

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Flavanonas de Citrus - mecanismos de proteção de células β -pancreáticas
submetidas ao estresse oxidativo**

Sara Lima Anacleto

Dissertação para a obtenção do título de mestre
Orientadora: Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo
2020

Sara Lima Anacleto

**Flavanonas de Citrus - mecanismos de proteção de células β -pancreáticas
submetidas ao estresse oxidativo**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018/2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciência dos alimentos.

Área de concentração: Bromatologia

Orientadora: Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

A532f Anacleto, Sara Lima Anacleto
Flavanonas de Citrus: mecanismos de proteção de células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo / Sara Lima Anacleto Anacleto. - São Paulo, 2019.
95 p.

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

1. citrus. 2. células Min6. 3. estresse oxidativo. 4. colesterol. 5. função de células β -pancreáticas. I. T. II. Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto Hassimotto, orientador.

Sara Lima Anacleto

**Flavanonas de Citrus - mecanismos de proteção de células β -pancreáticas
submetidas ao estresse oxidativo**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto (Orientadora/ Presidente)

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020

DEDICATÓRIA

A **Jesus**, por ter me sustentado nesta jornada e
por me conceder o dom da vida.

Ao meu marido **Eduardo**, por ser o meu porto
seguro.

Aos meus pais **Rute e Aldemi** que sempre me
incentivaram e ajudaram em meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Jesus, meu Deus, por me fortalecer e sustentar em todos os momentos e não deixar que minha fé fosse abalada.

À minha orientadora, professora doutora Neuza Mariko Aymoto Hassimotto, pela oportunidade de mais uma vez trabalhar ao seu lado. Obrigada pelas orientações e ensinamentos para a realização deste trabalho e por me fazer enxergar que eu posso ir sempre mais longe, ultrapassando e vencendo os meus limites.

Ao Food Research Center (FoRC) pelo suporte financeiro e científico.

Às agências financiadoras Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; nº Processo 2018/03965-0 e 2018/26584-2) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas concessões de bolsa de estudos.

Ao meu marido, Eduardo Anacleto, que sempre esteve comigo em todos os momentos e me ajudou de todas as formas para eu finalizar este trabalho.

Aos meus pais, Rute e Aldemi, pelo apoio, educação e amor que sempre me dão. Obrigada pelo incentivo para que eu conseguisse finalizar mais uma etapa em minha vida.

Aos meus irmãos, Éder, Taís e Éric, pelo amor, companheirismo e amizade.

Às minhas sobrinhas Júlia e Sophia, que traz mais alegria em minha vida, amo vocês.

À Jéssica Ramos, Karina Gama, Jacqueline Valério, Alessandra Harumi, Aline Alves, Mayra Crystiane, Janayra Teixeira pela ajuda em minhas análises e

experimentos, pela amizade e confiança, pelas risadas e conversas descontraídas e pelo encorajamento e incentivo que me deram.

Ao Victor Castro, Samira Prado e Janayra Teixeira pelos ensinamentos e treinamentos passados para manuseio de cultura celular, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do “Sushibar”: Jaque, Jéssica, Alessandra, Aline, Karina, Stephanie, Elisa, Mayara, Layanne, Camille, Adriana, Damaris, Thiago, Manu e Telma que me ajudaram neste período.

Aos professores membros da banca de qualificação: Ronaldo Santos, Thomas Ong e Jorge Mancini pelas críticas e sugestões enriquecedoras que foram fundamentais para a continuação e finalização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório do FBA: Mayra, Janayra, Paola, Rodrigo, Victor, Samira, Letícia, Ellen, Janaina, Isabel, Lais, Eric, Magner, Thiecla, Lucas, Raíssa, Gabriela e Ernesto pela ajuda e pelas experiências e ideias trocadas.

À turma do Laboratório de Cultivo Celular (LCC) pelo auxílio e ajuda em minhas análises e experimentos.

Aos professores do departamento do FBA pelos conhecimentos e experiências trocadas.

Às técnicas do laboratório: Lúcia Justino, Luciene Lauer, Tânia Shiga e Aline de Oliveira pela assistência e ajuda em meus experimentos e análises de dados. À Miriam Róldan pela ajuda no experimento com espectrometria de massas.

Ao pesquisador Dragan Milenkovic, pelo aceite em ser meu orientador fora do país e por me orientar nas análises de proteômica na University of California Davis nos

Estados Unidos. Obrigada pelo cuidado, ajuda e incentivo no meu período de estágio no exterior.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“É melhor obter sabedoria do que ouro!
É melhor obter entendimento do que prata!
(Provérbios 16:16)”*

RESUMO

ANACLETO, S. L. **Flavanonas de Citrus - mecanismos de proteção de células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo.** 2020. 95f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O colesterol está entre os fatores que induzem o estresse oxidativo nas células β -pancreáticas, gerando aumento de espécies reativas de oxigênio tais como o ânion superóxido, acarretando em prejuízo na síntese e secreção de insulina. Uma maior oferta dietética de compostos bioativos, como as flavanonas da laranja, através de suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante, poderiam reduzir o estresse oxidativo nas células β , melhorando sua função. Assim, o objetivo deste trabalho consiste em avaliar o efeito de metabólitos de flavanonas na proteção à função de células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo. Os metabólitos de flavanonas de fase-II avaliados foram naringenina 7-*O*-glucuronídeo, hesperetina 3'-*O*-glucuronídeo e hesperetina 7-*O*-glucuronídeo e também dois catabólitos produzidos pela microbiota intestinal, o ácido hipúrico e o ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico, principais compostos circulantes após a ingestão da flavanona naringenina. As células foram analisadas quanto à viabilidade celular e modulação do estresse oxidativo. Inicialmente, foi padronizado as condições de 320 μ M de colesterol e 6 h de incubação para a indução do estresse oxidativo nas células β da linhagem Min6. Os metabólitos de flavanonas não afetaram a viabilidade celular nas concentrações testadas (2 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 100 μ M). O colesterol reduziu significativamente a viabilidade celular (em até 40%) em dose e tempo dependente, com melhora significativa na presença dos metabólitos. Ademais, os metabólitos de flavanonas reduziram o estresse oxidativo observado pela redução significativa ($p < 0,05$) da peroxidação lipídica, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Em resposta à redução de espécies reativas de oxigênio, observou-se redução na atividade superóxido dismutase (55% a 82%) e glutathiona peroxidase (10% a 53%), valores estes encontrados elevados com o colesterol. Ainda, a função mitocondrial e secreção de insulina foi melhorada com o tratamento com todos os metabólitos, além da redução na apoptose. Desta forma, observa-se que a melhora na função celular das células β -pancreáticas foi devido a ação antioxidante direta dos metabólitos de fase II e catabólitos de flavanonas, o que é reforçado pelo fato de detecção destes no interior da célula, com excessão do ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico, o qual não foi encontrado no meio e interior da célula. Assim, estes resultados demonstraram que os metabólitos de flavanonas protegeram as células β -pancreáticas contra o estresse oxidativo induzido pelo colesterol, mitigando os efeitos em cadeia sobre a função das células β .

Palavras-chave: citrus; células Min6; estresse oxidativo; colesterol; função de células β -pancreáticas; metabólitos de flavanonas.

ABSTRACT

ANACLETO, S. L. **Citrus Flavanones - mechanisms of protection of pancreatic- β cells under oxidative stress**. 2020. 95p. Dissertation (Master degree). School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo. São Paulo, 2020.

Cholesterol is one of the trigger of the oxidative stress in the pancreatic- β cell, generating high level of reactive oxygen species, such as the superoxide anion, which leads to impairment of insulin synthesis and secretion. Currently, the intake of bioactive compounds, such as *citrus* flavanones, which present anti-inflammatory and antioxidant activities, could reduce oxidative stress in β cells improving its function. Thus, the purpose of this project is evaluating the protection effect of flavanones on pancreatic- β cells under oxidative stress. The phase II metabolites of flavanones evaluated were naringenin 7-*O*-glucuronide, hesperetin 3'-*O*-glucuronide, and hesperetin 7-*O*-glucuronide and also two catabolites produced from intestinal microbiota, hippuric acid and 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, major circulating compounds after flavanone naringenin intake. Cells were analyzed for cell viability and modulation of oxidative stress. Initially, conditions of 320 μ M cholesterol and 6 h of incubation were standardized for the induction of oxidative stress in the β cells of the Min6 line. The flavanone metabolites did not affect cell viability at concentrations tested (2 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 100 μ M). Cholesterol significantly reduced the cell viability (by up to 40%) in dose and time-dependent, with significant improvement in the presence of metabolites. Moreover, flavanone metabolites attenuated the oxidative stress by significantly reducing lipid peroxidation, superoxide anion, and hydrogen peroxide. In response to the reduction of reactive oxygen species, a decrease in superoxide dismutase (55% to 82%) and glutathione peroxidase (10% a 53%) activities was observed, which these values are found high with cholesterol. Moreover, mitochondrial function and insulin secretion was improved with treatment with all flavanone metabolites, in addition to a reduction in apoptosis. This way, the improvement in the cellular function of pancreatic- β cells was observed, due to the direct antioxidant action of phase II metabolites and flavanone catabolites, which is reinforced by the fact that they are detected inside the cell, with the exception of 3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid, which was not found neither in the middle nor inside of cell. The phase II metabolites were detected after 6 h of incubation, whereas the phenolic acids were not detected, indicating possible absorption by the cells. Thus, these results demonstrated that flavanone metabolites protected pancreatic- β cells against oxidative stress and harmful effects induced by cholesterol, mitigating their effect, acting as direct antioxidant downstream a positive effects observed by the improvement of oxidative stress and pancreatic β -cell function.

Key Words: citrus; Min6 cells; oxidative stress; cholesterol; pancreatic β -cell function; flavanone metabolites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ação do colesterol no complexo I da cadeia respiratória de elétrons na mitocôndria..... 24
- Figura 2.** Regulação e ativação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE sob condições de estresse oxidativo e ativação da PI 3-quinase pela glicose em célula β -pancreática..... 26
- Figura 3.** Esquema da biotransformação pela microbiota intestinal das principais flavanonas da laranja..... 30
- Figura 4.** Efeito do colesterol na viabilidade de células Min6. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT. Tempo de incubação (A) 6 h, (B) 12 h e (C) 24 h..... 46
- Figura 5.** Efeito dos ácidos hipúrico e 3-(4-hidroxifenil) propiônico na viabilidade de células Min6. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT. Tempo de incubação (A) e (A)' 6 h, (B) e (B)' 12 h e (C) e (C)' 24 h..... 47
- Figura 6.** Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na viabilidade de células Min6. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT. Tempo de incubação (A), (A)' e (A)'' 6 h, (B), (B)' e (B)'' 12 h e (C), (C)' e (C)'' 24 h..... 48
- Figura 7.** Efeito dos ácidos fenólicos na diminuição da viabilidade celular induzida por colesterol em células Min6 com 6 h de incubação. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT e LDH. (A) e (A)' ácido hipúrico, (B) e (B)' ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico..... 50
- Figura 8.** Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na diminuição da viabilidade celular induzida por colesterol em células Min6 com 6 h de incubação. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT e LDH. (A) e (A)' naringenina 7-glucuronídeo, (B) e (B)' hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) e (C)' hesperetina 7-glucuronídeo..... 51
- Figura 9.** Contagem de células Min6 após tratamento dos ácidos hipúrico e 3-(4-hidroxifenil)propiônico. A contagem celular foi analisada por Contador de células automático TC 10 BioRad. Tempo de incubação (A) e (A)' 6 h, (B) e (B)' 12 h e (C) e

(C)' 24 h.....

Figura 10. Contagem de células Min6 após tratamento dos metabólitos de flavanonas glucuronidados. A contagem celular foi analisada por Contador de células automático TC 10 BioRad. Tempo de incubação (A), (A)' e (A)'' 6 h, (B), (B)' e (B)'' 12 h e (C), (C)' e (C)'' 24 h..... 53

Figura 11. Efeito dos ácidos fenólicos na peroxidação lipídica em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. A peroxidação lipídica foi expressa como η M de MDA/mg de proteína..... 54

Figura 12. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na peroxidação lipídica em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A peroxidação lipídica foi expressa como η M de MDA/mg de proteína..... 55

Figura 13. Efeito dos ácidos fenólicos na formação de peróxido de hidrogênio em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. A formação de peróxido de hidrogênio foi expressa como nmol H_2O_2 /L/mg proteína..... 56

Figura 14. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na formação de peróxido de hidrogênio em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A formação de peróxido de hidrogênio foi expressa como nmol H_2O_2 /L/mg proteína..... 57

Figura 15. Efeito dos ácidos fenólicos na oxidação do MitoSoxTM Red em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil)propiônico. A oxidação do MitoSoxTM Red foi expressa como RFU/mg de proteína..... 58

Figura 16. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na oxidação do MitoSoxTM Red em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de

incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A oxidação do MitoSoxTM Red foi expressa como RFU/mg de proteína..... 59

Figura 17. Efeito dos ácidos fenólicos na atividade de SOD em células Min6 tratadas com 320 µM de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. A atividade da SOD foi expressa como U/mg de proteína..... 60

Figura 18. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na atividade de SOD em células Min6 tratadas com 320 µM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A atividade da SOD foi expressa como U/mg de proteína..... 61

Figura 19. Efeito dos ácidos fenólicos na atividade de GPx em células Min6 tratadas com 320 µM de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. A atividade da GPx foi expressa como U/mg de proteína..... 62

Figura 20. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na atividade de GPx em células Min6 tratadas com 320 µM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A atividade da GPx foi expressa como U/mg de proteína..... 62

Figura 21. Efeito dos ácidos fenólicos na apoptose de células Min6 induzidas por colesterol. Apoptose foi determinada pela análise de Anexina V. Os valores foram expressos em porcentagem de células. (A) Ácido hipúrico e (B) ácido 3-(4-hidroxifenil)propiônico..... 63

Figura 22. Efeito dos metabólitos de flavanonas na apoptose de células Min6 induzidas por colesterol. Apoptose foi determinada pela análise de Anexina V. Os valores foram expressos em porcentagem de células. (A) Naringenina 7-glucuronídeo, (B) Hesperetina 3'-glucuronídeo, (C) Hesperetina 7-glucuronídeo..... 64

Figura 23. Efeito dos ácidos fenólicos na função mitocondrial em células Min6 tratadas com 320 µM de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil)propiônico. Os resultados do Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) foram expressos como RFU/mg de proteína..... 65

Figura 24. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na função mitocondrial em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. Os resultados do Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) foram expressos como RFU/mg de proteína.....	66
Figura 25. Efeito dos ácidos fenólicos na secreção de insulina em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil)propiônico. Os resultados de secreção de insulina foram expressos como ng/mg proteína.....	67
Figura 26. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na secreção de insulina em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. Os resultados de secreção de insulina foram expressos como ng/mg proteína.....	68
Figura 27. <i>Uptake</i> celular e concentração no meio celular dos metabólitos de flavanonas após tratamento de 6 h de incubação na ausência de colesterol. O uptake celular e concentração no meio celular foi analisada por LC-MS.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP	Alfa-1- glicoproteína ácida
AH	Ácido hipúrico
AHPP	Ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico
ANOVA	Análise de variância
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
BAIAP2L1	<i>Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbônico
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro Fetal Bovino
GLUT-2	Transportador de glicose tipo-2
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione dissulfeto
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
Hsp3'	Hesperetina 3'-glucuronídeo
Hsp7	Hesperetina 7-glucuronídeo
HO•	Radical hidroxila
IL1RL1	<i>Interleukin-1-receptor-like 1</i>
Isl 1	<i>Insulin gene enhancer protein ISL-1</i>
Keap1	<i>Kelch like ECH-associated protein 1</i>
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>

