONT (p<0,0001). Por outro lado, o consumo de suco de laranja Pera junto com a dieta obesogênica reduziu a glicemia de jejum em comparação ao grupo que HLLC (P<0,05).

O grupo tratado com SP (HLLC +SP) promoveu a redução significativa de todos os parâmetros bioquímicos (p<0,05), com exceção dos TGs. Observou-se a redução do HOMA-IR de 59%, demonstrando que a intervenção com suco Pera mitigou os efeitos deletério da dieta obesogênica. Por outro lado, o grupo HLLCC +SM apresentou somente redução no colesterol total (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos séricos de animais tratados com dieta hiperlipídica e leite condensado e intervenção com suco de laranja Pera e Moro.

	CON	HLLC	HLLC+SP	HLLC+SM
Glicose em jejum (mg/dl)	122 ± 5.3	191 ± 11.4****	150 ± 10.17 [#]	173 ± 12.16
Insulina em jejum (ng/ml)	0.69 ± 0.08	3.59 ± 0.4****	1.90 ± 0.33 [#]	2.82 ± 0.66
HOMA-IR	4.58 ± 0.62	37.8 ± 5.94****	15.6 ± 3.39 [#]	28.7 ± 7.87
Colesterol Total (mg/dl)	116 ± 3.98	179 ± 7.27****	149 ± 8.80 [#]	133 ± 5.62 ^{##}
Triglicerídeos (mg/dl)	122 ± 4.32	129 ± 4.59	120 ± 4.06	120 ± 2.75

CON, dieta controle AIN 93-G; HLLC, dieta hiperlipídica e leite condensado; HLLC+SP, dieta HLLC tratados com suco de laranja Pera; HLLC+SM, dieta HLLC tratados com suco de laranja Moro. Dados expressos como média ± EPM (n=7-10/grupo). ****p<0,0001 vs. CON; #p<0,05, ##p<0,01 vs. HLLC.

4.4 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO SOBRE A homeostase da glicose

No teste para avaliar a intolerância à glicose (ipGTT), o grupo HLLC+SP apresentou a curva glicêmica inferior ao grupo HLLC e o HLLC+SM manteve a curva entre esses dois grupos (Figura 7A).

O tratamento com SP reduziu significativamente a AUC do ipGTT (redução de duas vezes) aumentando a tolerância a glicose prejudicada pela dieta obesogênica (HLLC) (Figura 7B).

Semelhante ao ipGTT, no teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT) as curvas de glicemia de ambos tratamentos com suco de laranja ficaram abaixo do HLLC, sendo que a curva do grupo tratado com suco Moro permaneceu na posição intermediária (Figura 7C)

Ainda, a velocidade de decaimento da glicose (Kitt) do HLLC foi significativamente menor que o CONT. Contudo, no HLLC+SP foi observado o aumento no valor de Kitt (p<0,05) (Figura 7D). O mesmo padrão não é observado no HLLC+SM.

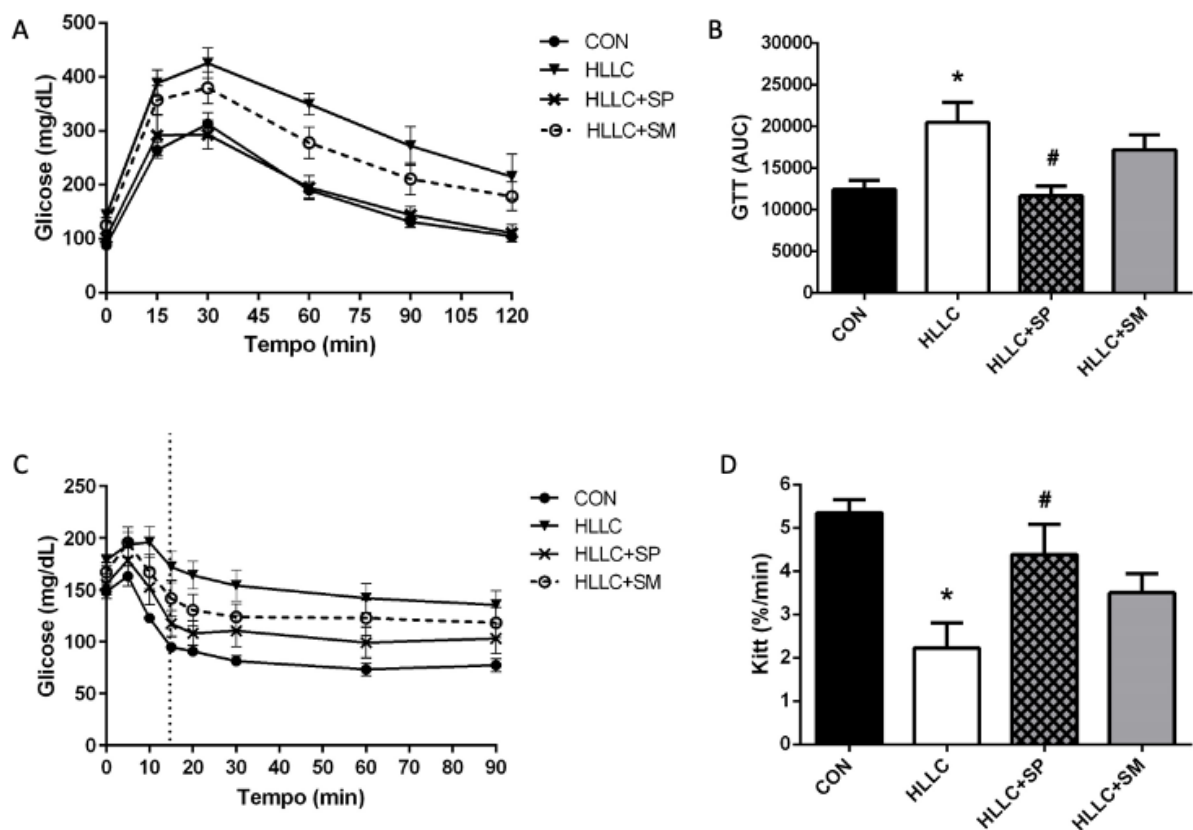


Figura 7. (A) Concentração de glicose sanguínea durante o ipGTT (B) Concentração de glicose sanguínea total durante o ipGTT expresso pela AUC. (C) Concentração de glicose sanguínea durante o ipITT. (D) Constante de decaimento da glicose sanguínea (Kitt) durante o ipITT.

Dados expressos como média \pm EPM (n=9-10/grupo). *p<0,05 vs. CONT; #p<0,05 vs. HLLC.

4.5 EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO SOBRE O PESO DO FÍGADO E CONTEÚDO LIPÍDICO HEPÁTICO

Não se observou diferença significativa no peso final dos animais entre HLLC e HLLC-tratados com sucos (Figura 8A e Figura 8B). Por outro lado, observou-se redução significativa no peso do fígado nos grupos tratados com SP e SM quando comparado ao HLLC (Figura 8C).

O Fígado do HLLC apresentou visível alteração na coloração, mas com visível melhora nos animais HLLC+SP e HLLC+SM (Figura 8D), o que é corroborado pela redução do acúmulo de TGs hepáticos nestes grupos (Figura 8E).

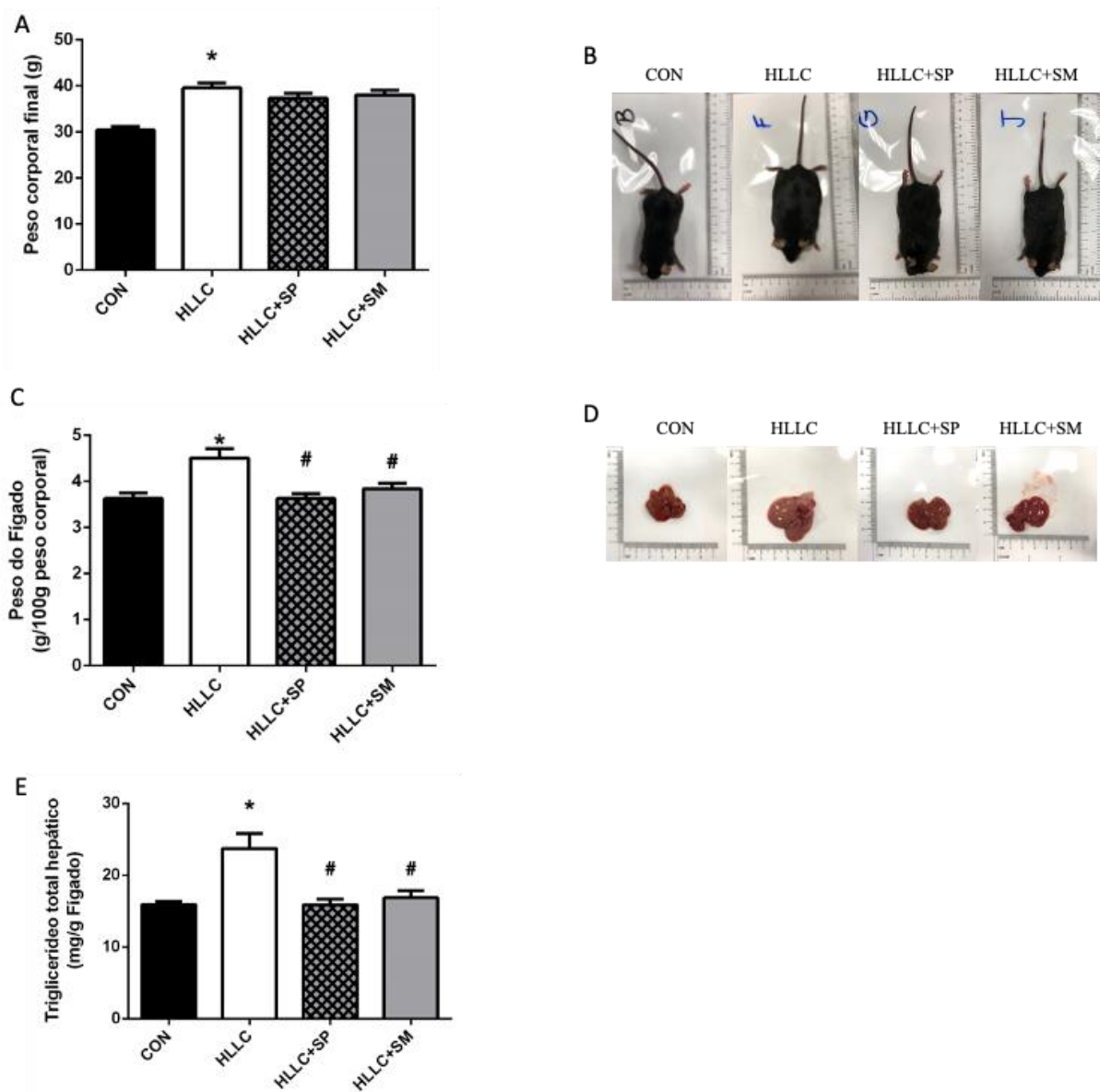


Figura 8. (A) Peso final dos camundongos por grupo. (B) Imagens representativas dos animais no dia da eutanásia. (C) Peso do fígado (D) Imagens representativas dos fígados no dia da eutanásia. (E) Concentração do triglicerídeo total hepático.

Dados expressos como média \pm EPM (n=9-10/grupo). *p<0,05 vs. CONT; #p<0,05 vs. HLLC.

4.6 EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA E LEITE CONDENSADO E DOS SUCOS DE LARANJA PERA E MORO SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HEPÁTICAS

A análise proteômica quantitativa *label-free* foi realizada em três amostras de fígado de camundongos estimulados para cada grupo experimental. Foram identificadas 1506 proteínas, das quais 507 foram validados pelos filtros aplicados no tratamento de dados e estes comparadas entre todos os grupos. A PCA mostrou que o CON se separa dos demais grupos pelo Componente 1, enquanto os grupos tratados com SP e SM se distanciam do HLLC pela componente 2 (Figura 9).