MDA	Malondialdeído
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MTT	<i>Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
Nar7	Naringenina 7-glucuronídeo
NBT	<i>Nitroazul de tetrazólio</i>
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2</i>
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
PDX-1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinase
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
PTFE	Politetrafluoretileno
RI	Resistência insulínica
SGLT1	<i>Sodium-dependent glucose transporter 1</i>
SOD	Superóxido dismutase
SULT	<i>Sulfotransferases</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UGT	<i>Uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Colesterol e estresse oxidativo em célula β -pancreática.....	23
2.2 Mecanismos protetores de flavonoides de <i>citrus</i>	26
2.2.1 Biodisponibilidade dos flavonoides	29
3. JUSTIFICATIVA.....	32
4. HIPÓTESE DO ESTUDO	34
5. OBJETIVO GERAL	35
5.1. Objetivo Geral.....	35
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
6.1 Material.....	36
6.2 Indução do estresse oxidativo em células β -pancreáticas induzido por colesterol	36
6.3 Análise de viabilidade de células.....	37
6.3.1 Viabilidade celular pelo ensaio MTT.....	37
6.3.2 Viabilidade celular pela quantificação de LDH	38
6.4 Contagem celular	38
6.5 Avaliação do status redox celular	39
6.5.1 Peroxidação lipídica	39
6.5.2 Peróxido de hidrogênio	39
6.5.3 Quantificação de ânion superóxido	39
6.6 Enzimas antioxidantes	40
6.6.1 Quantificação de proteína.....	40
6.6.2 Atividade de GPx	40
6.6.3 Atividade de SOD	41
6.6.4 Atividade de CAT	41
6.7 Análise de apoptose	42
6.8 Análise da função mitocondrial	42
6.9 Análise de secreção de insulina	43
6.10 <i>Uptake</i> dos metabólitos de flavanonas.....	43
6.10.1 <i>Uptake</i> celular e estabilidade no meio celular dos metabólitos de flavanonas	43
6.10.2 Parâmetros do LC-MS (Liquid chromatography-mass spectrometry).....	44

6.11 Análise estatística	45
7. RESULTADOS	46
7.1 Efeito do colesterol sobre a viabilidade celular	46
7.2 Efeito dos metabólitos de flavanonas na viabilidade celular	47
7.3 Efeito dos metabólitos de flavanonas na viabilidade celular de células Min6 tratadas com colesterol.....	49
7.4 Efeito dos metabólitos de flavanonas na viabilidade celular avaliada pela contagem de células	52
7.5 Efeito dos metabólitos de flavanonas sobre o estresse oxidativo em células Min6 tratadas com colesterol.....	54
7.5.1 Peroxidação lipídica	54
7.5.2 Peróxido de hidrogênio	56
7.5.3 Quantificação de ânion superóxido	58
7.5.4 Atividades de enzimas antioxidantes	60
7.6 Efeito dos metabólitos de flavanonas na apoptose e necrose em células Min6 tratadas com colesterol.....	63
7.7 Efeito dos metabólitos de flavanonas na função mitocondrial em células Min6 tratadas com colesterol.....	65
7.8 Efeito dos metabólitos de flavanonas na secreção de insulina em células Min6 tratadas com colesterol.....	67
7.9 <i>Uptake</i> celular dos metabólitos de flavanonas.....	69
8. DISCUSSÃO	70
9. CONCLUSÃO.....	76
10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	77
ANEXO 1. Aquisição de células da linhagem Min6 da espécie <i>Mus musculus</i> pelo BCRJ.....	87
ANEXO 2. Ficha do aluno gerada pelo sistema administrativo da pós-graduação.....	90
ANEXO 3. Currículo do Sistema de Currículos Lattes.....	92

1. INTRODUÇÃO

A resistência insulínica (RI) e a dislipidemia podem resultar em alteração e disfunção de células β -pancreáticas, devido ao aumento do processo inflamatório e do estresse oxidativo (Sharma et al., 2011; Araújo *et al.*, 2006). Este cenário acarreta em prejuízo na síntese e secreção de insulina e redução da massa de células β , devido a apoptose celular, e conseqüente redução do número de ilhotas (Araújo et al., 2006; Li et al., 2006; Zhou et al., 2014; Fujimoto et al., 2009). Sendo assim, os compostos bioativos, como os flavonoides, presentes em vegetais e frutas, como a laranja, poderiam melhorar o estado fisiológico, através da redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório pela sua atividade anti-inflamatória e antioxidante (Harvey et al., 2012). A laranja, é a fruta de maior consumo pelo brasileiro e a maior fonte de flavanonas, o que pode ter um impacto significativo na saúde (Anacleto et al., 2019). Estudos demonstram que o consumo de suco de laranja ou de seus flavonoides isolados melhoram vários parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo, nos diversos tecidos, observados em quadros de RI e Diabetes tipo II (Ribeiro et al., 2017; Azzini et al., 2017).

Entretanto, os mecanismos que relacionam a síntese e a secreção de insulina sob a ação de um agente estressor, bem como a atuação dos compostos bioativos na melhora da função pancreática ainda são desconhecidos. Diante disso, propõe-se avaliar os efeitos protetores de metabólitos de flavanonas de laranja em células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo induzidas por colesterol. Neste estudo serão considerados os metabólitos de flavanonas, uma vez que as flavanonas da laranja são extensivamente metabolizadas e encontradas circulantes principalmente em sua forma conjugada ao ácido glicurônico e/ou grupamento sulfato, ou como ácidos fenólicos, catabólitos decorrentes da degradação pela microbiota intestinal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Colesterol e estresse oxidativo em célula β -pancreática

Além da RI, a dislipidemia, fatores inflamatórios e altos níveis de colesterol estão entre os causadores do estresse oxidativo nas células β -pancreáticas (Carrasco-Pozo et al., 2015). Os mecanismos pelos quais o colesterol induz o estresse oxidativo nestas células ainda não estão bem elucidados. Observou-se que altas concentrações de colesterol diminuiu a secreção de insulina em ilhotas de ratos, fornecendo um novo mecanismo na relação entre hiperlipidemia e disfunção de células β -pancreáticas (Hao et al., 2007). Outros lipídeos, como o palmitato, também foram capazes de elevar o estresse oxidativo, levando a disfunção das células β -pancreáticas (Inoguchi et al., 2005).

O colesterol aumentou a produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) mitocondrial pela inibição enzimática do complexo I, como observado para as drogas rotenona e a indometacina, impedindo a passagem de elétrons para a coenzima Q (ubiquinona) (Figura 1), gerando acúmulo de elétrons na matriz mitocondrial, promovendo a produção de $O_2^{\bullet-}$, devido ao aumento na concentração de doadores de elétrons (Zhao et al., 2010; Carrasco-Pozo et al., 2015).

Além disso, quando o fluxo de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons diminui, o efluxo de prótons através da membrana mitocondrial interna cessa, diminuindo o potencial de membrana. Na ausência deste gradiente, o movimento de H^+ através da ATP sintase cessa, assim como a formação de ATP, induzindo a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, levando a apoptose mediada pela liberação de citocromo c (Carrasco-Pozo et al., 2015; Latz et al., 2013; Giorgio et al., 2013). O aumento de colesterol nas membranas também mostrou aumentar a produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo aumento da concentração de NADPH oxidases (Henriksen et al., 2011).

Além disso, houve uma associação entre a administração oral de colesterol a longo prazo e diminuição na atividade enzimática das desidrogenases mitocondriais, como a succinato desidrogenase e glicerofosfato desidrogenase, comprometendo sua função (Mikaelin et al., 1983).

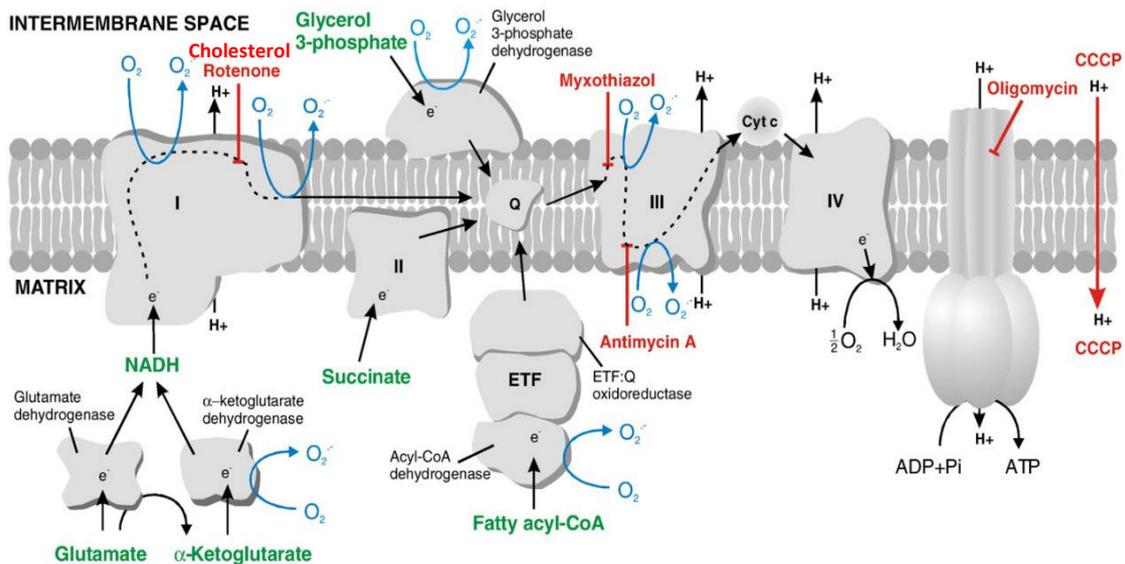


Figura 1. Ação do colesterol e da rotenona no complexo I da cadeia respiratória de elétrons na mitocôndria. (Adaptado de Tahara *et al.*, 2009).

A alteração do potencial redox da célula ativa a via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE, o qual modula a expressão de diversas enzimas do sistema de defesa antioxidante, tais como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx), para atenuar assim, o estresse oxidativo no interior da célula (Kitamura et al., 2007; Santos, 2014), reduzindo o efeito deletério das EROs sobre proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (Birben et al, 2012; Figueira et al., 2013; Kowaltowski et al., 2009).

O estresse oxidativo interfere na síntese de insulina, diminuindo a fosforilação da via Isl 1/PDX-1, prejudicando e diminuindo a síntese de insulina pelas células β -pancreáticas (Figura 2) (Zhou et al., 2014; Fujimoto et al., 2009). Ainda, mudanças metabólicas nas células β -pancreáticas também podem ocorrer como resposta a diversos agentes estressores. Em apoptose de células β primárias, além de insulina, onze novas

proteínas foram secretadas, entre elas a alfa-1- glicoproteína ácida (AGP), enzima aldolase frutose 1,6 bifosfato, *STAM-binding protein*, *Interleukin-1-receptor-like 1* (IL1RL1) e *brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1* (BAIAP2L1) (Gezginci-Oktayoglu *et al.*, 2018). Ainda, em ilhotas pancreáticas apresentando disfunção na secreção de insulina e comprometimento da atividade oxidoreductase, identificou-se 262 proteínas secretadas, incluindo a AGP e a enzima aldolase frutose 1,6 bifosfato, bem como proteína ligadora de ácidos graxos, anexina A5 e glutathione peroxidase 1 (Kuo *et al.*, 2016). A AGP é uma proteína de fase aguda secretada por diversos tecidos em resposta a um agente estressor, inflamação ou infecção e seu aumento no plasma geralmente está associado à síntese hepática. Contudo, sua expressão também foi observada em modelos de câncer de pâncreas, o que poderia ser considerado um possível biomarcador de dano pancreático (Fournier *et al.*, 2000).

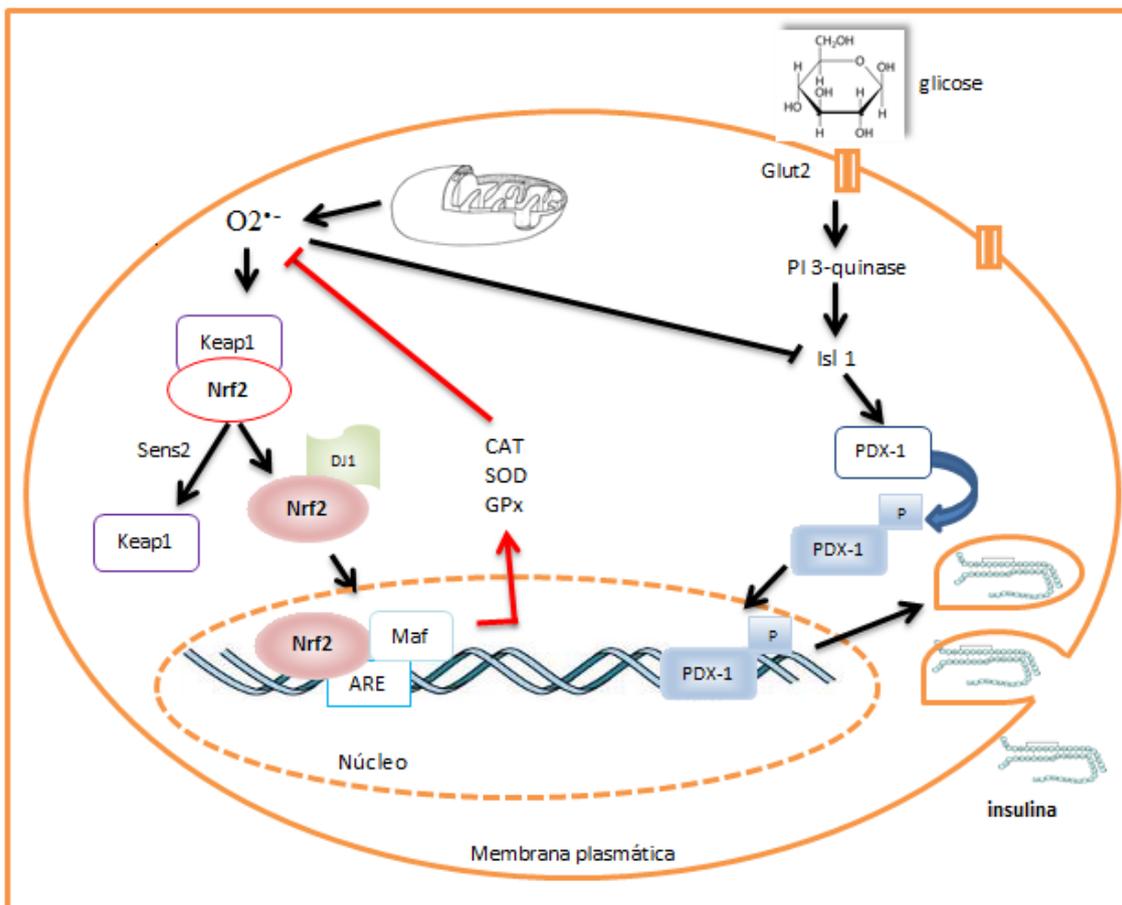


Figura 2. Regulação e ativação da via de sinalização Keap1-Nrf2-ARE sob condições de estresse oxidativo e ativação da PI 3-quinase pela glicose em célula β-pancreática. A PI 3-quinase é ativada indiretamente pela glicose, que ativa a via Isl 1/PDX-1. A proteína Isl 1 ativa a PDX-1 que regula a expressão gênica para a síntese de insulina. Em condições de estresse oxidativo, o Nrf2 é ativado após degradação da Keap1 pela Sens2, com posterior fosforilação e translocação para o núcleo. O Nrf2 interage com o elemento de resposta antioxidante (ARE) e em coordenação com diversos co-fatores (Maf) induz a expressão de genes antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase (GPx). (Adaptado de Santos, 2014).

2.2 Mecanismos protetores de flavonoides de *citrus*

A redução do peso corpóreo, atividade física e uma maior oferta dietética de alimentos vegetais estão entre os métodos para atenuar as alterações e desordens causadas pela RI e dislipidemia (Harvey et al., 2012). Os vegetais possuem, além de nutrientes, compostos bioativos que podem auxiliar na promoção à saúde através de diversos mecanismos protetores, tais como atividade anti-inflamatória, ação antiproliferativa, antioxidante e inibição da apoptose. Alguns compostos bioativos,

principalmente os flavonoides, podem melhorar alguns parâmetros da RI e dislipidemia, reduzindo o estresse oxidativo das células β e aumentando a síntese de insulina, além de reduzir a apoptose (Sharma *et al.*, 2011).