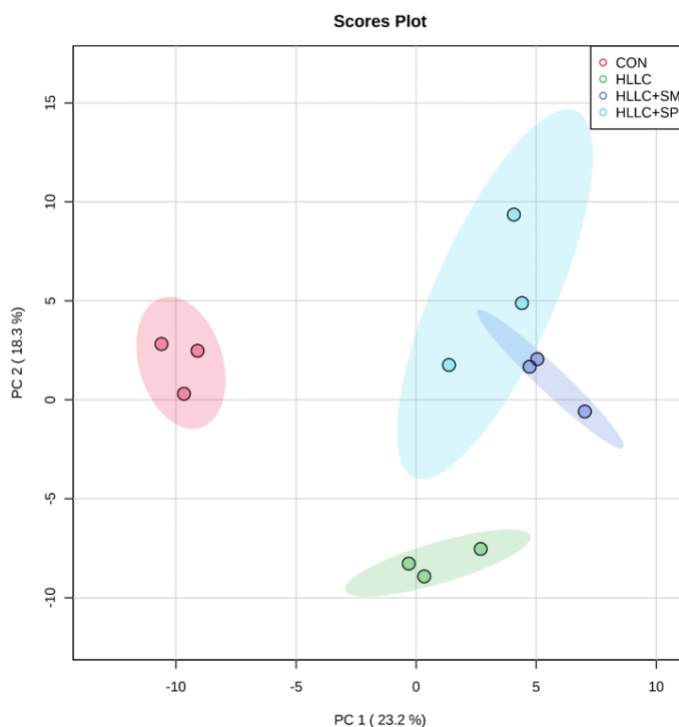


Figura 9. Análise de PCA das 507 proteínas validadas em amostras tratadas com suco de laranja Pera e Moro.

Deste total de proteínas consideradas na PCA, 153 proteínas foram diferencialmente expressas ($p < 0,05$) nos quatro grupos (Figura 10), agrupando-os em perfis CON e HLLC diferentes, e que também difere dos HLLC+SP e HLLC+SM.

Pelo heatmap observa-se quatro clusters. Os clusters dois e quatro englobam o maior número de proteínas diferencialmente expressas. No cluster dois, observa-se que o HLLC apresenta proteínas *up-regulated* comparados ao CON; e os sucos Pera e Moro promovem uma redução na expressão destas proteínas.

No cluster quatro, não se observa alteração no perfil de expressão de proteínas entre o HLLC e CON. Por outro lado, as proteínas foram *down-regulated* pelos sucos Pera e Moro (Figura 10).

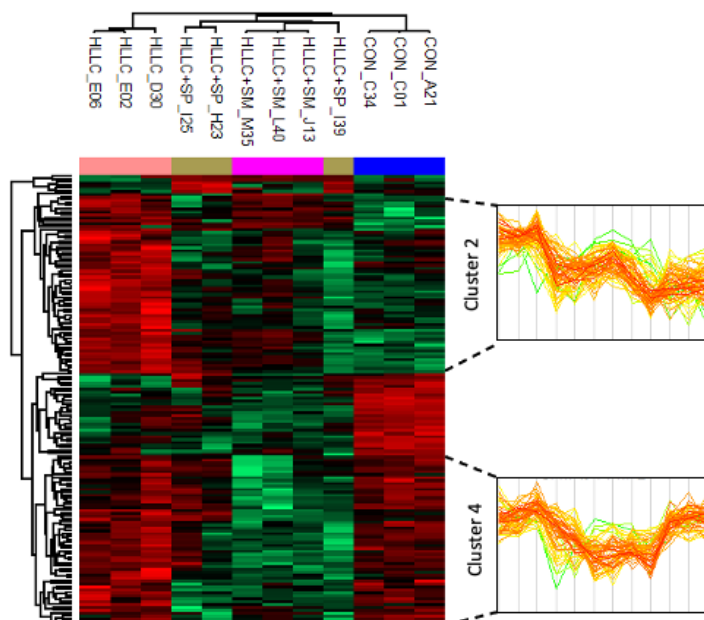


Figura 10. *Hierarchical clustering*. Padrões de abundância e perfis de expressão das 153 proteínas diferencialmente expressas. *one-way ANOVA*, $p < 0,05$.

A análise de abundância das proteínas foi realizada pelo teste t entre os grupos. Da comparação entre HLLC e CON, 40 proteínas se apresentaram *up-* (*fold change* $> 1,3$) e 20 *down-regulated* (*fold change* $< 0,769$) com $p < 0,05$ (Figura 11A). Ainda, entre HLLC+SP e HLLC foram observadas 45 proteínas *down-* e 8 *up-regulated* ($p < 0,1$); e quando considerado $p < 0,05$, destes, somente cinco proteínas foram *down-regulated* (Figura 11B). Entre HLLC+SM e HLLC foram observadas 75 *down-* e 4 *up-regulated* ($p < 0,05$) (Figura 11C).

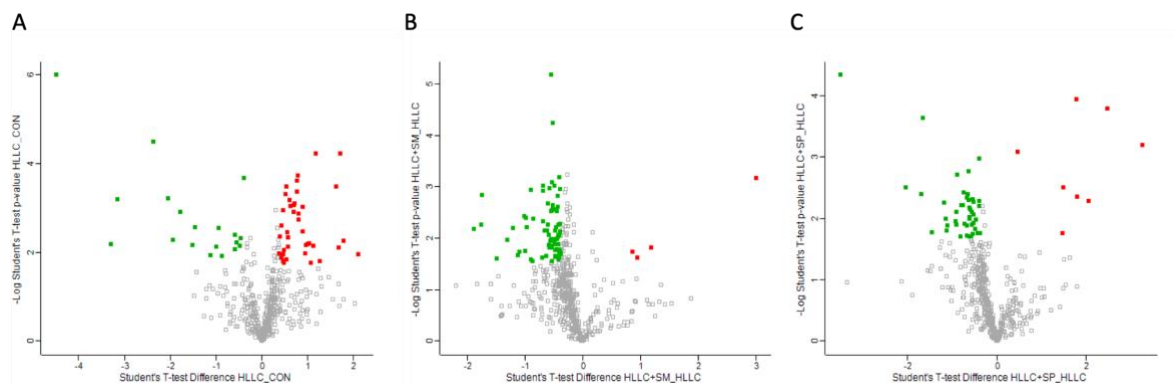


Figura 11. Volcano plots da abundância das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos. **(A)** HLLC versus CON; **(B)** HLLC+SM versus HLLC; **(C)** HLLC+SP versus HLLC. No gráfico é plotado no eixo x \log_2 *fold changes* (FC) e no eixo y \log p-valor (teste t de *Student* entre os grupos citados). Pontos vermelhos: proteínas *up-regulated* (\log_2 FC $\geq 0,378$; $p < 0,05$). Pontos verdes: proteínas *down-regulated* (\log_2 FC $\leq -0,378$; $p < 0,05$). Pontos cinzas: proteínas que não atenderam esses critérios.

Destas proteínas, quatorze proteínas são comuns às três comparações HLLC/CON, HLLC+SP/HLLC e HLL+SM/HLLC. Ainda, 12 (HLLC/CON), 18 (HLLC+SP/HLLC) e 40 proteínas (HLL+SM/HLLC) são específicas para cada grupo de comparação (Figura 12). Todas as proteínas aqui consideradas e os respectivos *fold change* estão listados na Tabela 1S (em anexo).

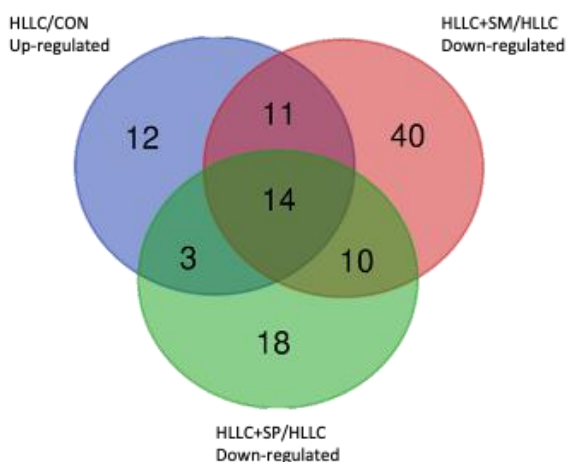
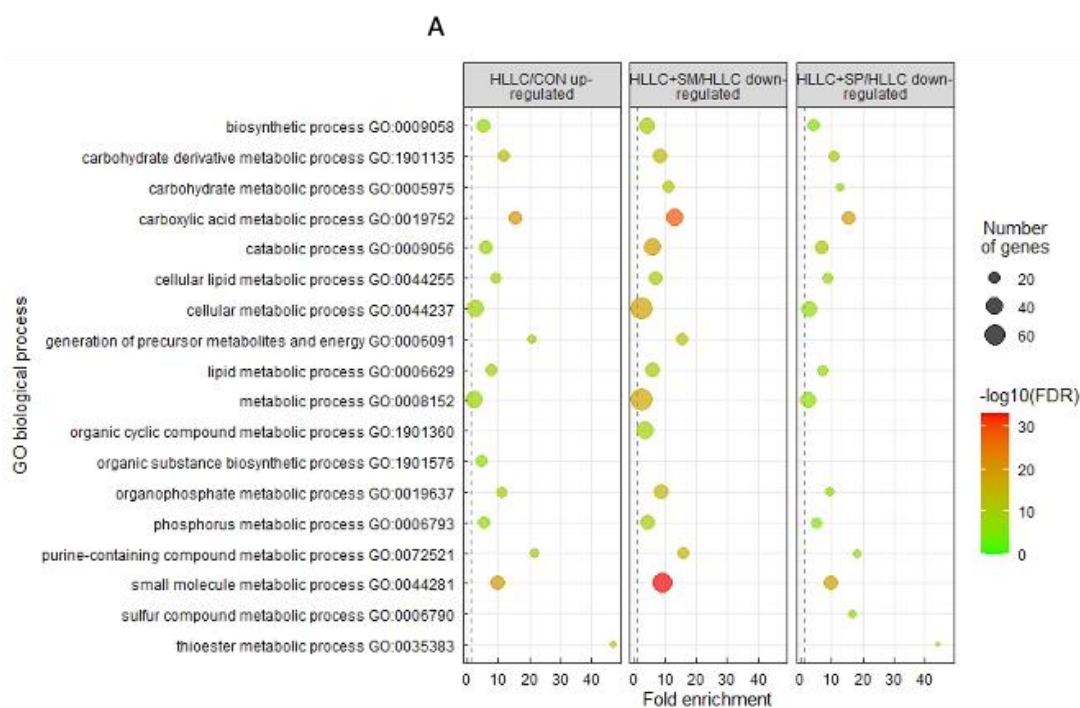


Figura 12. Diagrama de Venn das proteínas diferencialmente expressas considerando *fold change*.

Os principais processos biológicos analisados pelo *gene ontology* (GO) foram, na sua maioria, comuns às três comparações. Dentre eles, os de maior relevância estão relacionados aos processos metabólicos, envolvendo o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, o processo metabólico do ácido carboxílico, processo catabólico, processo metabólico celular e processo metabólico de pequenas moléculas (Figura 13A). Outros processos importantes que estavam significativamente alterados foram processo metabólico de lipídeos e processo biossintético.

As funções moleculares predominantes foram a catalítica e de oxi-redução (Figura 13B). Já os principais componentes celulares estão localizados no citoplasma, mitocôndria e peroxissoma (Figura 13C).