Os flavonoides, por terem ação antioxidante, podem ter um efeito direto como antioxidante e indireto modulando a expressão de enzimas antioxidantes. Alguns estudos mostraram que o flavonoide quercetina, um dos principais flavonoides encontrado em boa parte dos alimentos como a cebola e maçã, além de reduzir o estresse oxidativo na célula, também melhorou a síntese de insulina (Li *et al.*, 2013; Hossain *et al.*, 2016; Cerf, 2013). Entretanto, há outros compostos bioativos dentro da classe de flavonoides que podem exercer ações semelhantes, dentre eles destacam-se os compostos pertencentes à subclasse flavanonas, que são encontrados principalmente em *citrus* como a laranja (Hossain *et al.*, 2016).

A laranja é o *citrus* de maior produção, de menor custo e o mais consumido pelo brasileiro (BRASIL, 2016), com uma prevalência de consumo médio de homens e mulheres de 7,1%, sendo a região sul a maior consumidora (~ 9,1%) (IBGE, 2011). A subclasse flavanona contribui com aproximadamente 32% da ingestão diária de flavonoides pela população brasileira, sendo a hesperidina e a narirutina os principais compostos dessa subclasse, fornecida principalmente pela laranja Pêra (91% do total) (Anacleto *et al.*, 2019). Além da hesperidina e da narirutina, a neohesperidina e naringina são flavonoides minoritários encontrados em *citrus* (Ho *et al.*, 2014).

A naringina mostrou aumentar significativamente a secreção de insulina e a expressão do transportador Glut2 de células β da linhagem INS-1, aumentando a sensibilidade a glicose, após exposição aguda e crônica a níveis elevados de glicose e sob condições glicotóxicas (Bhattacharya *et al.*, 2014). Considerando que o estresse oxidativo é um dos fatores envolvidos na etiologia da RI, foi observado também que o

flavonoide quercetina, em células INS-1 e Min6, controlaram os níveis de estresse oxidativo modulando a expressão de Nrf2 e aumentando a síntese de insulina via Isl 1/PDX-1 (Carrasco-Pozo et al., 2015; Fu et al., 2013). Além disso, a naringenina modulou a expressão de diversos genes envolvidos na função e sobrevivência celular, tais como Caspase 3, proteína Bax e BCl2, estas duas últimas conhecidas como anti e pró-apoptóticas, respectivamente (Bhattacharya *et al.*, 2014). A laranja, fonte de flavanonas, também reduziu o estresse oxidativo em cultura de células de fígado (HepG2) pela sua atividade antioxidante e pela indução de enzimas de fase II, como a glutationa peroxidase 1 (Jannat *et al.*, 2016).

A modulação da via Keap1-Nrf2-ARE poderia aumentar a expressão de enzimas antioxidantes reduzindo o estresse oxidativo. Neste caso, o próprio bioativo pode harmonizar o sistema, sendo ele próprio atuando como antioxidante direto. Ainda, a redução do estresse oxidativo em célula β pelas flavanonas, pode favorecer e estimular a via Isl 1/PDX-1 aumentando a síntese e secreção de insulina, melhorando a função das células β (Fu et al., 2013; Zhou et al., 2014).

Carrasco-Pozo et al. (2015) relataram que o catabólito da quercetina oriundo da ação da microbiota intestinal, o ácido 3,4 dihidroxifenilacético, minimizou o estresse oxidativo induzido pelo colesterol em células da linhagem Min6 via Nrf2, reestabelecendo a secreção de insulina, prejudicada em 40% pelo estímulo do colesterol. Por outro lado, a quercetina também preservou a integridade das células pancreáticas em linhagem de células INS-1, potencializando a secreção de insulina e protegendo a função das células β contra o dano oxidativo, diminuindo a indução de H_2O_2 na célula (Youl et al., 2010).

2.2.1 Biodisponibilidade dos flavonoides

Quando consideramos os flavonoides como potencial bioativo, sua estrutura nativa na matriz alimentar deve ser considerada uma vez que influencia sua biodisponibilidade, metabolização e impacto sobre a microbiota intestinal. De maneira geral, as principais flavanonas da laranja, a hesperitina 7-glucoramnosídeo (hesperidina) e a naringenina 7-glucoramnosídeo (naringina) não são transportadas pelo transportador de glicose SGLT1 ou hidrolisadas pelas β -glicosidases intestinais, devido a especificidade destes por flavonoides-hexosídeos e não glucoramnosídeos. Desta forma, as flavanonas de laranja são transportadas majoritariamente para o intestino grosso onde são hidrolisadas por β -ramnosidases bacterianas, liberando as respectivas agliconas que são então absorvidas. A naringenina e a hesperetina são então conjugadas por enzimas de fase II formando principalmente a naringenina 7-*O*-glucuronídeo, hesperetina 3'-*O*-glucuronídeo e hesperetina 7-*O*-glucuronídeo através da ação da *uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases* (UGT) nos enterócitos e/ou colonócitos ou no fígado (Crozier, 2009; Pereira-Caro et al., 2014 e Del Rio et al., 2013).

Além disso, a naringenina e a hesperetina, localizadas no lúmen intestinal, podem ser degradadas pela microbiota intestinal formando diversos ácidos fenólicos, principalmente o 3-(4-hidroxifenil) propiônico, que são absorvidos pelos colonócitos, podendo ser conjugados com a glicina, formando outros compostos como o ácido hipúrico (Rechner et al., 2004; Pereira-Caro et al., 2014) (Figura 3).

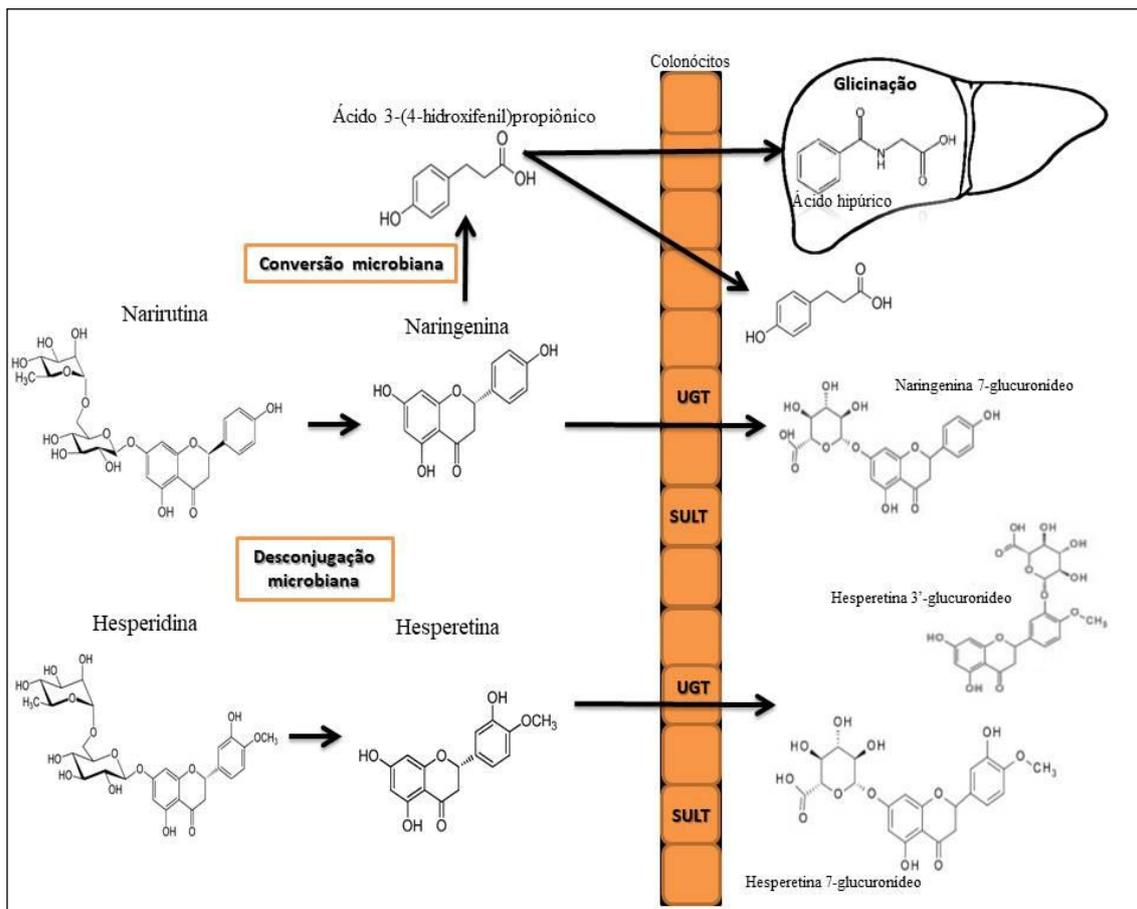


Figura 3. Esquema da biotransformação pela microbiota intestinal das principais flavanonas da laranja. *uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases* (UGT), *sulfotransferases* (SULT). (Adaptado de Kemperman et al., 2010; Del Rio et al., 2013 e Rechner et al., 2004).

As flavanonas em sua forma glucuronidada correspondem de 5 a 15% de sua ingestão (Vallejo et al., 2010; Tomás-Navarro et al., 2014). A hesperetina *O*-glucuronídeo, um metabólito da hesperetina, foi encontrado circulante na corrente sanguínea com concentração de 922 η mol, 50 vezes maior quando comparado à quercetina 3-*O*-rutinosídeo (Jaganath et al., 2006). Ainda, a concentração de hesperetina *O*-glucuronídeo-*O*-sulfato na urina de 24 h foi de 1,6 μ mol, equivalente a 3,5% da ingestão, e excreção de 61 ± 7 μ mol de metabólitos de hesperetina e um total de 21 ± 2 μ mol de metabólitos de naringenina (Pereira-Caro et al., 2014). A concentração dos

ácidos fenólicos provenientes da ingestão de suco de laranja, dentre eles o ácido 3-(4-hidroxifenil)propiônico, foi de 62 μmol (urina de 24 h), o que foi equivalente a 37% das flavanonas ingeridas após o consumo de suco de laranja (Del Rio et al., 2013). Assim, considerando o potencial das flavanonas e sua relação com a atividade biológica, a microbiota intestinal exerce papel fundamental na biodisponibilidade, tanto na formação de metabólitos de fase II, quanto na formação de compostos potencialmente ativos não presentes inicialmente na matriz alimentar, tais como os catabólitos oriundos de sua metabolização.

Diante disso, considerando que as flavanonas são (1) os principais flavonoides da dieta do brasileiro e que a laranja é a principal fonte deste flavonoide; (2) que as flavanonas podem atenuar o estresse oxidativo das células β -pancreáticas e assim modular a síntese e secreção de insulina; (3) que a laranja em diversos modelos *in vivo* demonstram uma melhora no quadro de resistência à insulina; propõem-se avaliar os efeitos protetores *in vitro* de metabólitos de flavanonas e de seus catabólitos oriundos da microbiota intestinal em células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo. Deste modo, o consumo de laranja, poderia auxiliar na melhora das funções fisiológicas do pâncreas em relação à síntese e secreção de insulina (Bhattacharya et al., 2014).

3. JUSTIFICATIVA

O aumento do estresse oxidativo, observado em algumas desordens metabólicas, pode resultar na disfunção das células β -pancreáticas (Sharma et al., 2011), acarretando em alteração na secreção de insulina e redução da massa de células β , devido a apoptose celular, e conseqüentemente redução do número de ilhotas (Araújo et al., 2006; Li et al., 2006). Os compostos bioativos, como os flavonóides, presentes em vegetais e frutas, como a laranja, poderiam melhorar a função pancreática, através da redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório de leve intensidade observada em síndromes metabólicas, como a RI (Harvey et al., 2012). A laranja, é a fruta de maior consumo pelo brasileiro e maior fonte de flavanonas (Anacleto et al., 2019), o que pode ter impacto significativo na saúde. Estudos demonstram que o consumo de suco de laranja ou de seus flavonoides isolados melhoram vários parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo observados em quadros de RI e Diabetes tipo II nos diversos tecidos (Ribeiro et al., 2017; Azzini et al., 2017).

Entretanto, os mecanismos estressores que promovem a disfunção de células β -pancreáticas, e como os compostos bioativos da dieta podem atuar na melhora da função pancreática ainda são desconhecidos. Diante disso, propõe-se avaliar os efeitos protetores de metabólitos de flavanonas em linhagem de células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo induzidas por colesterol, bem como mecanismos envolvidos. Neste estudo serão considerados os metabólitos de flavanonas, uma vez que as flavanonas da laranja são extensivamente metabolizadas e encontradas circulantes principalmente em sua forma conjugada a ácido glicurônico ou como ácidos fenólicos, catabólitos oriundos da degradação pela microbiota intestinal. As flavanonas em sua estrutura nativa não são encontradas circulantes, portanto não serão consideradas neste estudo. Assim, três metabólitos principais, naringenina 7-glucuronídeo (Nar7),

hesperetina 3'-glucuronídeo (Hsp3') e hesperetina 7-glucuronídeo (Hsp7), e dois ácidos fenólicos, catabólitos oriundos da microbiota intestinal, os ácidos fenólicos ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico (AHPP) e ácido hipúrico (AH) serão avaliados. As células da linhagem Min6 foram selecionadas para este estudo por apresentarem capacidade de secretar insulina sob concentrações de glicose fisiológicas e por apresentar susceptibilidade à glicotoxicidade, tal como se encontram nas células β -pancreáticas *in vivo*.

Este estudo permitirá uma compreensão mais ampla e detalhada de como as flavanonas decorrentes da ingestão de suco de laranja podem exercer efeito protetor sobre as células β -pancreáticas e aliadas a outros parâmetros bioquímicos e fisiológicos podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de proteção no desenvolvimento de doenças crônicas, tais como a RI e Diabetes.

4. HIPÓTESE DO ESTUDO

Níveis elevados de colesterol induzem o estresse oxidativo em células β -pancreáticas, gerando aumento de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, acarretando em prejuízo na síntese e secreção de insulina e redução da massa de células β , devido a apoptose celular. Entretanto, os metabólitos de flavanonas de fase II naringenina 7-glucuronídeo, hesperetina 3'-glucuronídeo e hesperetina 7-glucuronídeo e seus catabólitos ácido hipúrico e ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico provenientes da laranja podem ter um efeito protetor no quadro de estresse oxidativo em células β -pancreáticas, atenuando os efeitos danosos induzidos pelo colesterol.

5. OBJETIVO GERAL

5.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor de flavanonas de citrus em células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Material

As células da linhagem Min6 da espécie *Mus musculus* foram adquiridas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) na cidade de Duque de Caxias, RJ (Anexo 1). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 modificado contendo 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 4500 mg/L de glucose e 1500 mg/L de bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), 100 UI/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina em uma atmosfera humidificada a 95% e 5% de CO₂. O ciclo de renovação do meio de cultura foi realizado de 2 a 3 vezes por semana.

O colesterol utilizado foi um complexo de metil- β -ciclodextrina (Sigma C4951), um "colesterol solúvel em água" de acordo com o Certificado de Análise (proporção molar, 1:6 colesterol/metil- β -ciclodextrina) e foi tratado nas células.