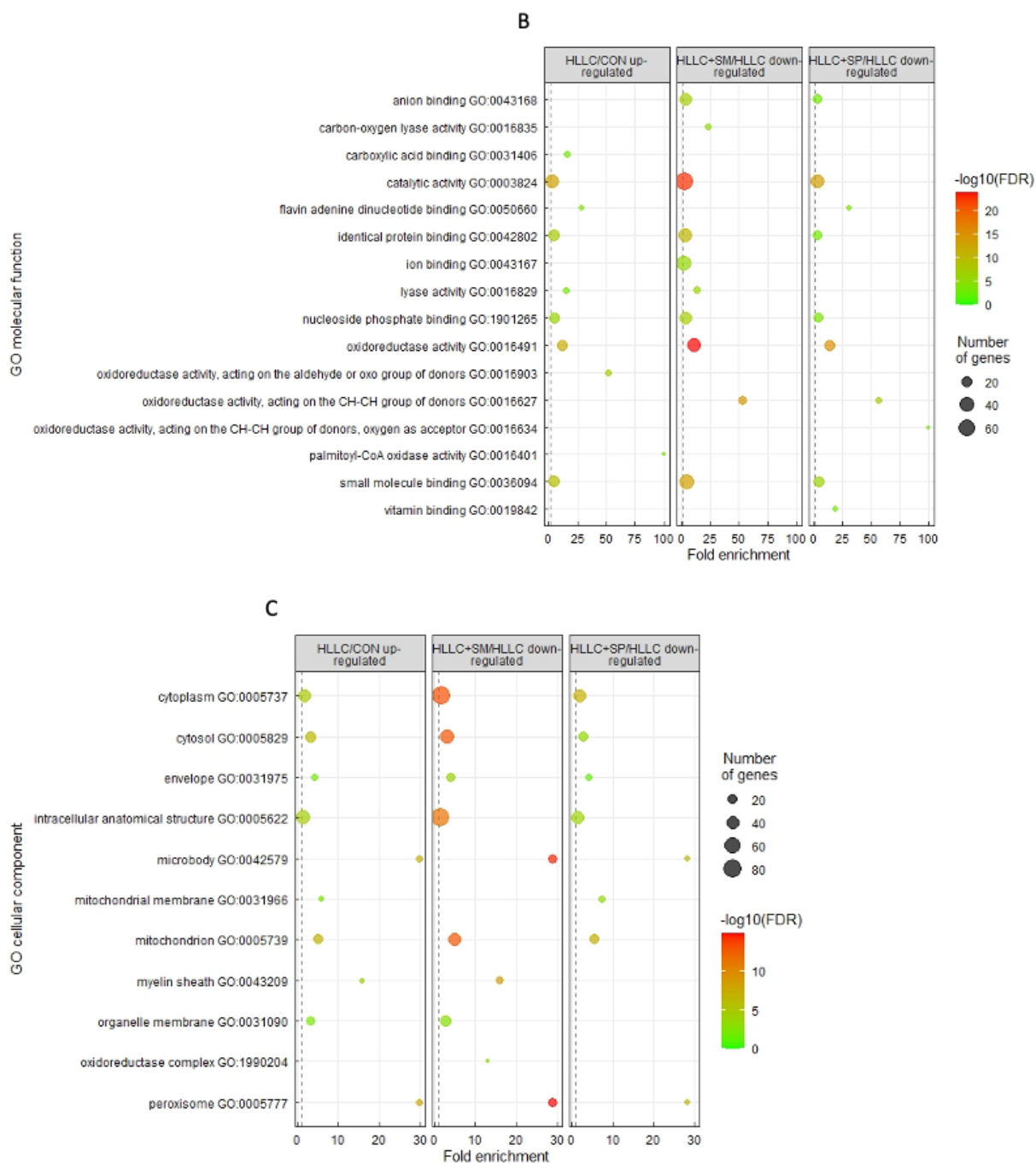
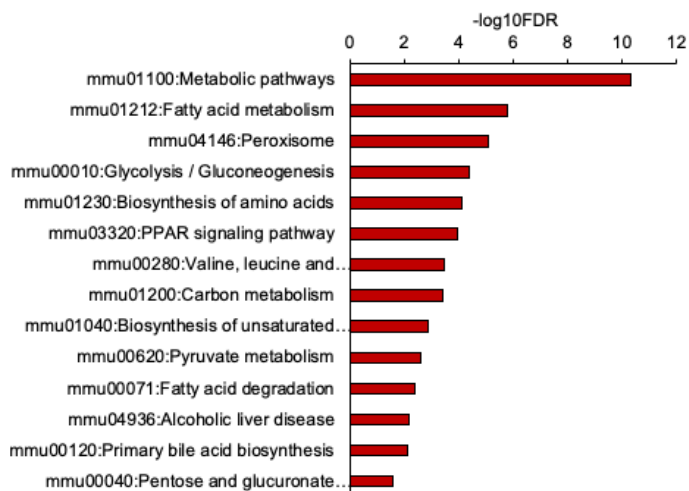


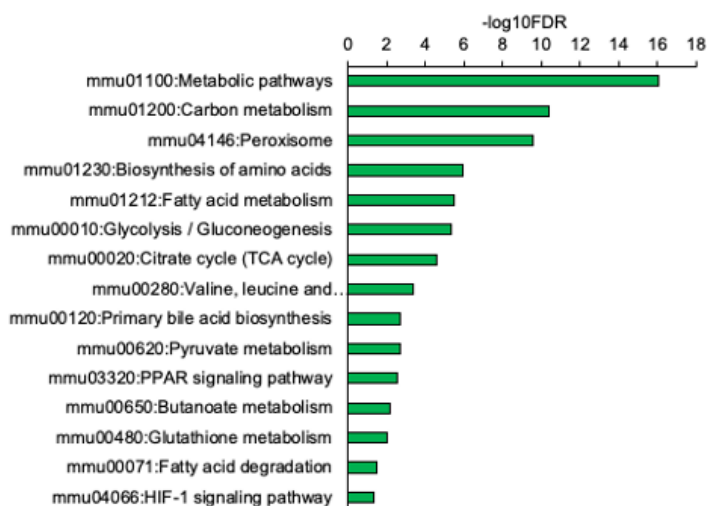
Figura 13. Análise de enriquecimento funcional do *gene ontology* (GO) das proteínas diferencialmente expressas considerando as comparações dos grupos HLLC/CON, HLLC+SP/HLLC e HLL+SM/HLLC. (A) GO processo biológico, (B) GO função molecular, (C) GO componente celular.

As principais rotas metabólicas analisadas pelo KEEG são, na sua maioria, comuns às três comparações, e envolvem: (a) o metabolismo de lipídeos sendo a biossíntese de peroxissomos, a degradação/síntese dos ácidos graxos e via de sinalização PPAR os mais relevantes; (b) metabolismo de carboidratos, glicólise/gliconeogênese e metabolismo do piruvato; e (c) metabolismo de proteínas, principalmente a degradação dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (Figura 14).

A



B



C

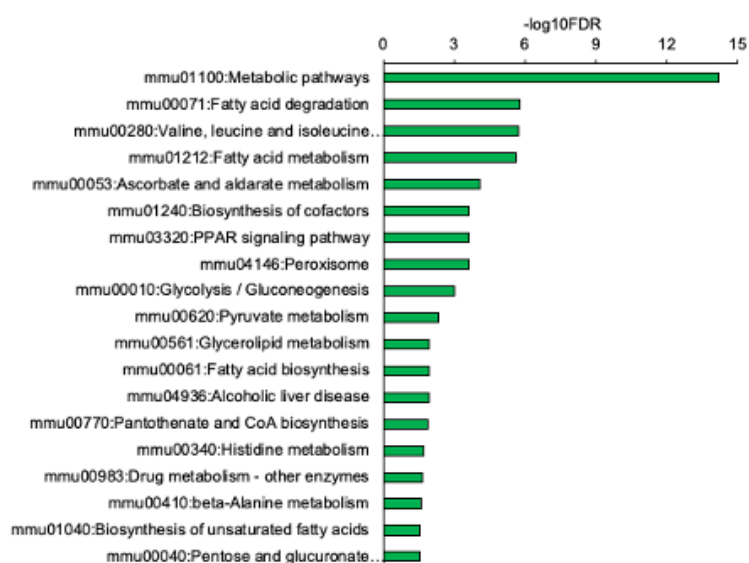


Figura 14. Análise de enriquecimento das vias metabólicas avaliadas pelo KEEG considerando as comparações.

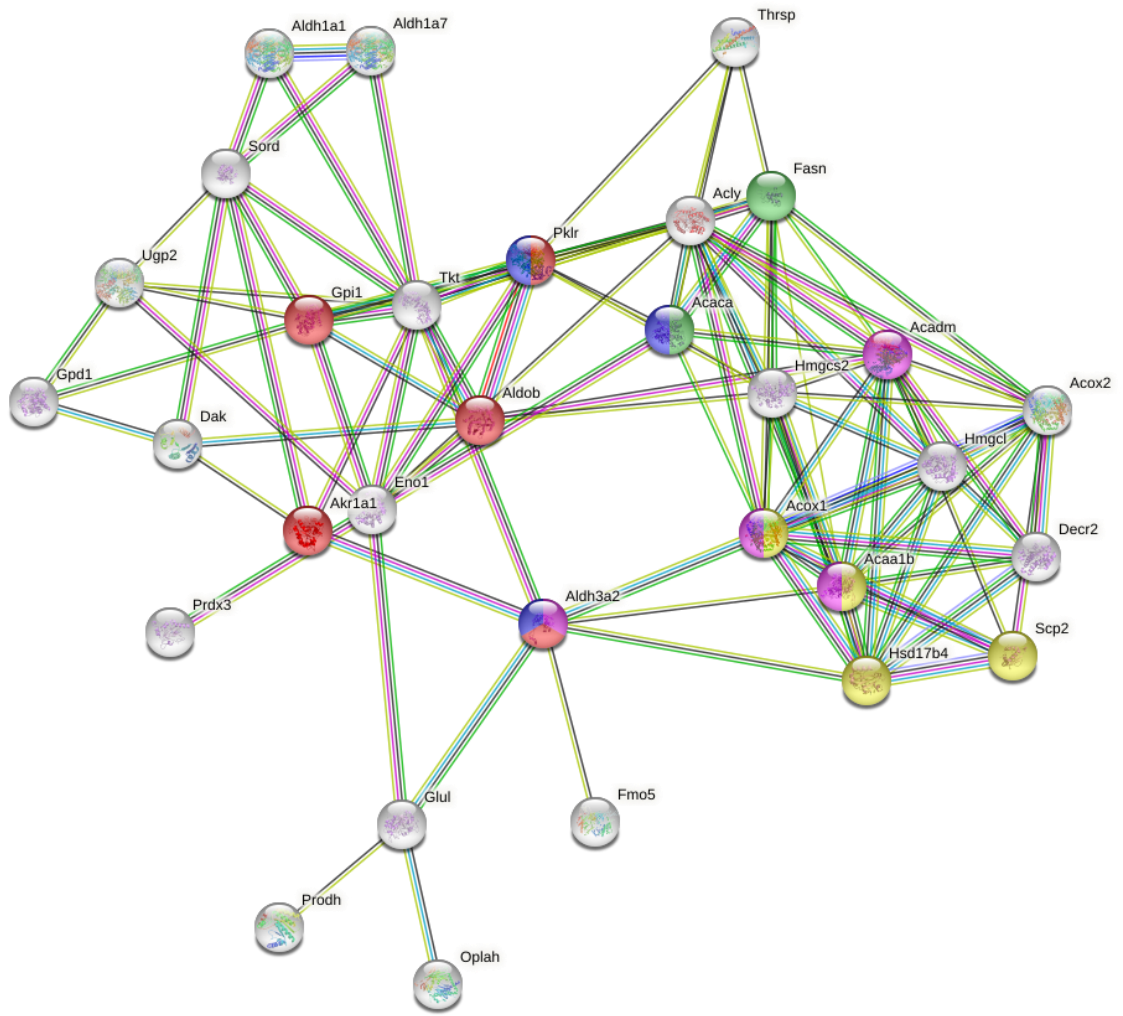
(A) proteínas *up-regulated* HLLC/CON, (B) proteínas *down-regulated* HLLC+SM/HLLC, (C) proteínas *down-regulated* HLLC+SP/HLLC.

A análise de interação proteína-proteína do grupo HLLC/CON indica que dentro do metabolismo lipídico observa-se forte interação das proteínas envolvidas na biossíntese de AG insaturados, além da β -oxidação. Considerando a biossíntese de AGs, duas importantes proteínas se encontram diferencialmente expressas, a *Acetyl-CoA carboxylase* (Acaca) e *Fatty acid synthase* (FASN), enzimas chaves na lipogênese. Ainda, na biossíntese de AGs insaturados encontra-se a *peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1* (ACOX1), *3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal* (ACAA1B), *peroxisomal multifunctional enzyme type 2* (HSD17B4) e *non-specific lipid-transfer protein* (SCP2) (Figura 15A). A alteração no *fold changes* destas proteínas está apresentada na Figura 16A e Figura 16B.

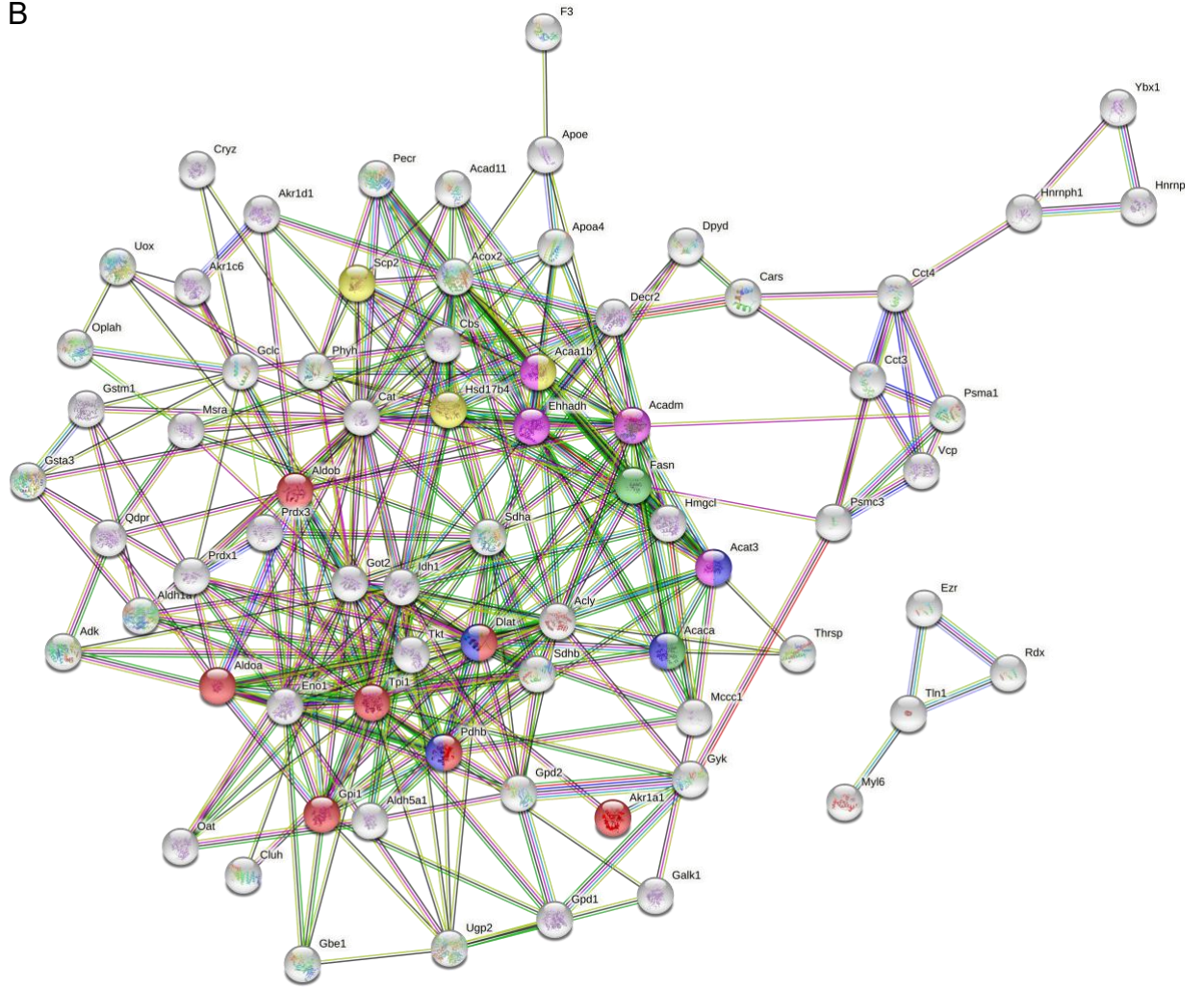
ACAA1B e HSD17B4 também são evidenciadas no grupo HLLC+SP/HLLC e HLLC+SM/HLLC (Figura 15B e Figura 15C, respectivamente), SCP2 no grupo do SM e *3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal* (ACAA1A) foi observado somente no SP. Além desses, a enzima *long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1* (ACSL1), envolvida na biossíntese do AG foi evidenciada somente no suco Pera.

No metabolismo de carboidratos evidencia-se enzimas chaves da via glicolítica e do metabolismo do piruvato, entre elas a *glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic* (GPI1), *fructose-bisphosphate aldolase B* (ALDOB) e *pyruvate kinase* (PKLR) no HLLC/CON (Figura 15A), o qual apresenta forte interação com a via da lipogênese (ACACA). Das enzimas chaves da via glicolítica, a GPI1, ALDOB e a *pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial* (PDHB) foram evidenciadas no HLLC+SM/HLLC, e a *phosphoglycerate mutase 1* (PGAM1) e ALDOB no HLLC+SP/HLLC (Figura 15B e Figura 15C, respectivamente). A alteração nos *fold changes* destas proteínas está apresentada na Figura 16E e Figura 16F.

A



B



C

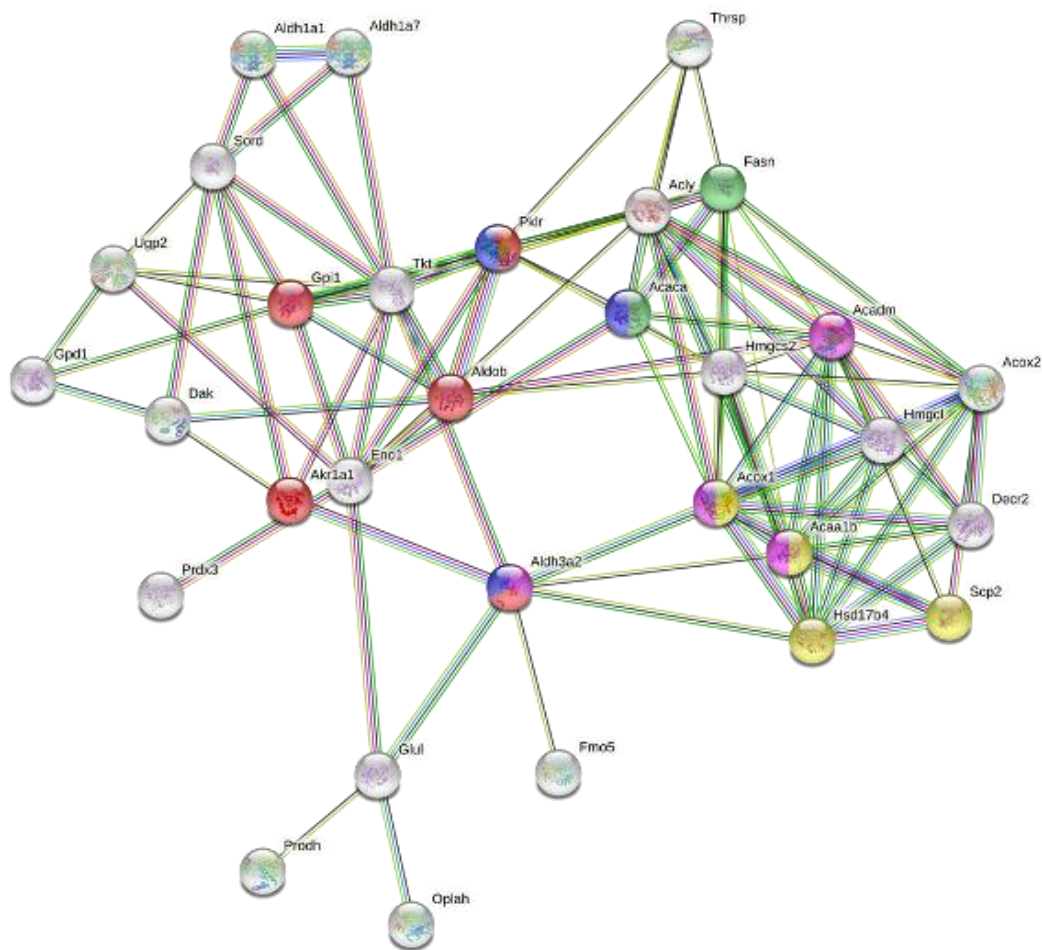


Figura 15. Interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente expressas do metabolismo lipídico e de carboidratos comuns às três comparações. (A) HLLC/CON; (B) HLLC+SM; (C) HLLC+SP. Cores dos nós: verde: biossíntese dos AG; amarelo: biossíntese dos AG insaturados; vermelho: glicólise/gliconeogênese; roxo: metabolismo do piruvato; rosa: β -oxidação.

No grupo HLLC observou-se aumento da expressão das proteínas ACAA1B, ACOX1, HSD17B4 e *peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase* (DECR2) relacionadas a β -oxidação peroxissomal (Figura 16C e Figura 16D). Por outro lado, nos grupos HLLC+SM/HLLC e HLLC+SP/HLLC as proteínas desta via se mostraram *down-regulated*, sendo essas enzimas as ACAA1B, DECR2, HSD17B4 e *peroxisomal bifunctional enzyme* (EHHADH) para SM, e ACAA1B, ACAA1A, ACSL1 e HSD17B4 para SP.