Os flavonoides naringenina 7-glucuronídeo, hesperetina 3'-glucuronídeo, hesperetina 7-glucuronídeo foram gentilmente fornecidos pelos pesquisadores Dr. Paul Kroon e Dr. Paul Needs do *Quadram Institute*, UK. Os ácidos fenólicos ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico e ácido hipúrico foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

6.2 Indução do estresse oxidativo em células β -pancreáticas induzido por colesterol

As células Min6 foram cultivadas em frasco de 75 cm² e atingindo 70% de confluência foram plaqueadas em diferentes densidades de células, de acordo com cada ensaio, e incubadas durante 24 h para adesão. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas na ausência (0 μ M de colesterol) e/ou presença de colesterol (320 μ M) e na ausência de FBS para indução do estresse oxidativo juntamente com as flavanonas

naringenina 7-glucuronídeo, hesperetina 3'-glucuronídeo, hesperetina 7-glucuronídeo, e de seus catabólitos ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico e ácido hipúrico em diferentes concentrações (2 μ M, 5 μ M, 10 μ M e 100 μ M) por 6h (5% CO₂, 37 °C), de acordo com Zhao *et al* (2010). Os ensaios foram realizados em triplicata para as diferentes concentrações dos metabólitos de flavanonas, em duas diferentes passagens.

6.3 Análise de viabilidade de células

A viabilidade celular foi medida através do ensaio MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*) e pela quantificação de LDH (*lactate dehydrogenase*).

6.3.1 Viabilidade celular pelo ensaio MTT

As células Min6 foram plaqueadas em uma placa de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células/poço e tratadas de acordo com o item 6.2. A viabilidade celular também foi medida em células Min6 tratadas de acordo com o item 6.2. em 12 h e 24 h de incubação. Após o tratamento, os sobrenadantes foram recolhidos para a quantificação de LDH no meio de cultura. A análise de MTT baseia-se na conversão do MTT pela desidrogenase mitocondrial das células a uma coloração formazan de cor azul escuro. A habilidade das células de converterem o MTT foi analisada em 540 nm em leitor de microplaca (Synergy HT, BioTek). As células tratadas com Triton X-100 serviram como controle positivo. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem de redução do MTT.

6.3.2 Viabilidade celular pela quantificação de LDH

A quantificação de LDH, que é uma enzima intracelular ubíqua que é utilizada como um marcador de danos na membrana celular e toxicidade celular (Carrasco-Pozo *et al*, 2012), foi analisada nos sobrenadantes no tempo de 6 h de incubação. O LDH foi quantificado no meio de cultura utilizando o CytoTox-ONE™, que se baseia na conversão da resazurina em resorufina fluorescente (λ_{Ex} 560 nm e λ_{Em} 590 nm). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem de liberação de LDH.

6.4 Contagem celular

As células Min6 foram cultivadas em frasco de 75 cm² e atingindo 70% de confluência foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma densidade de 1 x 10⁵ células/poço e incubadas durante 24 h para adesão. Em seguida, foram incubadas na presença das flavanonas naringenina 7-glucuronídeo, hesperetina 3'-glucuronídeo, hesperetina 7-glucuronídeo, e de seus catabólitos ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico e ácido hipúrico em diferentes concentrações (2 µM, 5 µM, 10 µM e 100 µM) por 6h, 12h e 24h (5% CO₂, 37 °C), de acordo com Zhao *et al* (2010). Em seguida, a contagem total de células viáveis foi realizada nos diferentes tratamentos utilizando solução azul de tripan para a coloração das células e contador de células automático (BioRad TC20™). Os ensaios foram realizados em triplicata e em duas diferentes passagens. Os resultados foram expressos como número de células/ml.

6.5 Avaliação do status redox celular

6.5.1 Peroxidação lipídica

As células foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma densidade de 2×10^7 células/poço e tratadas de acordo com o item 6.2. A peroxidação lipídica foi avaliada utilizando um kit TBARS (*Cayman Chemical*). O malondialdeído (MDA) foi utilizado como padrão. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como $\eta\text{mol MDA/mg}$ de proteína.

6.5.2 Peróxido de hidrogênio

As células foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma densidade de 2×10^5 células/poço e foram tratadas de acordo com o item 6.2. A produção de peróxido de hidrogênio foi medida utilizando um meio de reação contendo glicose, glutamina, Fenol red, éster de forbol acetato (PMA) e peroxidase. Após o tratamento, as células foram incubadas com o meio de reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 1 h. A absorbância foi medida em 600 nm em leitor de microplaca (Synergy HT, BioTek). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como $\eta\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L/mg}$ de proteína.

6.5.3 Quantificação de ânion superóxido

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 2×10^5 células/poço. Após 24 h as células foram incubadas a 37 °C por 30 min com 5 μM de MitoSoxTM Red. Após lavagem com PBS, as células foram tratadas de acordo com o item 6.2. A fluorescência foi medida em λ_{Ex} 510 nm e λ_{Em} 580 nm em leitor de microplaca (Synergy HT, BioTek). O MitoSoxTM Red é um indicador de superóxido

mitocondrial. A produção de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial foi avaliada através da oxidação do MitoSoxTM Red, um fluorocromo lipofílico catiônico, que acumula na matriz mitocondrial (Li et al., 2007). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como RFU/mg de proteína.

6.6 Enzimas antioxidantes

As células foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma densidade de 2×10^7 células/poço e tratadas de acordo com o item 6.2 e foram analisadas quanto a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx e quantificação de proteína.

6.6.1 Quantificação de proteína

O conteúdo de proteínas das células Min6 após o tratamento foram quantificadas, a partir do preparo de homogenato das amostras, contendo o material biológico acrescido de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, na proporção 1:2, em banho de gelo. A quantificação foi realizada utilizando o kit BCA Protein Assay da Thermo Fisher Scientific. As análises foram realizadas em triplicata. Este homogenato foi utilizado para a determinação da atividade de enzimas antioxidantes.

6.6.2 Atividade de GPx

A determinação da atividade glutathiona peroxidase (GPx) foi realizada de acordo com Flohé e Gunzler (1984). O método baseia-se na oxidação da glutathiona reduzida pelo peróxido de terbutila, catalisada pela GPx, gerando GSSG. Na presença da enzima e do cofator NADPH, a GSSG é imediatamente convertida à forma reduzida (GSH) pela glutathiona redutase, com a oxidação concomitante do NADPH em NADP⁺ (Donadio, 2011; Nogueira, 2004). A leitura da absorbância foi realizada a 37°C, durante

quatro minutos, a 340 nm, em leitor de microplaca Synergy H1 (*Biotek Instruments*, Winooski, VT, USA). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína.

6.6.3 Atividade de SOD

A determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi realizada segundo Ewing e Janero (1995) que se baseia em uma reação aeróbia entre NADH e metossulfato de fenazina, gerando o radical $O_2^{\cdot-}$ sob pH não ácido. O nitroazul de tetrazólio (NBT) é utilizado como detector para avaliar dismutação do ânion superóxido através da redução do produto. A análise foi realizada a 26°C, com leitura a cada 60 segundos a 560 nm, durante cinco minutos, em leitor de microplaca Synergy H1 (*Biotek Instruments*, Winooski, VT, USA). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como U/mg de proteína.

6.6.4 Atividade de CAT

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com metodologia proposta por Bonaventura et al. (1972). O método consiste, basicamente, na medida de decomposição de H_2O_2 pela CAT, através da leitura de absorvância a 240 nm. Amostras de homogenato de células Min6 na concentração de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína foram adicionadas aos poços da placa de microtitulação de quartzo contendo 140 μL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4 com 10% de EDTA 1 mM e 40 μL da solução de H_2O_2 30mM. A análise foi realizada a 30 °C, com leitura a cada 45 segundos a 240 nm, durante oito minutos, em leitor de microplaca Synergy H1 (*Biotek Instruments*, Winooski, VT, USA). Os resultados foram expressos em UA por miligrama de proteína, a partir da curva padrão utilizando concentrações conhecidas de

CAT (14,17 a 0,44375 U CAT/mg de proteína) (Sigma, Cód. C9322). As análises foram realizadas em triplicata.

6.7 Análise de apoptose

As células Min6 foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma densidade de 2×10^7 células/poço e tratadas de acordo com o item 6.2. Após o tratamento, a apoptose foi avaliada através da coloração de anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI), utilizando kit de detecção de apoptose *FITC Annexin V Apoptosis detection kit* (BD Pharmingen™, San José, CA, USA). A detecção de apoptose foi analisada por citometria de fluxo (BD FACSVerser Flow Cytometer, BD Biosciences, San José, CA, USA). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como % de células.

6.8 Análise da função mitocondrial

A função mitocondrial foi analisada pela medição do Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) utilizando rodamina 123, um fluorocromo lipofílico catiônico, que acumula na matrix mitocondrial. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 2×10^5 células/poço e foram tratadas de acordo com o item 6.2. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com 1 $\mu\text{g/ml}$ de rodamina 123 a 37 °C por 10 min. O acúmulo de rodamina na mitocôndria foi avaliada utilizando como controle 3 μM de trifeniltina, um indicador de poros de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (Halestrap, 2009). A fluorescência foi medida em λ_{Ex} 500 nm e λ_{Em} 530 nm em leitor de microplaca (Synergy HT, BioTek). As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como RFU/mg de proteína.

6.9 Análise de secreção de insulina

Células Min6 foram plaqueadas a uma densidade de 1×10^6 células/poço em placas de 48 poços e foram incubadas a 5% CO_2 e 37 °C em meio RPMI 1640 modificado. Após 24h, as células foram incubadas na ausência (0 μM de colesterol) e/ou presença de colesterol (320 μM) para indução do estresse oxidativo juntamente com as flavanonas naringenina 7-glucuronídeo, hesperetina 3'-glucuronídeo, hesperetina 7-glucuronídeo, e de seus catabólitos ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico e ácido hipúrico em diferentes concentrações (2 μM , 5 μM , 10 μM e 100 μM) por 6h (5% CO_2 , 37 °C) em meio DMEM suplementado com 2 mM L-glutamina e 25 mM HEPES, pH 7,4 sem soro e glicose (Cultilab, São Paulo, SP). Em seguida, o sobrenadante foi coletado para análise de secreção de insulina basal sob 0 mM de glicose. As células foram então lavadas com PBS duas vezes e imediatamente foi adicionado meio DMEM com alta concentração de glicose (25 mM) sem soro por 1 h. Em seguida, o sobrenadante foi coletado para análise de secreção de insulina após estímulo com glicose. Os níveis de insulina no sobrenadante foram analisados utilizando kit ELISA (*Rat Ultrasensitive Insulin ELISA kit*) de acordo com as recomendações do fabricante. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como ng/mg de proteína.

6.10 Uptake dos metabólitos de flavanonas

6.10.1 Uptake celular e estabilidade no meio celular dos metabólitos de flavanonas

As células Min6 foram plaqueadas em uma placa de 48 poços a uma densidade de 1×10^6 células/poço e tratadas de acordo com o item 6.2 somente nas concentrações de 5 μM e 10 μM dos metabólitos de flavanonas. Após o tratamento, as células foram

centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi recolhido para a quantificação de metabólitos de flavanonas no meio celular e as células foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS para análise de *uptake* celular. As células foram extraídas com 2 ml de metanol 70% com 0,1% ácido fórmico. O meio celular (400 µL) foi adicionada com 1.600 µL de metanol 100%. A célula e o meio celular foram passadas em vórtex e colocadas no gelo por 15 min. Em seguida, a célula e o meio celular foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min e 10 min, respectivamente. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados em filtro millex PVDF 0,45 µm (Millipore) para análise por LC-MS. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como porcentagem de recuperação.

6.10.2 Parâmetros do LC-MS (*Liquid chromatography-mass spectrometry*)

A quantificação dos metabólitos de flavanonas foi realizada em equipamento composto de espectrômetro de massa tipo EVOQ Elite triplo quadrupolo (Bruker Daltonics, Alemanha), acoplado a um cromatógrafo líquido modelo Nexera X2 (Shimadzu, Japão) e interface de ionização por *electron spray* (ESI). Os metabólitos de flavanonas foram separados utilizando coluna Poroshell 2,7 µ (100 x 3 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido). A coluna foi mantida a 25 °C. O Sistema de fase móvel do solvente A (0,5% ácido fórmico em água) e do solvente B (0,5% ácido fórmico em acetonitrila) com fluxo de 0,5 ml/min proporcionou a separação dos metabólitos de flavanonas utilizando o seguinte gradiente: 5-18% de B de 0-7 min, 18-28% de 7-17 min, 90% em 17,01-20 min, 5% em 20,1-26 min. O volume de injeção das amostras foi de 5 µl. Após a separação, os compostos foram ionizados para detecção por espectrometria de massa com ESI em modo negativo. A quantificação foi realizada usando modo MRM. A análise MS foi realizada segundo os parâmetros: Tipo de fonte

ionização por elétron spray, voltage do spray de 3.500 V, temperatura do cone de 350 °C, fluxo de gás do probe de 40 e do nebulizador de 50. A energia de colisão foi ajustada entre 10-15 V de acordo com o analito. O MRM de transição para a quantificação foi de m/z 446,8→271,10 para Nar7; m/z 476,90→113,0 para Hsp3' e Hsp7; 178,0→134,10 para o AH.

6.11 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism, versão 7.0 utilizando ANOVA one way, seguido de pós-teste Tukey. Os dados foram expressos como média e desvio padrão (\pm DP). Foram marcados em *, #, @ e \$ valores com significância estatística ($p < 0,05$).

7. RESULTADOS

7.1 Efeito do colesterol sobre a viabilidade celular

O colesterol reduziu significativamente a viabilidade celular em dose e tempo dependente em células Min6 quando comparado ao controle (Figura 4). A viabilidade celular foi significativamente reduzida em cerca de 13% e 45% quando tratadas com 160 μM e 320 μM de colesterol, respectivamente, após 6 h de incubação (Figura. 4A). Já em células incubadas durante 12 h e 24 h, a redução na viabilidade celular ocorreu em concentrações acima de 80 μM e 40 μM de colesterol, respectivamente (Figura 4B e 4C), de no máximo 45%, na maior concentração de colesterol (320 μM) (Figura 4C). Assim, de acordo com estes resultados, foi estabelecido a concentração de 320 μM de colesterol e tempo de incubação de 6h, necessária para indução do estresse oxidativo em células Min6.

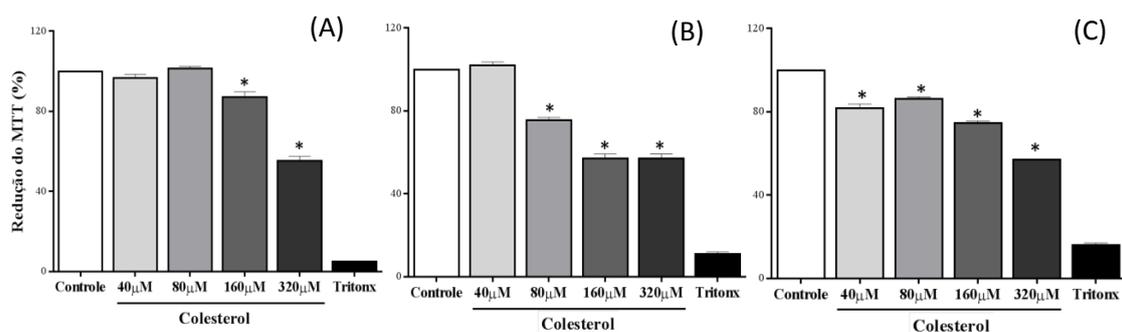


Figura 4. Efeito do colesterol na viabilidade de células Min6. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT. Tempo de incubação (A) 6 h, (B) 12 h e (C) 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao controle (n = 6).

7.2 Efeito dos metabólitos de flavanonas na viabilidade celular

Observou-se aumento significativo na viabilidade celular nas células tratadas com o AH, em diferentes concentrações (5 μM , 10 μM e 100 μM) nos tempos de incubação de 12h e 24 h (Figura 5A e C) em relação ao controle. Por outro lado, observou-se um aumento superior a 130% ($p < 0,05$), a partir de 100 μM , para o AHPP, principalmente em 6 h e 12 h de incubação (Figura 5).