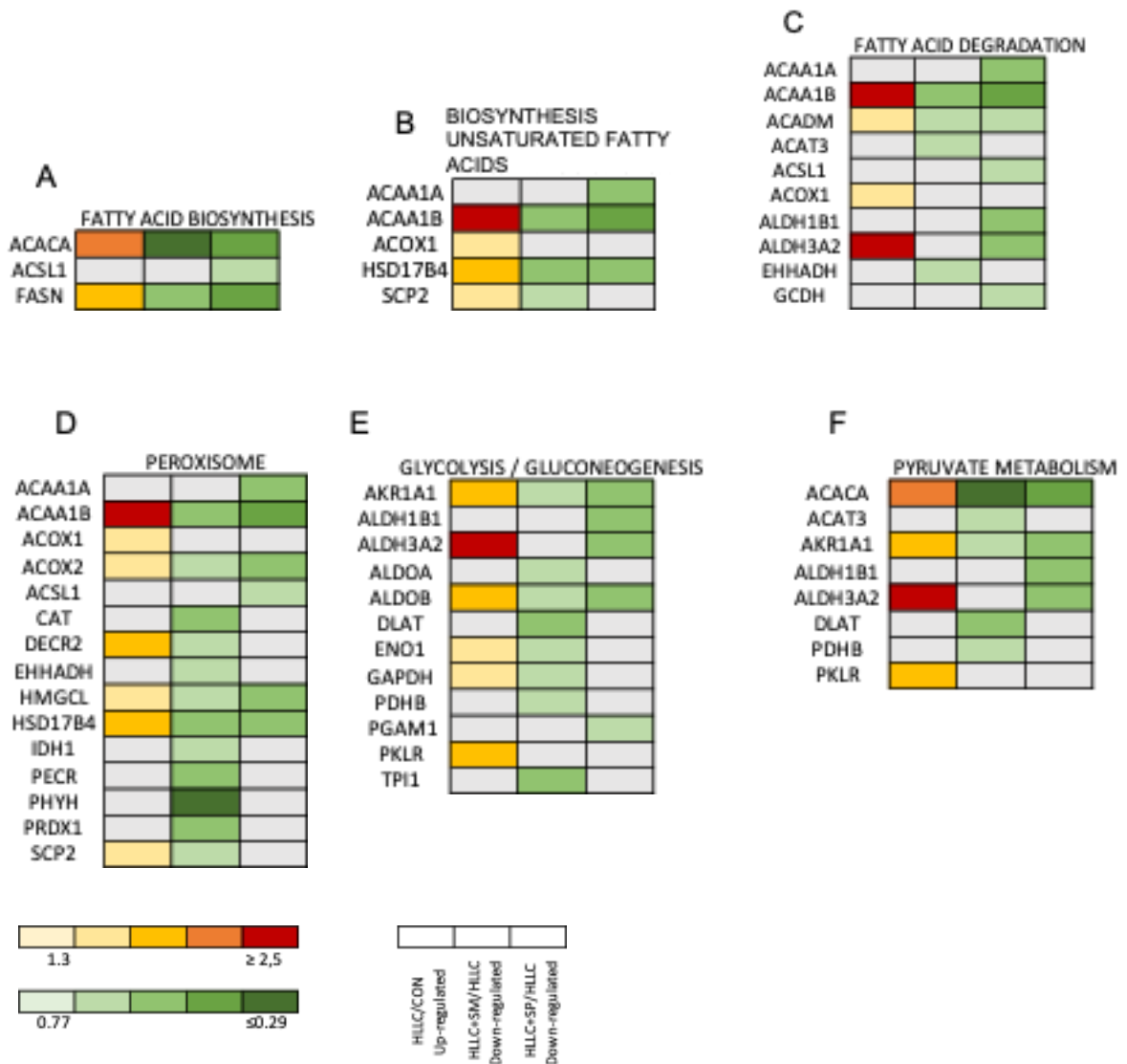


Figura 16. *Fold changes* das proteínas diferencialmente expressas das vias metabólicas de lipídeos e carboidratos enriquecidas – KEGG.

5. DISCUSSÃO

O consumo crônico de dietas hipercalóricas, que são caracterizadas pela alta concentração de gordura e açúcar, é uma das causas do aumento da prevalência da obesidade e comorbidades associadas, sendo por isso, muito utilizadas em modelos com roedores, mimetizando a gênese e disfunções metabólicas decorrentes da obesidade humana (PANDIT et al., 2012; MASI et al., 2017). O presente estudo administrou aos camundongos uma dieta hiperlipídica (45% de gordura composta de aproximadamente 31% de banha sobre o valor energético total) e leite condensado (72% de carboidrato composto de aproximadamente 55% de sacarose sobre o valor energético total) que provocaram aumento do peso corporal, depósito de gordura retroperitoneal, reduziu a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, induzindo a um quadro de resistência insulínica.

Os camundongos alimentados com dieta HLLC apresentaram maior ganho de peso corporal, mesmo tendo ingerido a quantidade de calorias similar ao grupo que consumiu dieta controle, indicando ausência de hiperfagia. Vale ressaltar que vários estudos que utilizaram dietas obesogênicas, fontes de açúcares simples e gorduras saturadas, apresentaram o ganho de peso expressivo dos animais acompanhado de hiperfagia (SAMUELSSON et al., 2008; NIVOIT et al., 2009; YANG et al., 2012; LEE et al., 2013).

Alterações na composição da dieta podem provocar obesidade em animais independente do aumento da ingestão calórica, pois induzem o organismo a um estado intensamente anabólico, mediado por elevada concentração de insulina circulante estimulada pelo alto consumo de carboidratos simples, favorecendo o armazenamento no tecido adiposo em detrimento à oxidação das mesmas em tecidos metabolicamente ativos como o músculo, coração e fígado (LUDWIG; FRIEDMAN, 2014; HALL, 2017). Modelos que utilizam dietas hiperglicídicas, portanto, suprimem a lipólise no tecido adiposo e direcionam os ácidos graxos e glicose circulantes para serem estocados neste tecido, induzindo a lipogênese e, por conseguinte, ocorre uma redução do gasto de energia compensatório à perda de substratos energéticos (HALL, 2017). Já vários modelos que utilizaram dietas hiperlipídicas demonstraram maior ganho de peso, porém com menor ingestão alimentar e similar consumo calórico comparados à dieta padrão, devido à densidade energética da dieta composta de alta concentração de gordura. Olsen et al. (2016) observaram maior ganho de peso em

camundongos C57BL/6 que consumiram dieta hiperlipídica, sem diferença na ingestão calórica entre os que consumiram uma dieta equilibrada, evidenciando, através da avaliação do gasto energético, que a taxa metabólica basal permaneceu inalterada em relação aos camundongos alimentados com dieta controle, enquanto a taxa metabólica ativa foi significativamente menor.

Em contrapartida às dietas obesogênicas, o suco de laranja por conter compostos bioativos, como os flavonoides, tem o potencial de minimizar os efeitos metabólicos deletérios do desenvolvimento da obesidade. A hesperidina foi a principal flavanona encontrada nos sucos de laranja Pera e Moro, seguida da narirutina, conforme observado em outros estudos com *citrus* (KELEBEK; CANBAS; SELLI, 2008; KELEBEK et al., 2009; GATTUSO et al., 2007; PUPIN; DENNIS; TOLEDO, 1998). A antocianina predominante na laranja moro foi a cianidina 3-O-glicosídeo (C3G), encontrada em concentração quatro vezes menor que a do estudo conduzido por Kelebek et al. (2008). Porém, resultados mais próximos ao encontrado pelo presente estudo (30 mg/L) também foram observados por Riso et al. (2005) e Scalzo et al. (2004), cujos valores de C3G no suco de laranja moro foram de 35 mg/L e 82,5 mg/L, respectivamente. Diferenças na concentração de antocianinas entre os sucos de laranja sanguíneas podem ser devido às condições climáticas da região produtora, já que o acúmulo destes compostos nos frutos é fortemente dependente do frio (BUTELLI et al., 2012).

A administração dos sucos de laranja não interferiu no ganho de peso dos animais e no acúmulo de gordura nos tecidos adiposos visceral quando comparado ao HLLC. Mesmo apresentando maior consumo calórico, a eficiência alimentar foi menor nos grupos tratados com suco. Resultado divergente foi observado em um estudo com suco de laranja Moro, em que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com esse suco, apresentaram redução do ganho de peso excessivo, atribuindo esse resultado, a não somente a presença de antocianinas, mas também aos múltiplos componentes presentes no suco que podem agir em sinergia para inibir o acúmulo de gordura (TITTA et al., 2010).

O suco de laranja Pera minimizou os efeitos deletérios da dieta HLLC sobre a tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, reduzindo também, significativamente, a glicemia em jejum, resultados estes não observados pelo consumo de suco de laranja Moro, apesar dos valores demonstrarem uma aparente melhora nestes parâmetros.

Os flavonoides são conhecidos por seu potencial anti-inflamatório, entre outros efeitos biológicos. A hesperidina e naringina, também flavonoides de citrus, suprimiram a produção de TNF- α e IL-6 em ratos com DM2. Essas citocinas pró-inflamatórias possuem correlação positiva com a resistência à insulina que precede o DM2 e, portanto, sua redução significaria aumento da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (MAHMOUD et al., 2012). Entretanto, não foi observado em nosso ensaio alteração na concentração de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF-alfa, IL 1b) e anti-inflamatória (IL-1) (dados não apresentados).

Para investigar os efeitos dos sucos de laranja Pera e Moro na expressão de proteínas do fígado de animais alimentados com dieta HLLC, foi realizada a análise de proteoma shotgun label-free. Aproximadamente 70% das proteínas diferencialmente expressas (DEPs) identificadas no fígado de camundongos obesos HLLC foram *up-regulated*, comparadas ao CON. Baseado nos dados de enriquecimento da anotação funcional e identificação dessas proteínas nas vias metabólicas enriquecidas, as alterações envolveram, principalmente, o metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas. Dessa forma, para avaliar os efeitos benéficos do SP e SM, selecionou-se as proteínas *down-regulated* (84% e 95% das DEPs, respectivamente) quando comparadas com o HLLC, e após as análises de enriquecimento, foi observado que essas proteínas também faziam parte, predominantemente, dos mesmos metabolismos afetados pela dieta HLLC.

A dieta HLLC induziu a RI com uma hiperglicemia e hiperinsulinemia. Esta sobrecarga acarretou em aumento da expressão de enzimas chaves da via glicolítica e do metabolismo do piruvato, que incluem GPI1, ALDOB, ENO1, PKLR e ACACA. Este aumento, por sua vez, induziu a lipogênese *de novo*, também evidenciado pelo aumento da expressão de enzimas ACACA e FASN. A maior parte destas enzimas *up-regulated* pela dieta HLLC foram *down-regulated* nos grupos SP e SM promovendo menor lipogênese *de novo*, e assim reduzindo o acúmulo de gordura hepática, evidenciado pela redução na concentração de triglicerídeos hepático e peso do fígado. Estes efeitos podem ser um dos mecanismos de melhora da RI observado no suco Pera e menos evidenciado no suco Moro.

A produção de triglicerídeos no fígado a partir de carboidratos simples requer diversas vias metabólicas, entre essas a glicólise e a oxidação do piruvato para gerar acetil-CoA destinado à síntese lipídica. Na via glicolítica, que ocorre no citoplasma, a

GPI (glicose-fosfato isomerase) catalisa a conversão da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, a ALDOB divide, de forma reversível, a frutose-1,6-difosfato em duas trioses fosfatadas, a diidroxiacetona-fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP), a ENO1 promove a desidratação da 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato e a PKLR que catalisa a conversão da fosfoenol-piruvato em piruvato que é oxidado a acetil-CoA na mitocôndria. Essa molécula, então, entra no ciclo de Krebs e se une ao oxaloacetato para formar o citrato, que é transportado para o citoplasma, em condições de alta oferta de glicose e aumento de concentração de insulina, onde é convertido em oxaloacetato e acetil-CoA, que é substrato para a lipogênese *de novo* (POSTIC E GIRARD, 2008). ACACA e FASN são enzimas chaves da lipogênese *de novo*, sendo a primeira responsável por catalisar a carboxilação da acetil-CoA para formar malonil-CoA, e a segunda por catalisar a síntese de palmitato a partir da malonil-CoA (BERNARD et al., 2016).

O enriquecimento da via da biossíntese de ácidos graxos foi verificado somente para o grupo HLLC+SP/HLLC, porém as duas enzimas principais desta via, ACACA e FASN, estavam diferencialmente expressas nos grupos HLLC+SM/HLLC e HLLC/CON, o que indica que esta via também estava alterada pelo tratamento com suco moro e dieta hiperlipídica. De fato, essa observação é reforçada pelo enriquecimento da via da biossíntese de ácidos graxos insaturados estar presente nos três grupos. O suco Pera, possivelmente teve essa via significativamente enriquecida, pela presença de mais uma terceira enzima diferencialmente expressa *down-regulated*, a ACLS-1, que está envolvida na síntese de lipídeos hepáticos, a partir do aumento de ácidos graxos livres circulantes, fato que pode ter contribuído para os melhores resultados deste suco contra os efeitos deletérios de uma dieta obesogênica. Parkes et al.(2006) investigou o papel da ACLS-1 na regulação do metabolismo lipídico, através da superexpressão desta enzima em fígado de camundongos e observou um aumento de 95% no acúmulo de TG hepático, sugerindo que a ACLS-1 tem papel primordial na regulação da síntese de TG no fígado.