Além disso, nas células tratadas com os metabólitos glucuronidados observou-se aumento superior a 140% na viabilidade celular em comparação ao controle em 12 h de incubação, na concentração de 100 μM (Figura 6), alcançando viabilidade superior a 200% após 24 h de incubação.

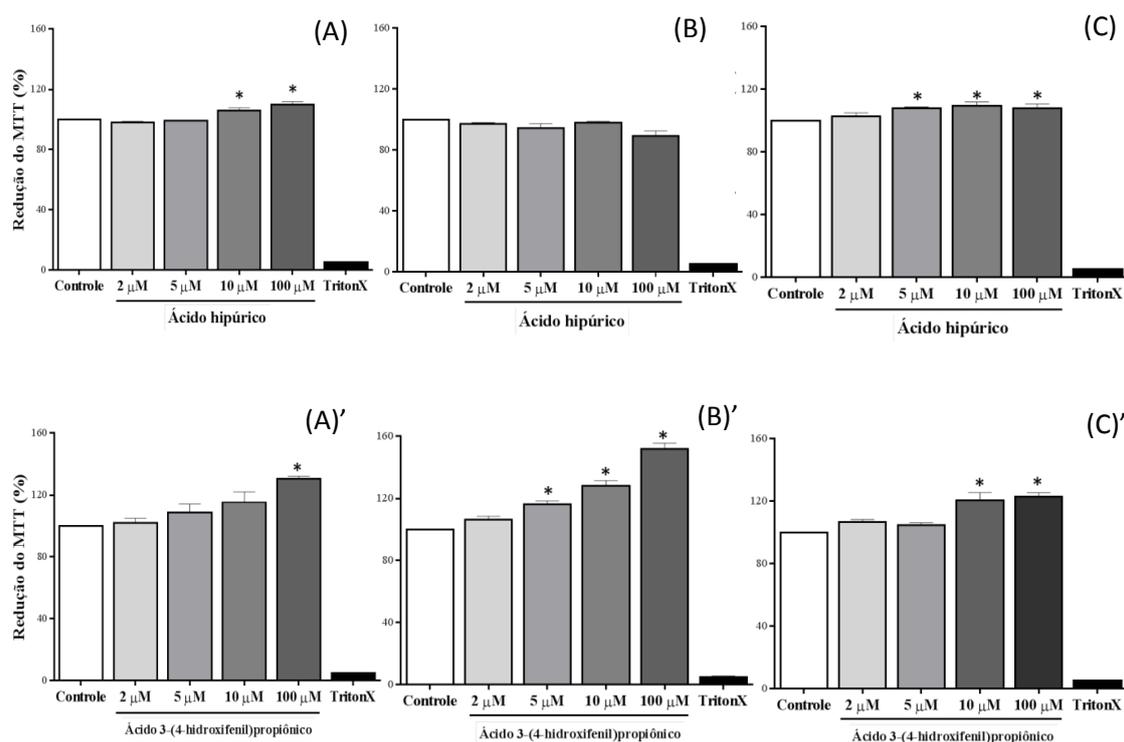


Figura 5. Efeito dos ácidos hipúrico e 3-(4-hidroxifenil)propiónico na viabilidade de células Min6. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT. Tempo de incubação (A) e (A)' 6 h, (B) e (B)' 12 h e (C) e (C)' 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao controle (n = 6).

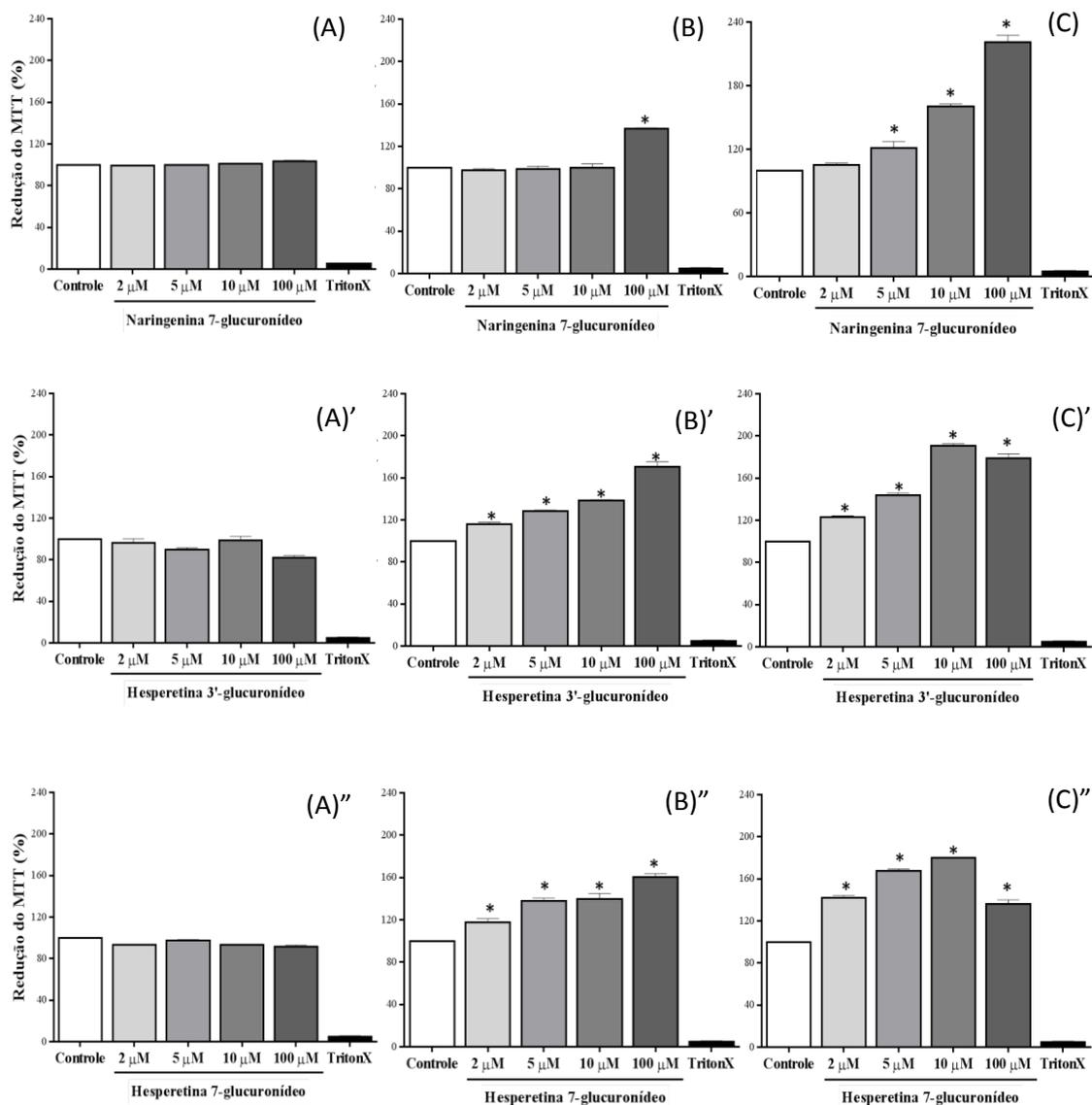


Figura 6. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na viabilidade de células Min6. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT. Tempo de incubação (A), (A)' e (A)'' 6 h, (B), (B)' e (B)'' 12 h e (C), (C)' e (C)'' 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao controle (n = 6).

7.3 Efeito dos metabólitos de flavanonas na viabilidade celular de células Min6 tratadas com colesterol

A exposição de células Min6 ao colesterol em 6 h de incubação diminuiu para 47% a capacidade de redução de MTT e aumentou 35% a liberação de LDH para o meio, quando comparado ao controle (Figuras 7 e 8). Tais alterações foram atenuadas pela exposição aos ácidos fenólicos e compostos glucuronidados.

Em ensaio de MTT, o AH e a Nar7, já na menor concentração, atenuaram significativamente ($p < 0,05$) a diminuição da viabilidade celular induzida por colesterol em torno de 12% e 7%, respectivamente (Figuras 7A e 8A). Os demais metabólitos glucuronidados e o AHPP atenuaram ($p < 0,05$) a redução da viabilidade celular induzida por colesterol a partir de 100 μM (Figuras 7 e 8).

Todos os metabólitos reduziram ($p < 0,05$) a liberação de LDH em concentração acima de 100 μM , com exceção da Hsp7 que já apresenta efeito a 2 μM , em torno de 5% (Figura 8C).

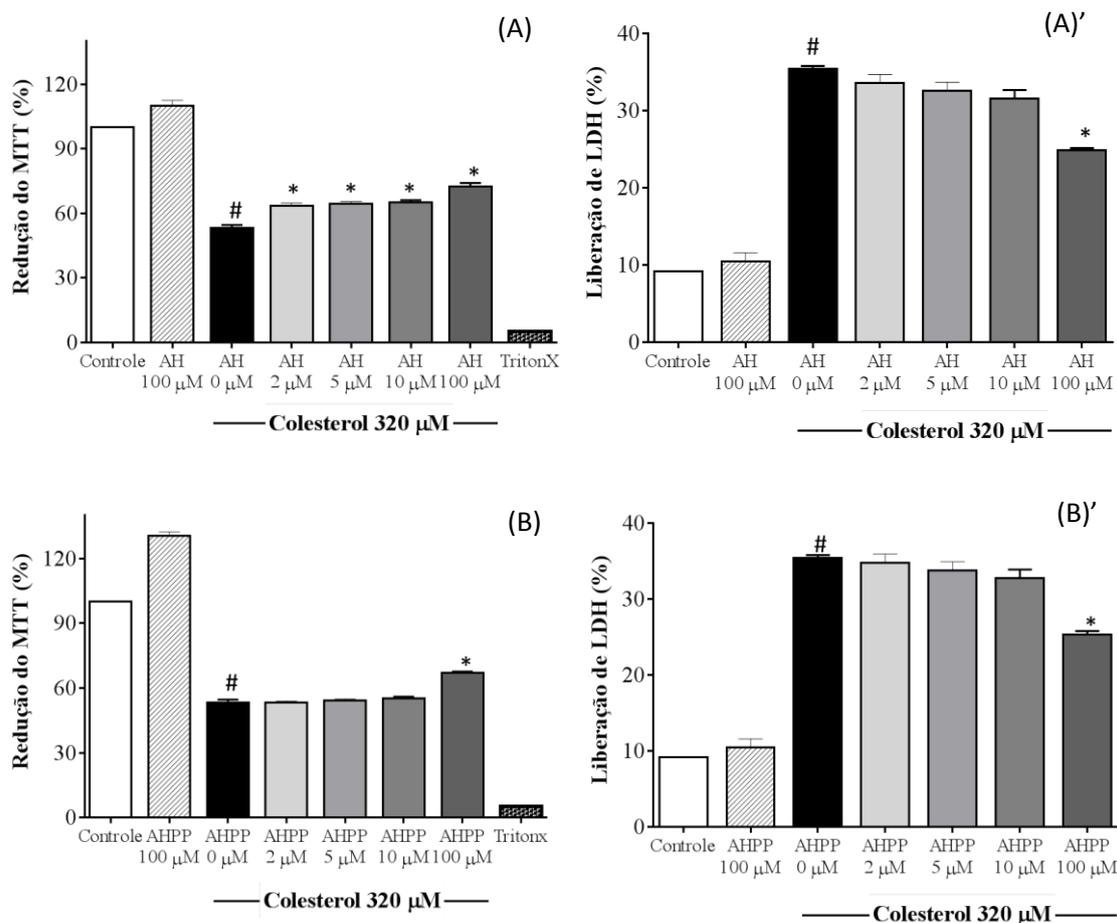


Figura 7. Efeito dos ácidos fenólicos na diminuição da viabilidade celular induzida por colesterol em células Min6 com 6 h de incubação. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT e LDH. (A) e (A') ácido hipúrico, (B) e (B') ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito (n = 6).

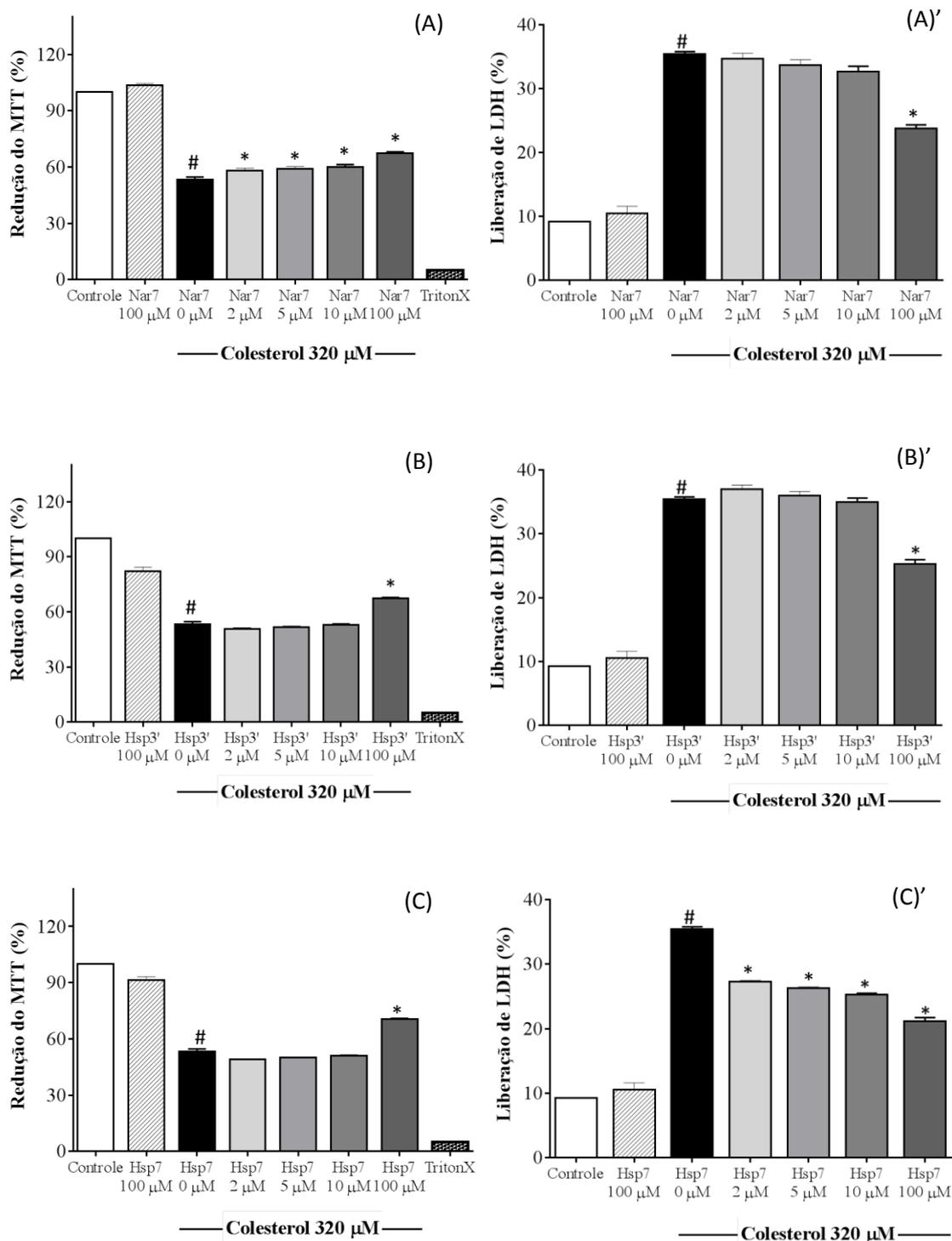


Figura 8. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na diminuição da viabilidade celular induzida por colesterol em células Min6 com 6 h de incubação. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de MTT e LDH. (A) e (A') naringenina 7-glucuronídeo, (B) e (B') hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) e (C') hesperetina 7-glucuronídeo. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito ($n = 6$).

7.4 Efeito dos metabólitos de flavanonas na viabilidade celular avaliada pela contagem de células

Não foi observado aumento significativo no número de células nos grupos tratados com as diferentes concentrações dos metabólitos de flavanonas em relação ao controle nos diferentes tempos de incubação (Figuras 9 e 10). Entretanto, no tempo de incubação de 12h, foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número celular entre 68% e 87% em células tratadas com AH nas concentrações testadas em relação ao controle (Figura 9). Também foi observado uma diminuição significativa no número celular em células tratadas com AHPP (10 μM e 100 μM) e Hsp7 (2 μM , 5 μM , 10 μM e 250 μM) em 12h de incubação (Figuras 9 e 10).

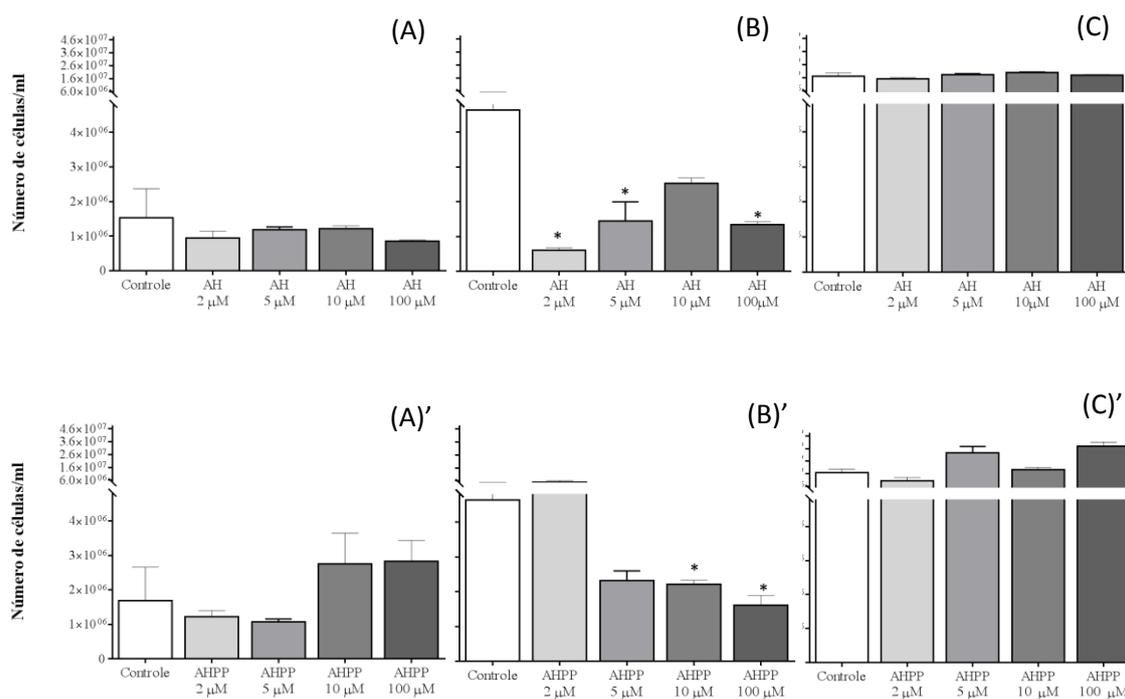


Figura 9. Contagem de células Min6 após tratamento dos ácidos hipúrico e 3-(4-hidroxifenil)propiónico. A contagem celular foi analisada por Contador de células automático TC 10 BioRad. Tempo de incubação (A) e (A)' 6 h, (B) e (B)' 12 h e (C) e (C)' 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao controle ($n = 6$).

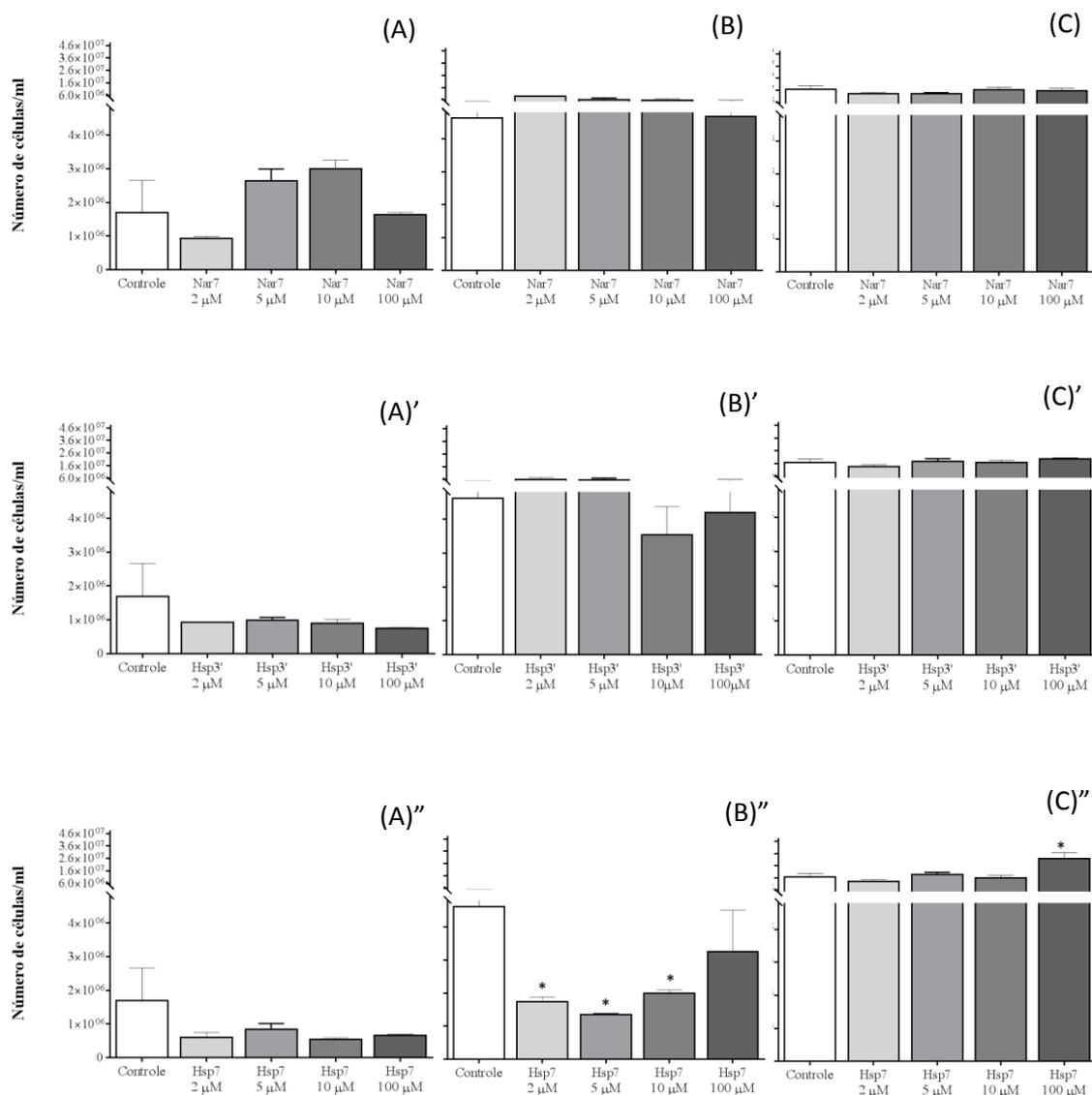


Figura 10. Contagem de células Min6 após tratamento dos metabólitos de flavanonas glucuronidados. A contagem celular foi analisada por Contador de células automático TC 10 BioRad. Tempo de incubação (A), (A)' e (A)'' 6 h, (B), (B)' e (B)'' 12 h e (C), (C)' e (C)'' 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao controle (n = 6).

7.5 Efeito dos metabólitos de flavanonas sobre o estresse oxidativo em células Min6 tratadas com colesterol

7.5.1 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um dos parâmetros analisados na ocorrência de estresse oxidativo. A alta concentração de malondialdeído (MDA) nas células é um biomarcador conhecido de dano oxidativo. Células Min6 tratadas com colesterol apresentaram níveis elevados de MDA (7 η mol de MDA/mg de proteína) quando comparadas ao controle (0,31 η mol de MDA/mg de proteína) (Figuras 11 e 12). Entre os metabólitos de flavanonas, o AHPP apresentou o maior efeito antioxidante a partir de 5 μ M (redução de 38%). No entanto, os metabólitos AH, Nar7 e Hsp3' atenuaram significativamente ($p < 0,05$) a peroxidação lipídica (Figuras 11A, 12A e 12B), entre 40% a 66%, a partir de 100 μ M.

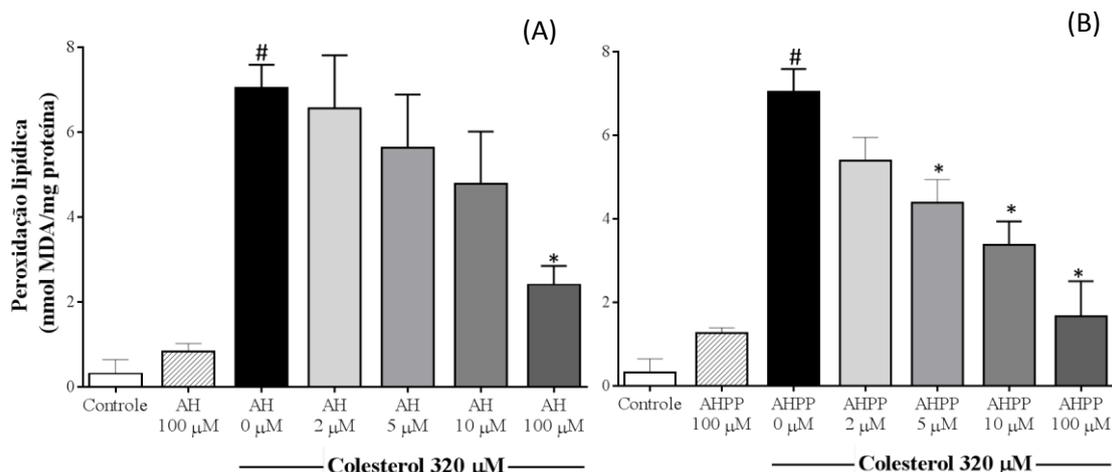


Figura 11. Efeito dos ácidos fenólicos na peroxidação lipídica em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. A peroxidação lipídica foi expressa como η M de MDA/mg de proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μ M na ausência do metabólito ($n = 6$).

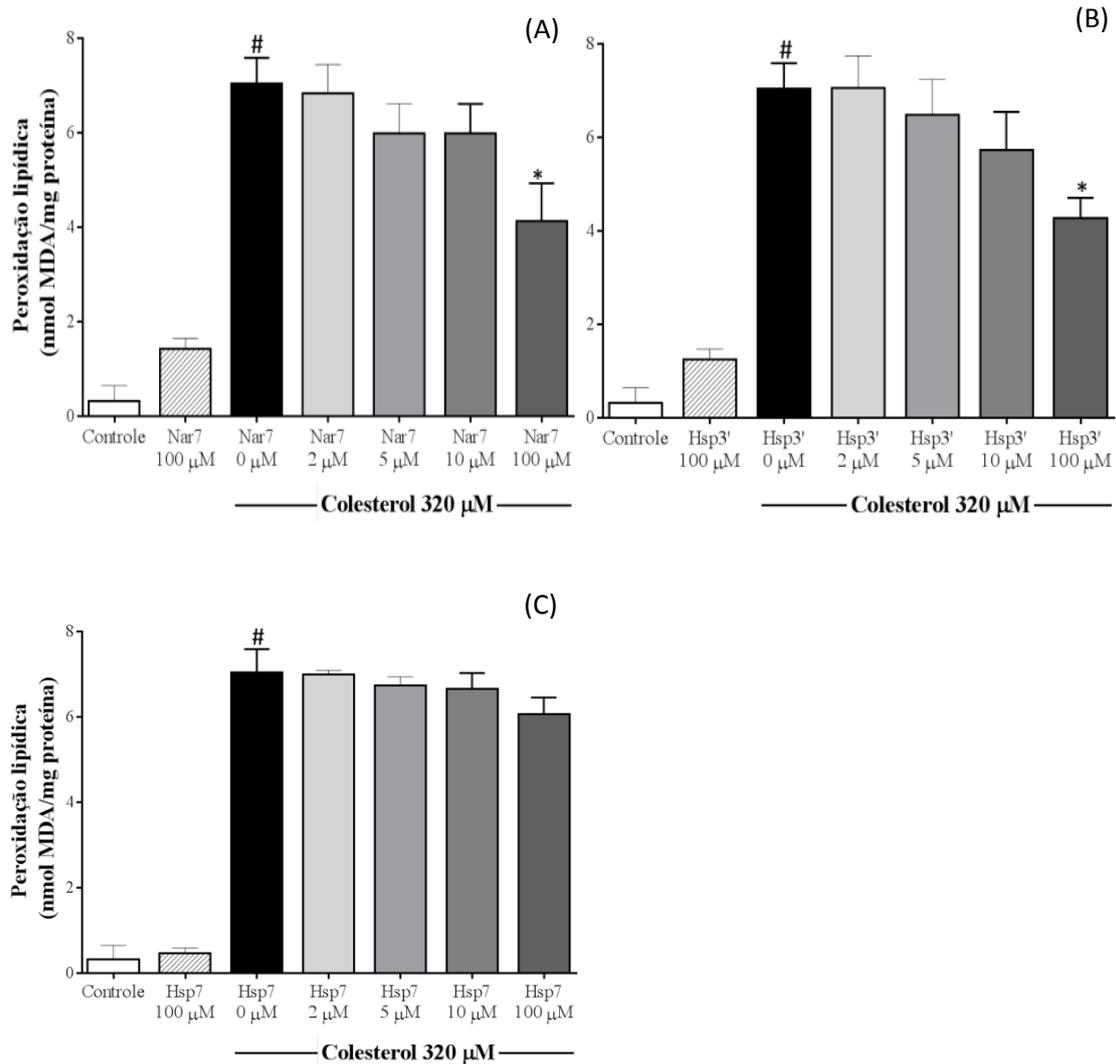


Figura 12. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na peroxidação lipídica em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A peroxidação lipídica foi expressa como ηM de MDA/mg de proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito ($n = 6$).

7.5.2 Peróxido de hidrogênio

A quantificação da formação de peróxido de hidrogênio é um outro parâmetro analisado na ocorrência de estresse oxidativo. Observou-se que células Min6 tratadas com colesterol apresentaram níveis aumentados de peróxido de hidrogênio (28 nmol H₂O₂/L/mg proteína) quando comparadas ao controle (5 nmol H₂O₂/L/mg proteína) (Figuras 13 e 14). Entretanto, todos os metabólitos de flavanonas reduziram significativamente ($p < 0,05$) a formação de peróxido de hidrogênio de forma concentração-dependente a partir da menor concentração (2 μM). Entre os metabólitos, o AH mostrou efeito antioxidante maior, apresentando redução de 40% na concentração de 2 μM (Figura 13).

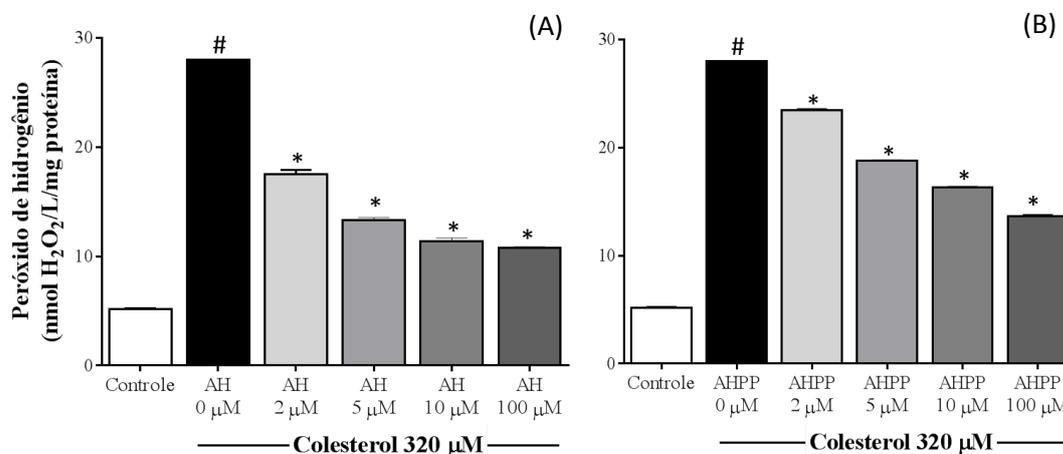


Figura 13. Efeito dos ácidos fenólicos na formação de peróxido de hidrogênio em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. A formação de peróxido de hidrogênio foi expressa como nmol H₂O₂/L/mg proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito ($n = 6$).