Há poucas evidências que possam atribuir um efeito dos flavonoides na obesidade, porém possíveis ações benéficas envolveriam a modulação do metabolismo lipídico, na redução da lipogênese hepática e aumento da oxidação de ácidos graxos (GALLEANO et al., 2012; MULVIHILL et al., 2009). A melhora da sensibilidade à insulina, a maior captação de glicose pelo músculo e o aumento na

tolerância à glicose foi observada em camundongos com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e suplementada de naringenina, devido ao aumento da oxidação hepática de ácidos graxos (MULVIHILL et al., 2009).

Em obesos com resistência à insulina foi observado que as enzimas da via β -oxidação estavam *up-regulated*, resposta semelhante foi encontrada por outros estudos, o que corrobora os resultados encontrados em nosso experimento (EDVARDSSON et al., 2003; KNEBEL et al., 2018; ZEMBROSKI et al., 2021). Esses dados reforçam que a Síndrome Metabólica é acompanhada do aumento da oxidação lipídica peroxissomal, a fim de enfrentar a dislipidemia e hipercolesterinemia causada pelo acúmulo de lipídeos hepáticos.

A etapa inicial da síntese lipídica e da β -oxidação mitocondrial é a ativação dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) por CoA , produzindo moléculas de acil-CoA no citoplasma, em uma reação catalisada pelas acil-CoA sintetases (ACs), que também são responsáveis por direcioná-las para a via anabólica ou catabólica (MASHEK et al., 2006). Na condição de resistência à insulina, o aumento do influxo de AG para o fígado induz a expressão elevada da ACSL-1, a isoforma predominante das ACs neste tecido, que então direcionará as acil-CoA para a síntese de triglicerídeos em detrimento à β -oxidação mitocondrial (LI et al., 2009; YAN et al., 2015).

O presente estudo não identificou diferença na expressão da ACSL-1 no grupo HLLC comparado ao grupo CON, ainda que os animais estivessem insulino-resistentes e com alto conteúdo de TG, porém a via da β -oxidação estava aumentada, o que sugere que houve um aumento compensatório da oxidação dos AG nos peroxissomos, devido à β -oxidação mitocondrial estar prejudicada (LI et al., 2009). Esse redirecionamento é ratificado pelo enriquecimento da via de sinalização dos PPAR, importantes fatores de transcrição, que ativados por AGCL aumentam a expressão de genes da oxidação peroxissomal lipídica, como a ACAA1B e ACOX-1, presentes *up-regulated* no grupo HLLC/CON. Neste grupo também é *up-regulated* para β -oxidação a enzima DECR2. Os sucos Pera e Moro apresentaram as enzimas da β -oxidação peroxissomal *down-regulated*, ACAA1B, ACAA1A, ACSL1 E HSD17B4 para SP e as proteínas ACAA1B, DECR2, HSD17B4 E EHHADH para SM, respectivamente, e uma vez que promoveram a redução da lipogênese poderiam, por conseguinte, ter reduzido a oxidação lipídica.

6. CONCLUSÃO

Os sucos de laranja Pera e Moro não apresentaram efeito protetivo contra a obesidade, porém seu consumo não foi relacionado ao ganho de peso corporal, devido a reduzida eficiência energética ao final do protocolo experimental. O suco de laranja Pera diminuiu a hiperglicemia e a hiperinsulinemia, o que acarretou em um menor valor de HOMA-IR, promovendo, portanto, melhora na resistência à insulina induzida pela dieta obesogênica. De fato, foi observado aumento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina sob estímulo. Esses efeitos foram acompanhados por redução do peso do fígado e do conteúdo de triglicerídeos hepático, para ambos os sucos.

Essas alterações fenotípicas foram relacionadas aos efeitos dos sucos de laranja no metabolismo de carboidratos e de lipídeos no fígado. Foram identificadas mudanças na expressão de enzimas relacionadas à glicólise e lipogênese de novo, em que os sucos de laranja reduziram a expressão dessas enzimas, sugerindo que esses sucos possam regular vias metabólicas, a fim de mitigar os efeitos metabólicos deletérios promovidos pela obesidade associada a resistência à insulina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anhê, F. F.; Roy, D.; Pilon, G.; Dudonné, S.; Matamoros, S.; Varin, T. V.; Garofalo, C.; Moine, Q.; Desjardins, Y.; Levy, E.; et al., (2015). A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice, *Gut*, 64, 872–883.
- Anhê, F.F.; Nachbar, R. T.; Varin, T.V.; Vilela, V.; Dudonné, S.; Pilon, G.; Fournier, M.; Lecours, M.A.; Desjardins, Y.; Roy, D.; et al., (2017) A polyphenol-rich cranberry extract reverses insulin resistance and hepatic steatosis independently of body weight loss, *Mol Metab.* 6, 1563–1573
- Aranaz, P.; Romo-Hualde, A.; Navarro-Herrera, D.; Zabala, M.; López-Yoldi, M.; González-Ferrero, C.; Gil, A. G.; Martínez, J.A.; Vizmanos, J.L.; Milagro, F.I.; et al. (2019) Low doses of cocoa extract supplementation ameliorate diet-induced obesity and insulin resistance in rats, *Food Funct.*10, 4811–4822.
- Barreca, D.; Bellocco, E.; Leuzzi, U.; Gattuso, G. (2014). First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. **Food Chemistry** 149:244–252.
- Bastos, D. H. M.; Rogero, M. M.; Arêas J. A. G. (2009). Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 53 (5): 646-656.
- Benard O.; Lim J.; Apontes P.; Jing X.; Angeletti R.H.; Chi Y. (2016). Impact of high-fat diet on the proteome of mouse liver. **J Nutr Biochem.** 31:10-9.
- Blitters, W.P. (1961). Physical characters and chemical composition as affected by scions and rootstocks. In: SINCLAIR, W.B. (Ed.) *The orange: Its Biochemistry and Physiology*, The University of California, Riverside, p. 56-95.
- Bonina F.P.; Leotta, C.; Scalia, G.; Puglia, C.; Trombetta, D.; Tringali, G. et al. (2002). Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. **Diabetes Nutr Metab.**15:14-9.
- Bonora, E. et al. (1989). Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 68, p. 374–378.

- Buscemi, S.; Rosafio, G.; Arcolego, G.; Mattina, A.; Canino, B.; Montana, M.; Verga, S.; Rini, G. (2012). Effects of red orange juice intake on endothelial function and inflammatory markers in adult subjects with increased cardiovascular risk. **Am J Clin Nutr** 95: 1089–1095.
- Butelli, E. et al. (2012). Retrotransposons control fruit-specific, cold-dependent accumulation of anthocyanins in blood oranges. **Plant Cell**. 24: 1242–1255.
- Cai, D.; Yuan, M.; Frantz, D.F.; Melendez, P.A.; Hansen, L.; Lee, J.; Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF- kappaB. **Nat. Med.** 11: 183–190.
- Cardile, V.; Frasca, G.; Rizza, L.; Rapisarda, P.; Bonina, F. (2010). Antiinflammatory effects of a red orange extract in human keratinocytes treated with interferon-gamma and histamine. **Phytotherapy Research** 24:414–8.
- Carnauba, R.A.; **Hassimotto, N.M.A.**; [Lajolo, F.M.](#) (2020) Estimated dietary polyphenol intake and major food sources of Brazilian population. **British Journal of Nutrition**, v. 126, p. 441-448.
- Chaves, D.F.S.; Carvalho, P.C.; Brasili, E.; Rogero, M.M.; **Hassimotto, N.M.A.**; Diedrich, J.K.; Moresco, J.J.; Yates, J.R. 3RD, Lajolo, F.M. (2017) Proteomic analysis of peripheral blood mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal with orange juice. **Journal of Proteome Research**, v. 16, p. 4086–4092.
- Chen, Y.-R.; Lai, Y.-I.; Lin, S.-da; Li, X.-t.; Fu, Y.-C.; Xu, W.-C. (2013). SIRT1 interacts with metabolic transcriptional factors in the pancreas of insulin-resistant and calorie-restricted rats. **Mol. Biol. Rep.** 40:3373–3380.
- Cheng, C. *et al.* (2019) Treatment implications of natural compounds targeting lipid metabolism in nonalcoholic fatty liver disease, obesity and cancer. **International Journal of Biological Sciences**, 15, 1654-1663.
- Coelho R. C. L. A.; Hermsdorff H. H. M.; Bressan J. (2013) Anti-inflammatory Properties of Orange Juice: Possible Favorable Molecular and Metabolic Effects. **Plant Foods Hum Nutr.** 68:1–10.
- Cordenunsi, B.R., Shiga, M.S. & Lajolo, F. (2008). Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicão). **Carbohydrate Polymers**, 71, 26-31.
- Corrêa, T.A.F.; Rogero, M.M.; **Hassimotto, N.M.A.**; Lajolo, F.M. (2019) The two-way polyphenols-microbiota interactions and their effects on obesity and related metabolic diseases. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, Article 188.

- Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol.** 26(12):1367–1372.
- Cox, J. et al. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **J. Proteome Res.** 10, 1794–1805.
- Cox, J. et al. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. **Mol. Cell. Proteomics** 13, 2513–2526.
- De Luca, C.; Olefsky, J. M. (2008). Inflammation and insulin resistance. **FEBS Lett.** 582: 97–105.
- De Vos A.; Heimberg H.; Quartier E.; Huypens P.; Bouwens L.; Pipeleers D.; Schuit F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. **J Clin Invest.** 96: 2489 –2495.
- Díaz-Rubio, M. E.; Pérez-Jiménez, J.; Martínez- Bartolomé, M. A.; Álvarez, I.; Saura-Calixto, F. (2015) Regular consumption of an antioxidant-rich juice improves oxidative status and causes metabolome changes in healthy adults, **Plant Foods Hum. Nutr.**, 70, 9–14.
- Donath M.Y.; Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nat Rev Immunol.** 11:98–107.
- Edvardsson U.; von Löwenhielm H.B.; Panfilov O.; Nyström A.C.; Nilsson F.; Dahlöf B. (2003). Hepatic protein expression of lean mice and obese diabetic mice treated with peroxisome proliferator-activated receptor activators. **Proteomics.** (4):468-78.
- Esser, N.; Legrand-Poels, S.; Piette, J.; Scheen, A. J.; Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 105: 141–150.
- FAO. Faostat – Statistics Database. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#search/orange>>. Acesso em 08 de setembro de 2017.
- Fraga, L.N.; Coutinho, C.P.; Rozenbaum, A.C.; Tobaruela, E.C.; Lajolo, F.M.; Hassimotto, N.M.A. (2021) Blood pressure and body fat % reduction is mainly related to flavanone phase II conjugates and minor extension by gut-derived phenolic acid after long-term intake of orange juice. **Food and Function** 12, 11278–

11289. Galleano, M. et al. (2012). Flavonoids and metabolic syndrome. **Ann N Y Acad Sci.** 1259:87–94.
- Gattuso, G.; Barreca, D.; Garguilli, C.; Leuzzi, U.; Coristi, C. (2007). Flavonoid composition of citrus juice. **Molecules.** 12: 1641–1673.
- Ghanim, H.; Sia, C. L.; Upadhyay, M.; Korzeniewski, K.; Viswanathan, P.; Abuaysheh, S. et al. (2010). Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. **Am. J Clin. Nutr.** 91: 940–9.
- Giordano, L.; Coletta, W.; Tamburrelli, C.; D'Imperio, M.; Crescente, M. et al. (2012). Four-week ingestion of blood orange juice results in measurable anthocyanin urinary levels but does not affect cellular markers related to cardiovascular risk: a randomized cross-over study in healthy volunteers. **Eur J Nutr.** 51:541–548.
- Grosso, G.; Galvano, F.; Mistretta, A.; Marventano, S.; Nolfo, F.; Calabrese, G. et al. (2013). Red orange: Experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** Article ID 157240, 11 pages.
- Hall, K. D. (2017). A review of the carbohydrate-insulin model of obesity. **Eur. J. Clin. Nutr.** 1–4.
- Hillebrand, S.; Schwarz, M.; Winterhalter, P. (2004). Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 7331–7338.
- Hirai, S.; Takahashi, N.; Goto, T.; Lin, S.; Uemura, T.; Yu, R.; Kawada, T. (2010). Functional Food Targeting the Regulation of Obesity-Induced Inflammatory Responses and Pathologies. **Mediators of Inflammation.** Article ID367838, 8 pages.
- Hirosumi, J.; Tuncman, G.; Chang, L.; Gorgun, C.Z.; Uysal, K.T.; Maeda, K.; Karin, M.; Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature.** London 420.6913: 333-6.
- Holman, G. D.; Kasuga, M. (1997). From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. **Diabetologia**, v. 40, n. 9, p. 991-1003.
- Hotamisligil, G.S.; Arner, P.; Caro, J.F.; Atkinson, R.L.; Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.** 95: 2409–2415.