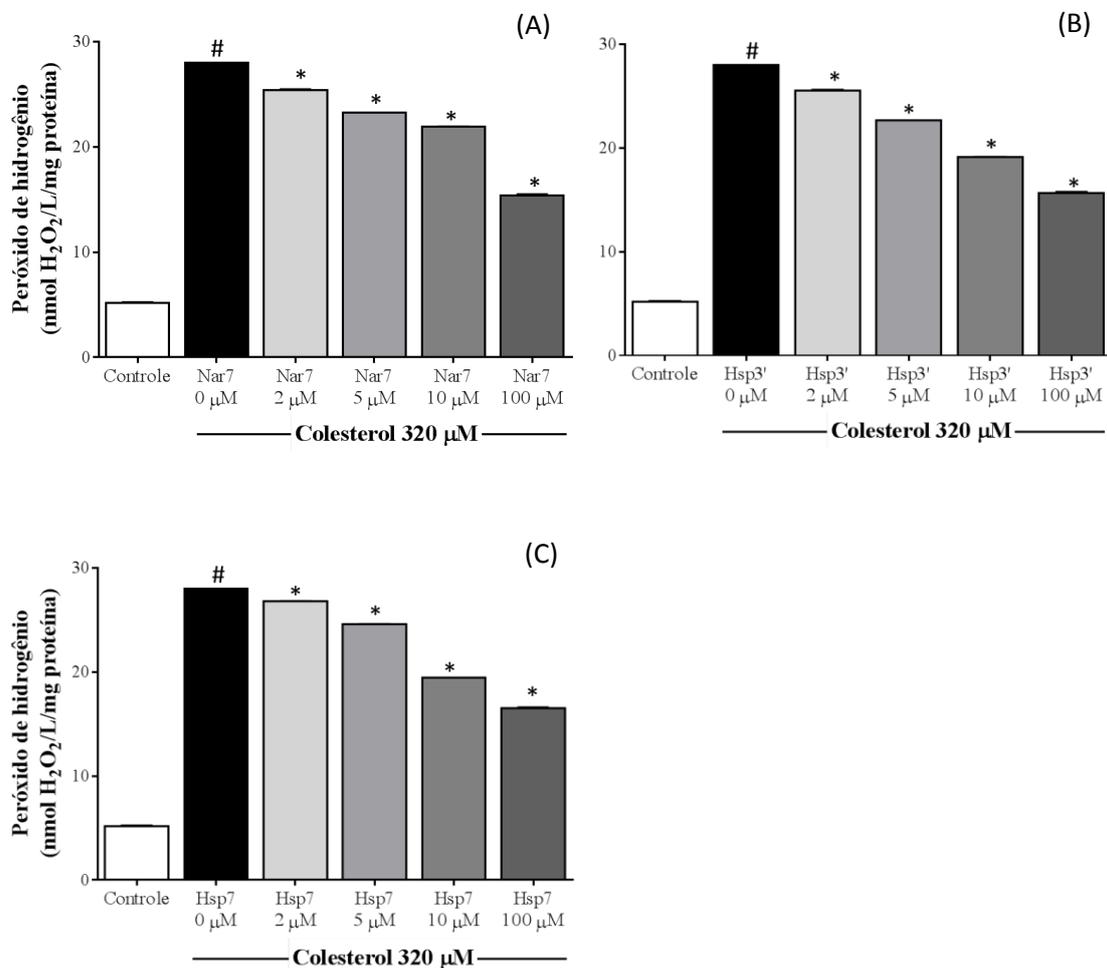


Figura 14. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na formação de peróxido de hidrogênio em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A formação de peróxido de hidrogênio foi expressa como nmol H₂O₂/L/mg proteína. #p<0,05 em relação ao controle e *p<0,05 em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito (n = 6).

7.5.3 Quantificação de ânion superóxido

Células β -pancreáticas tratadas com colesterol apresentaram aumento de ânion superóxido mitocondrial em 40% em comparação ao controle (Figuras 15 e 16). Todos os metabólitos de flavanonas protegeram contra a oxidação da MitoSoxTM na mitocôndria já a partir de 2 μ M (entre 30% a 34%) (Figuras 15 e 16).

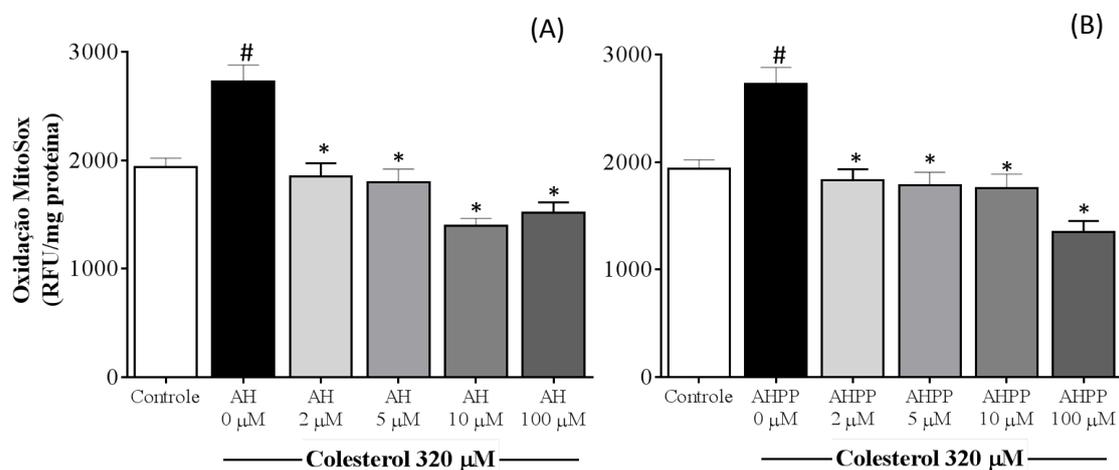


Figura 15. Efeito dos ácidos fenólicos na oxidação do MitoSoxTM Red em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico. A oxidação do MitoSoxTM Red foi expressa como RFU/mg de proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μ M na ausência do metabólito (n = 6).

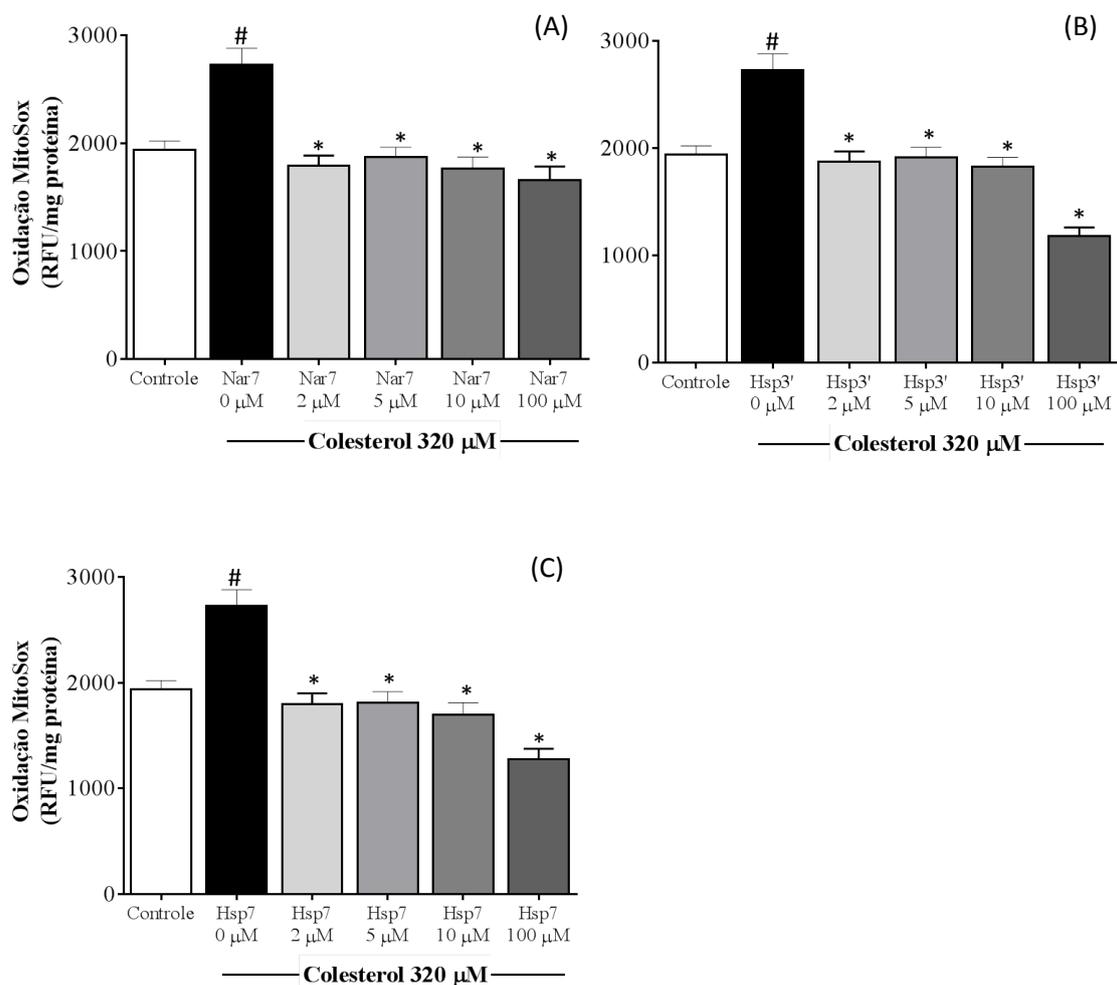


Figura 16. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na oxidação do MitoSoxTM Red em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A oxidação do MitoSoxTM Red foi expressa como RFU/mg de proteína. #p<0,05 em relação ao controle e *p<0,05 em relação ao colesterol 320 μM na ausência do (n = 6).

7.5.4 Atividades de enzimas antioxidantes

O colesterol aumentou as atividades de SOD e GPx em 3 e 1,9 vezes, respectivamente, quando comparado ao controle (Figuras 17, 18, 19 e 20). Os metabólitos AHPP, Hsp3' e Nar7 diminuíram a atividade de SOD a partir de 2 μ M (Figuras 17 e 18). Além disso, o AHPP, Hsp7 e Nar7 também diminuíram a atividade de GPx a partir de 2 μ M (Figuras 19 e 20). Entre os metabólitos, a Nar7 apresentou diminuição maior das enzimas antioxidantes (em torno de 50% na concentração de 2 μ M) (Figuras 18 e 20). Ao contrário dos outros metabólitos, o AH aumentou a atividade de GPx a partir da menor concentração testada (Figura 19). Não foi detectado atividade da enzima catalase (CAT) nas células controle e tratadas.

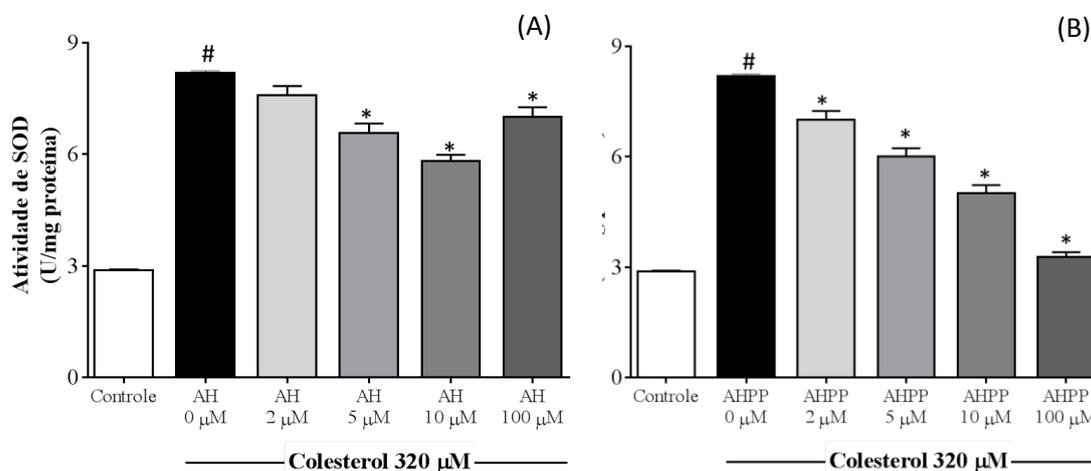


Figura 17. Efeito dos ácidos fenólicos na atividade de SOD em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. A atividade da SOD foi expressa como U/mg de proteína. # p <0,05 em relação ao controle e * p <0,05 em relação ao colesterol 320 μ M na ausência do metabólito (n = 6).

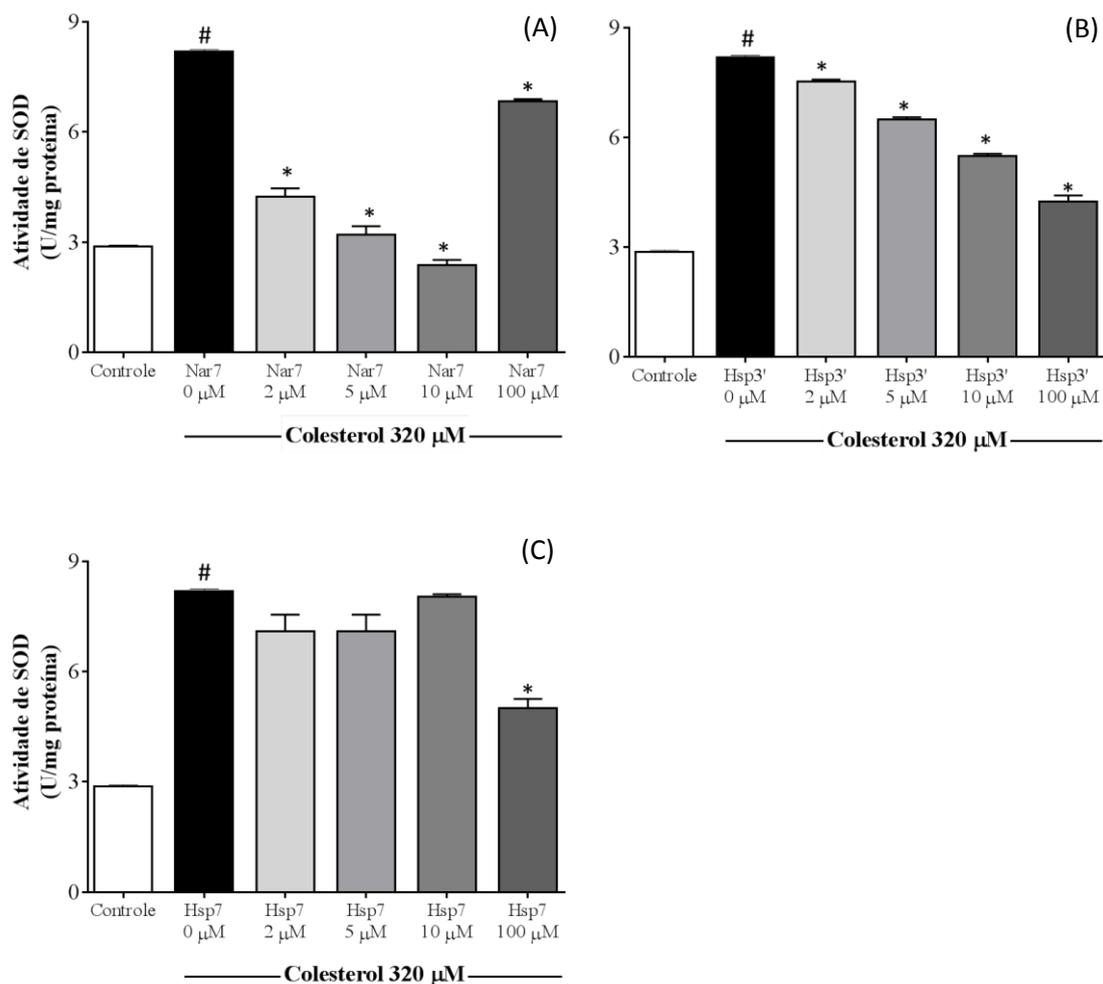


Figura 18. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na atividade de SOD em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A atividade da SOD foi expressa como U/mg de proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito ($n = 6$).