- Kahn S.E., Hull R.L., Utzschneider K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**. 444(7121):840–846.
- Kanda, H.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kotani, K.; Hiasa, K.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Miyachi, H.; Maeda, S.; Egashira, K.; Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**. 116:1494 –1505.
- Kelebek, H.; Canbas, A.; Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. **Food Chemistry**, 107, 1710–1716.
- Kelebek, H.; Selli, S.; Canbas, A.; Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic composition and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, 91: pp. 187-192.
- Kern, P.A.; Ranganathan, S.; Li, C.; Wood, L.; Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 280: E745–E751.
- Khan, M. K.; Zill-E-Huma; Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis** 33, 85–104.
- Knebel B.; Göddeke S.; Hartwig S.; Hörbelt T.; Fahlbusch P.; Al-Hasani H.; Jacob S, Koellmer C.; Nitzgen U.; Schiller M.; Lehr S.; Kotzka J. (2018). Alteration of Liver Peroxisomal and Mitochondrial Functionality in the NZO Mouse Model of Metabolic Syndrome. **Proteomics Clin Appl**. Jan;12(1).
- Lee, H. S. (2002). Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed Budd blood orange (*Citrus sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 1243–1246.
- Lee, H.S.; Coates, G.A. (2000). Quantitative study of free sugars and myo-inositol in citrus juices by HPLC and literature compilation. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol**. 14: 2123–2141.
- Lee, S.J.; Choi H.N.; Kang M.J.; Choe E.; Auh, J.H., Kim, J.I. (2013). Chamnamul [*Pimpinella brachycarpa* (Kom.) Nakai] ameliorates hyperglycemia and improves antioxidant status in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. **Nutr Res Pract**. 7: 446–452.

- LI, L.O.; ELLIS J.M.; PAICH H.A. et al. (2009). Liver-specific loss of long chain acyl-CoA synthetase-1 decreases triacylglycerol synthesis and beta-oxidation and alters phospholipid fatty acid composition. **J Biol Chem**. v.284, n.41, p.27816-26.
- Li, R.W.; Theriault, A.G.; Au, K.; Douglas, T.D.; Casaschi, A.; Kurowska, E.M.; Mukherjee, R. (2006). Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. **Life Sciences** 79: 365–373.
- Ludwig D.S.; Friedman, M.I. (2014) Increasing adiposity: consequence or cause of over-eating? **JAMA**. 311: 2167–2168.
- Maarifi, G.; Chelbi-Alix, M. K.; Nisole, S. (2014) PML control of cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 551-561.
- Matyash V.; Liebisch G.; Kurzchalia T. V.; Shevchenko A.; Schwudke D. (2008). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **J. Lipid Res.** 49: 1137-1146.
- Milenkovic, D. et al. (2011). Hesperidin Displays Relevant Role in the Nutrigenomic Effect of Orange Juice on Blood Leukocytes in Human Volunteers: A Randomized Controlled Cross-Over Study. **Plos One**, 6, 1-9.
- Moreira, V. et al. (2018) Orange juice affects acylcarnitine metabolism in healthy volunteers as revealed by a mass-spectrometry based metabolomics approach. **Food Research International**, 107, 346-352.
- Mulvihill, E.E. et al. (2009). Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. **Diabetes** 58: 2198–2210.
- Nishioka, A.; Tobaruela, E.C.; Fraga, L.N.; Tomás-barberán, F.A.; Lajolo, F.M.; **Hassimotto, N.M.A.** (2021) Stratification of volunteers according to flavanone metabolite excretion and phase ii metabolism profile after single doses of 'Pera' orange and 'Moro' blood orange juices. **Nutrients**, v. 13, p. 473.
- Neves, M. F. (Coord.). (2010). O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto: FEA; USP.
- Ng, M.; Fleming, T.; Robinson, M. et al. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, 384: 766–81.

- Nivoit, P.; Morens, C., et al. (2009) Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. **Diabetologia**. 52: 1133–1142.
- O'Neill S.; O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. **Obes Rev**. 16(1):1–12.
- Olsen, M. K. et al. (2017). Steady-state energy balance in animal models of obesity and weight loss. **Scand. J. Gastroenterol**. 52, 442–449.
- OMS. Organização Mundial da Saúde (WHO). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acesso em 16 de setembro de 2017.
- Parkes H.A.; Preston E.; Wilks D.; Ballesteros M.; Carpenter L.; Wood L.; Kraegen E.W.; Furler S.M.; Cooney G.J. (2006). Overexpression of acyl-CoA synthetase-1 increases lipid deposition in hepatic (HepG2) cells and rodent liver in vivo. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 291: E737-E744.
- Prasad S.; Phrommoi K.; Yadav V. R.; Chaturved M. M.; Aggarwal B. B. (2010). Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. **Planta Med**. 76: 1044-1063.
- Prasath, G.S.; Sundaram, C.S.; Subramanian, S.P. (2013). Fisetin averts oxidative stress in pancreatic tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. **Endocrine** 44:359–368.
- Proteggente, A. R.; Saija, A.; De Pasquale A.; Rice-Evans C. A. (2003). The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties. **Free Radical Research**, vol. 37, no. 6, pp. 681–687.
- Pupin, A. M.; Dennis, M. J.; Toledo, M. C. F. (1998). Flavanone glycosides in Brazilian orange juice. **Food Chem**. 61: 275–280.
- Quintanilha, B.J.; Chaves, D.F.S.; Brasili, E.; Corrêa, T.A.F.; Capetini, V.C.; Ferreira, F.M.; Castro, I.A.; Hassimotto, N.M.A.; Rogero, M.M.; Lajolo, F.M. (2022) Ingestion of orange juice prevents hyperglycemia and increases plasma miR-375 expression. *Clin Nutr ESPEN*. 47, 240-245.
- Rapisarda P.; Bianco M. L.; Pannuzzo P.; Timpanaro N. (2008). Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. **Postharvest Biology and Technology**. 49: 348–354.

- Rapisarda, P.; Pannuzzo, P.; Romano, G.; Russo, G. (2003). Juice components of a new pigmented citrus hybrid *Citrus sinensis* (L.) Osbeck _ *Citrus clementina* Hort. ex Tan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 1611–1616.
- Rask-Madsen C.; Kahn C. R. (2012). Tissue–Specific Insulin Signaling, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 32:2052-2059.
- Reaven G.M. (2010) The metabolic syndrome: time to get off the merry-go- round? **J Intern Med**, 269:127–136.
- Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.** 123:1939–1951.
- Riso, P.; Visioli, F.; Gardana, C.; Grande, S.; Brusamolino, A.; Galvano, F.; Galvano, G.; Porrini, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. **J. Agric. Food Chem.**, 2005, 53(4): 941-947.
- Salamone, F.; Li Volti, G.; Titta L. et al. (2012). Moro orange juice prevents fatty liver in mice. **World Journal of Gastroenterology**, vol.18, n^o. 29, pp. 3862–3868.
- Saltiel, A. R.; Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806.
- Samuelsson, A.M.; Matthews, P.A.; Argenton, M. et al. (2008). Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension** 51, 383–392.
- Scalzo, R. L., Iannoccaria, T., Summa, C., Morelli, R., & Rapisarda, P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. **Food Chemistry**, 85: 41–47.
- Scazzocchio, B.; Var`i, R.; Filesì, C. et al. (2011) Cyanidin-3-O- β -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPAR γ activity in human omental adipocytes. **Diabetes**, vol. 60, no. 9, pp. 2234–2244.
- Shi, H.; Kokoeva, M.V.; Inouye, K.; Tzameli, I.; Yin, H.; Flier, J.S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid- induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.** 116: 3015–3025.

- Shimoda, H.; Tanaka, J.; Kikuchi, M.; Fukuda, T.; Ito, H. ; Hatano, T.; Yoshida, T. (2009) Effect of polyphenol-rich extract from walnut on diet-induced hypertriglyceridemia in mice via enhancement of fatty acid oxidation in the liver, *J. Agric. Food Chem.* 5, 1786–1792.
- Shimomura, I.; Matsuda, M.; Hammer, R.E.; Bashmakov Y.; Brown M.S.; Goldstein J.L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Mol Cell.** 6:77–86.
- Shoelson, S. E.; Herrero, L.; Naaz, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology.** Vol. 132: 2169–2180.
- Srinivasan, K.; Viswanand, B.; Asrat, L.; Kaul, C. L.; Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low dose of streptozotocin- treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacol. Res.** 52: 313–320.
- Song, H.; Zheng, Z.; Wu, J.; Lai, J.; Chu Q.; Zheng, X. (2016). White pitaya (*Hylocereus undatus*) juice attenuates insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obese mice, *PLoS One*, 11, 1–14.
- Su, D. *et al.* (2019) Citrus peel flavonoids improve lipid metabolism by inhibiting miR-33 and miR-122 expression in HepG2 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 83, 747–175,.
- Teixeira, L. L.; Pilon, G. ; Coutinho, C. P.; Dudonne, S.; Dube, P.; Houde, V.; Desjardins, Y.; [Lajolo, F. M.](#); Marette, A.; **Hassimotto, N. M. A.** (2021) Purple grumixama anthocyanins (*Eugenia brasiliensis* Lam.) attenuate obesity and insulin resistance in high-fat diet mice. **Food and Function**, v. 12, p. 3680-3691.
- Titta, L.; Trinei, M.; Stendardo, M. et al. (2010). Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. **International Journal of Obesity**, vol. 34, no. 3, pp. 578–588.
- Tsuda T. (2008). Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. **J. Agric. Food Chem.** 56: 642-646.
- Tyanova S, Cox J. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. **Methods Mol Biol.** 2018;1711:133-148.
- Uysal K.T.; Wiesbrock, S.M.; Marino, M.W.; Hotamisligil G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- alpha function. **Nature.** 389:610 – 614.

- Xu, J.; Tao, N.; Liu, Q; Deng, X. (2006). Presence of diverse ratios of lycopene/ β -carotene in five pink or red-fleshed citrus cultivars. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.181-184.
- Zembroski A.S.; Buhman K.K.; Aryal U.K. (2021). Proteome and phosphoproteome characterization of liver in the postprandial state from diet-induced obese and lean mice. **J Proteomics**. 232:104072.
- Weisberg, S.P.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibe, I R.L.; Ferrante, Jr A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**. 112:1796–808.
- Yan S., Xue-Feng Y., Hao-Lei L., Nian F., Yan O., Kai Q (2015). Long-Chain Acyl-CoA Synthetase in Fatty Acid Metabolism Involved in Liver and Other Diseases: An Update. **World J. Gastroenterol**. 21:3492.
- Yang, Z.H.; Miyahara, H.; Takeo J.; Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. **Diabetol Metab Syndr**. 4:32.

ANEXO

Tabela 1S. DEP's no fígado de HLLC vs CON, HLLC+SM vs HLLC, HLLC+SP vs HLLC. *up-regulated: fold change >1,3 e down-regulated: fold change <0,769*

Gene symbol	Protein name	UniProt Accession number	HLLC/CON		HLLC+SM/HLLC		HLLC+SP/HLLC	
			FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
Acaa1b	3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal	Q8VCH0	3.27	<0.0001	0.50	0.0383	0.32	<0.0001
Aldh1a7	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	O35945	3.21	0.0271	0.68	0.0276	0.57	0.1023
Acaca	Acetyl-CoA carboxylase 1	Q55WU9	2.40	0.0486	0.27	0.0193	0.31	0.1182
Fasn	Fatty acid synthase	P19096	1.93	0.0372	0.51	0.0252	0.45	0.0841
Aldob	Fructose-bisphosphate aldolase B	Q91Y97	1.75	0.0040	0.71	0.0605	0.64	0.0813
Gpd1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	P13707	1.70	0.0092	0.74	0.0259	0.67	0.1003
Ugp2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Q91ZJ5	1.70	<0.0001	0.74	0.0290	0.72	0.0879
Hsd17b4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	P51660	1.64	0.0061	0.66	0.0251	0.60	0.1300
Tubb2a	Tubulin beta-2A chain	Q7TMM9	1.53	0.0054	0.62	0.0446	0.66	0.0742
Akr1a1	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	Q9JII6	1.52	0.0066	0.73	0.0351	0.65	0.0845
Acox2	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2	Q9QXD1	1.46	0.0189	0.71	0.0274	0.63	0.0929
Acadm	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	P45952	1.44	0.0446	0.72	0.0429	0.68	0.0790
Hmgcl	Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, mitochondrial	P38060	1.37	0.0493	0.68	0.0265	0.64	0.1083
Oplah	5-oxoprolinase	Q8K010	1.30	0.0379	0.73	0.0207	0.68	0.0845
Thrsp	Thyroid hormone-inducible hepatic protein	Q62264	4.31	0.0366	0.35	0.0471	-	-
Prdx3	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	P20108	3.05	0.0102	0.76	0.0254	-	-
Acly	ATP-citrate synthase	Q3V117	2.04	0.0252	0.51	0.0202	-	-
Ca3	Carbonic anhydrase 3	P16015	1.99	0.0246	0.76	0.0237	-	-
Decr2	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	Q9WV68	1.94	0.0244	0.69	0.0275	-	-
Eno1	Alpha-enolase	P17182	1.49	0.0210	0.76	0.0242	-	-
Gapdh;Gm3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P16858	1.45	0.0115	0.76	0.0484	-	-
Tkt	Transketolase	P40142	1.43	0.0084	0.72	0.0299	-	-
Rnh1	Ribonuclease inhibitor	Q91V17	1.40	0.0469	0.66	0.0240	-	-
Scp2	Non-specific lipid-transfer protein	P32020	1.38	0.0048	0.73	0.0255	-	-
Gpi	Glucose-6-phosphate isomerase	P06745	1.38	0.0396	0.72	0.0257	-	-
Aldh3a2	Aldehyde dehydrogenase 3	P47740	3.45	0.0206	-	-	0.54	0.0430
Slc25a10	Mitochondrial dicarboxylate carrier	Q9QZD8	2.25	<0.0001	-	-	0.46	0.0909
Ces1d	Carboxylesterase 1D	Q8VCT4	1.39	0.0287	-	-	0.65	0.0895
Gclc	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	P97494	-	-	0.40	0.02618	0.24	0.0764
Gstm1	Glutathione S-transferase Mu 1	P10649	-	-	0.43	0.01973	0.44	0.0746
Gyk;Gk	Glycerol kinase	B1ASZ3	-	-	0.47	0.03779	0.37	0.1003
Cluh	Clustered mitochondria protein homolog	Z4YLI8	-	-	0.49	0.02600	0.64	0.0354
Uox	Uricase	P25688	-	-	0.63	0.02464	0.69	0.0967
Cryz	Quinone oxidoreductase	P47199	-	-	0.68	0.02976	0.63	0.0785
MsrA	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase	Q9D6Y7	-	-	0.69	0.08067	0.70	0.0735
Gbe1	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	Q9D6Y9	-	-	0.69	0.03125	0.60	0.0842
Oat	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	P29758	-	-	0.74	0.03625	0.76	0.0207
Dpyd	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	Q8CHR6	-	-	0.75	0.04429	0.65	0.0984
Anxa5	Annexin A5	P48036	2.18	0.0262	-	-	-	-
Fmo5	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5	P97872	2.08	0.0500	-	-	-	-
Aldh1a1	Retinal dehydrogenase 1	P24549	1.85	0.0196	-	-	-	-
Pklr	Pyruvate kinase	E9Q509	1.75	0.0092	-	-	-	-
Ces2e	Pyrethroid hydrolase Ces2e	Q8BK48	1.72	<0.0001	-	-	-	-
Glul	Glutamine synthetase	P15105	1.61	0.0058	-	-	-	-
Dak	Triokinase/FMN cyclase	Q8VC30	1.61	0.0042	-	-	-	-
Hmgcs2	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	P54869	1.48	0.0293	-	-	-	-
Acox1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	Q9R0H0	1.39	0.0497	-	-	-	-
Prodh	Proline dehydrogenase 1, mitochondrial	Q9WU79	1.35	0.0396	-	-	-	-
Pebp1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P70296	1.34	0.0189	-	-	-	-
Sord	Sorbitol dehydrogenase	Q64442	1.31	0.0216	-	-	-	-
Phyh	Phytanoyl-CoA dioxygenase, peroxisomal	O35386	-	-	0.30	0.0247	-	-
Acad11	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	Q80XL6	-	-	0.30	0.0387	-	-
Aldh5a1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	Q8BWF0	-	-	0.46	0.0392	-	-
Psmc3	26S protease regulatory subunit 6A	O88685	-	-	0.54	0.0496	-	-
PsmA1	Proteasome subunit alpha type-1	Q9R1P4	-	-	0.54	0.0403	-	-
Mccc1	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	Q99MR8	-	-	0.55	0.0500	-	-
ApoA4	Apolipoprotein A-IV	P06728	-	-	0.55	0.0244	-	-
Pecr	Peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	Q99MZ7	-	-	0.61	0.0448	-	-
Ybx1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	P62960	-	-	0.62	0.0229	-	-
Cat	Catalase	P24270	-	-	0.62	0.0691	-	-
Dlat	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, m	Q8BMF4	-	-	0.65	0.0421	-	-
Prdx1	Peroxisomal thioredoxin-1	P35700	-	-	0.66	0.0341	-	-
HnmpH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-term	O35737	-	-	0.67	0.0238	-	-
Tpi1	Triosephosphate isomerase	P17751	-	-	0.67	0.0287	-	-
Tln1	Talin-1	P26039	-	-	0.67	0.0294	-	-
Sdhb	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	Q9CQA3	-	-	0.67	0.0538	-	-
Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A;Fructose-bisphosphate aldolase	P05064	-	-	0.68	0.0301	-	-
Qdpr	Dihydropteridine reductase	Q8BV14	-	-	0.69	0.0266	-	-
Apoe	Apolipoprotein E	P08226	-	-	0.69	<0.0001	-	-
Akr1d1	3-oxo-5-beta-steroid 4-dehydrogenase	Q8VCX1	-	-	0.69	0.0493	-	-

Tabela 1S. Continuação

Gene symbol	Protein name	UniProt Accession number	HLLC/CON		HLLC+SM/HLLC		HLLC+SP/HLLC	
			Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated	Down-regulated	Down-regulated
			FC	p-value	FC	p-value	FC	p-value
Cct4	T-complex protein 1 subunit delta	P80315	-	-	0.70	<0.0001	-	-
Rdx;Ezr	Radixin;Ezrin	P26043	-	-	0.70	0.0276	-	-
Blvrb	Flavin reductase (NADPH)	Q923D2	-	-	0.70	0.0305	-	-
Adk	Adenosine kinase	P55264-2	-	-	0.71	0.0297	-	-
Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	Q9D051	-	-	0.72	0.0347	-	-
Gpd2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial;Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Q64521	-	-	0.72	0.0433	-	-
Gsta3	Glutathione S-transferase A3;Glutathione S-transferase	P30115	-	-	0.73	0.0292	-	-
Cbs	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	Q91WT9	-	-	0.73	0.0270	-	-
Akr1c6	Estradiol 17 beta-dehydrogenase 5	P70694	-	-	0.73	0.0329	-	-
Vcp	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Q01853	-	-	0.74	0.0230	-	-
Tf	Serotransferrin	Q92111	-	-	0.75	0.0302	-	-
Myf6	Myosin light polypeptide 6	Q60605	-	-	0.75	0.0234	-	-
Ehhadh	Peroxisomal bifunctional enzyme;Enoyl-CoA hydratase/3,2-trans-enoyl-CoA isomerase;3-hydroxy	Q9DBM2	-	-	0.75	0.0497	-	-
Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma	P80318	-	-	0.75	0.0243	-	-
Acat3	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 3	Q80X81	-	-	0.75	0.0580	-	-
Hnrnpa3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Q8BG05-2	-	-	0.76	0.0333	-	-
Idh1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	O88844	-	-	0.76	0.0366	-	-
Got2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	P05202	-	-	0.76	0.0374	-	-
Lypla1	Acyl-protein thioesterase 1	P97823	-	-	0.76	0.0375	-	-
Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	Q8K2B3	-	-	0.77	0.0370	-	-
Slc25a3	Phosphate carrier protein, mitochondrial	Q8VEM8	-	-	-	-	0.08857	<0.0001
Ugdh	UDP-glucose 6-dehydrogenase	O70475	-	-	-	-	0.46171	0.0804
Acaa1a	3-ketoacyl-CoA thiolase A, peroxisomal	Q921H8	-	-	-	-	0.52916	0.0889
Ces1f	Carboxylic ester hydrolase	Q91WU0	-	-	-	-	0.53245	0.0819
Gpt2	Alanine aminotransferase 2	Q8BGT5	-	-	-	-	0.5359	0.0804
Copa	Coatomer subunit alpha;Xenin;Proxenin;Coatomer subunit alpha	Q8CIE6	-	-	-	-	0.57595	0.0771
Aldh1b1	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial	Q9CZS1	-	-	-	-	0.58726	0.0808
Cyp2d26	Cytochrome P450 2D26	A0A0R4IZY	-	-	-	-	0.62429	0.1022
Agxt2	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial	Q3UEG6	-	-	-	-	0.65027	0.0722
Bdh1	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Q80XN0	-	-	-	-	0.65304	0.0868
Uroc1	Urocanate hydratase	Q8VC12	-	-	-	-	0.6888	0.0867
Reep6	Receptor expression-enhancing protein 6;Receptor expression-enhancing protein	Q9JM62	-	-	-	-	0.69336	0.0805
Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	Q9DBJ1	-	-	-	-	0.69732	0.0865
Psm1	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	Q3TXS7	-	-	-	-	0.71537	0.0873
Hrsp12	Ribonuclease UK114	P52760	-	-	-	-	0.73816	0.1030
Gulo	L-gulonolactone oxidase	P58710	-	-	-	-	0.75749	0.0707
Acs1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	P41216	-	-	-	-	0.76241	0.0722
Gcdh	Glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Q60759	-	-	-	-	0.76468	0.0987