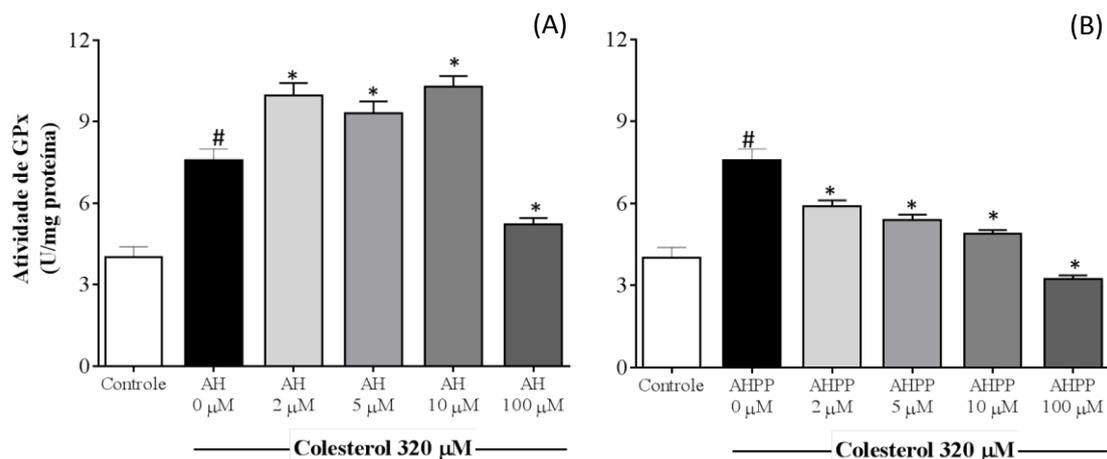


Figura 19. Efeito dos ácidos fenólicos na atividade de GPx em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico. A atividade da GPx foi expressa como U/mg de proteína. #p<0,05 em relação ao controle e *p<0.05 em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito (n = 6).

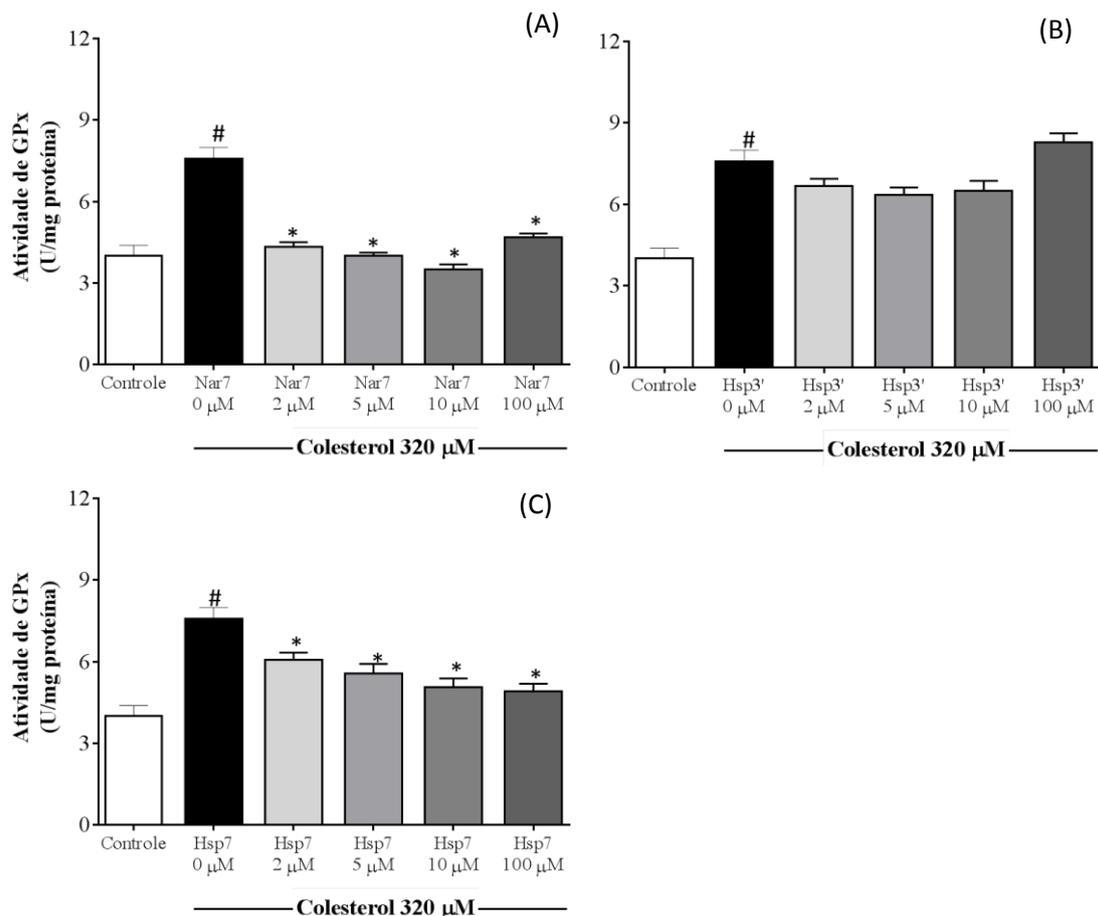


Figura 20. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronidados na atividade de GPx em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. A atividade da GPx foi expressa como U/mg de proteína. #p<0,05 em relação ao controle e *p<0.05 em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito (n = 6).

7.6 Efeito dos metabólitos de flavanonas na apoptose e necrose em células Min6 tratadas com colesterol

O tratamento com colesterol (320 μM) induziu a apoptose e necrose em 8% e 2%, respectivamente, em comparação ao controle (Figuras 21 e 22). A apoptose foi prevenida de forma concentração-dependente a partir de 5 μM , em torno de 20%, a 50% em 100 μM na presença dos ácidos fenólicos e dos metabólitos de fase-II (Figuras 21 e 22). Além disso, os ácidos fenólicos e os metabólitos glucuronidados Hsp3' e Hsp7 preveniram a necrose já a partir da menor concentração.

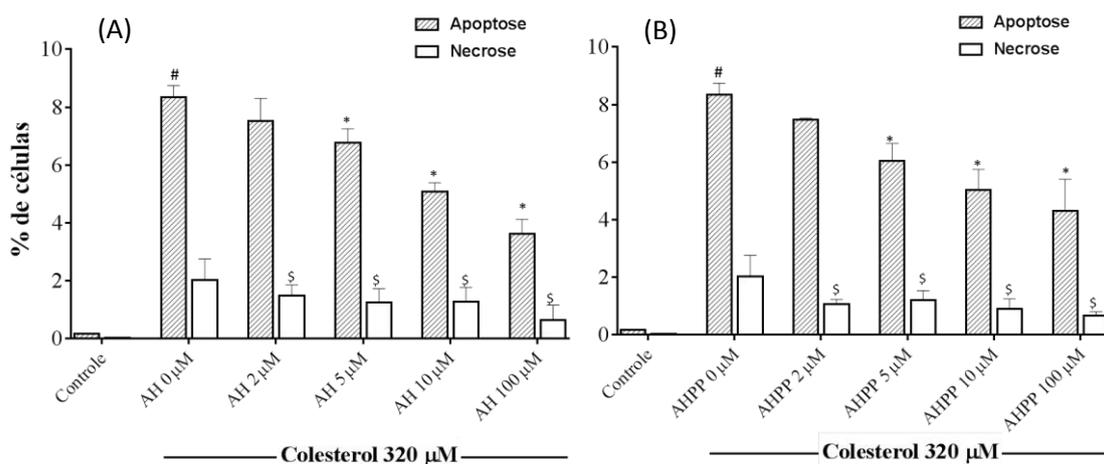


Figura 21. Efeito dos ácidos fenólicos na apoptose de células Min6 induzidas por colesterol. Apoptose foi determinada pela análise de Anexina V. Os valores foram expressos em porcentagem de células. (A) Ácido hipúrico e (B) ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico. # $p < 0.05$ em relação ao controle, * $p < 0,05$ em relação a apoptose em células tratadas com 320 μM de colesterol na ausência dos ácidos fenólicos, \$ $p < 0,05$ em relação a necrose em células tratadas com 320 μM de colesterol na ausência dos ácidos fenólicos. (n = 6).

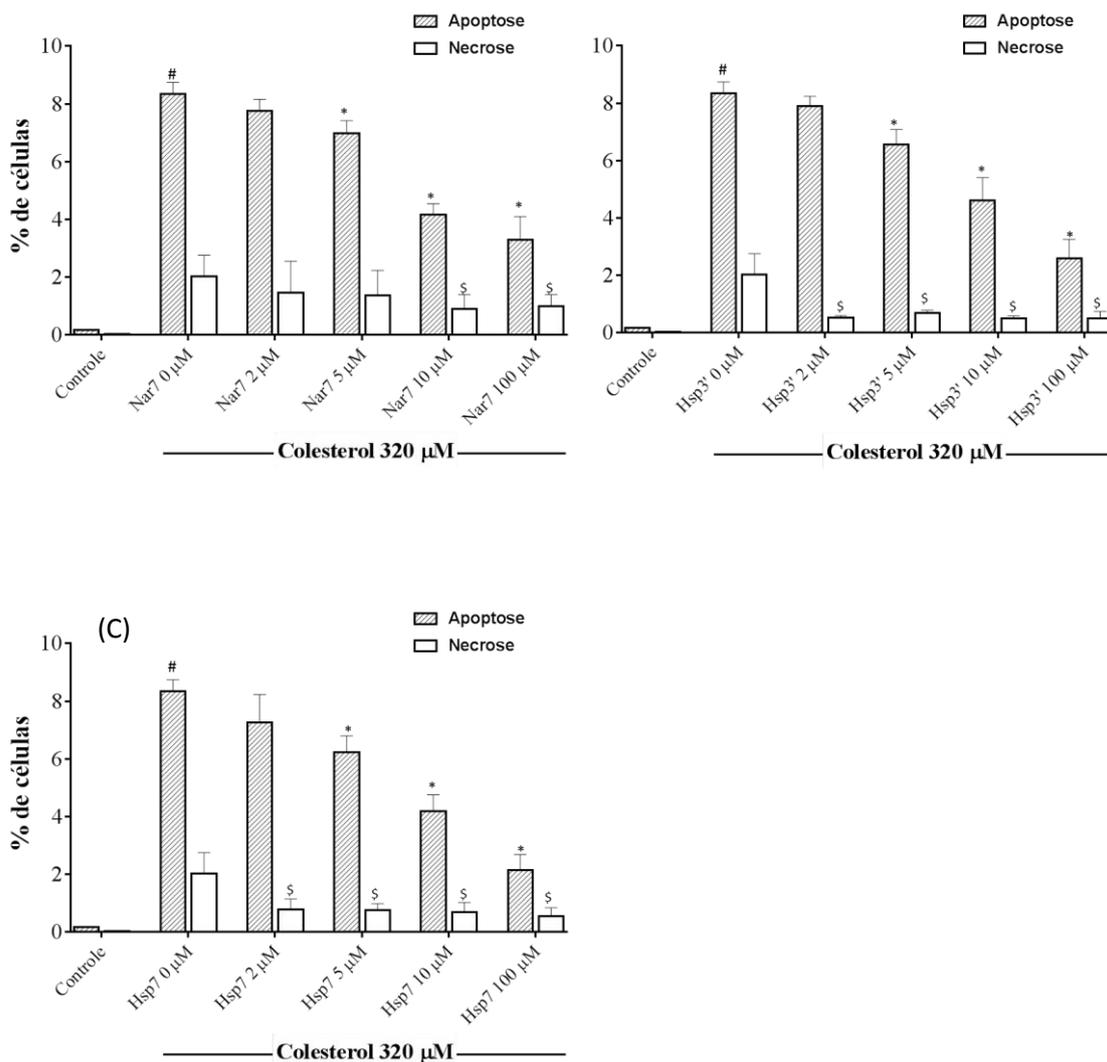


Figura 22. Efeito dos metabólitos de flavanonas na apoptose de células Min6 induzidas por colesterol. Apoptose foi determinada pela análise de Anexina V. Os valores foram expressos em porcentagem de células. (A) Naringenina 7-glucuronídeo, (B) Hesperetina 3'-glucuronídeo, (C) Hesperetina 7-glucuronídeo. # $p < 0,05$ em relação ao controle, * $p < 0,05$ em relação a apoptose em células tratadas com 320 μM de colesterol na ausência dos ácidos fenólicos, \$ $p < 0,05$ em relação a necrose em células tratadas com 320 μM de colesterol na ausência dos ácidos fenólicos. (n = 6).

7.7 Efeito dos metabólitos de flavanonas na função mitocondrial em células Min6 tratadas com colesterol

O colesterol diminuiu em 40% o Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) nas células Min6 (Figuras 23 e 24). A disfunção mitocondrial induzido por colesterol foi prevenida pelos ácidos fenólicos e metabólitos glucuronidados em todas as concentrações testadas (Figuras 23 e 24).

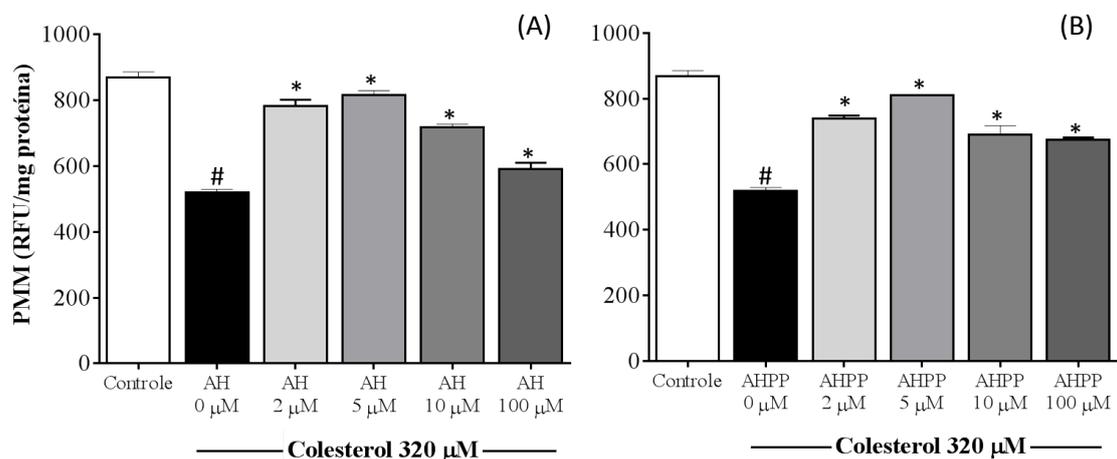


Figura 23. Efeito dos ácidos fenólicos na função mitocondrial em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil)propionico. Os resultados do Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) foram expressos como RFU/mg de proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito (n = 6).

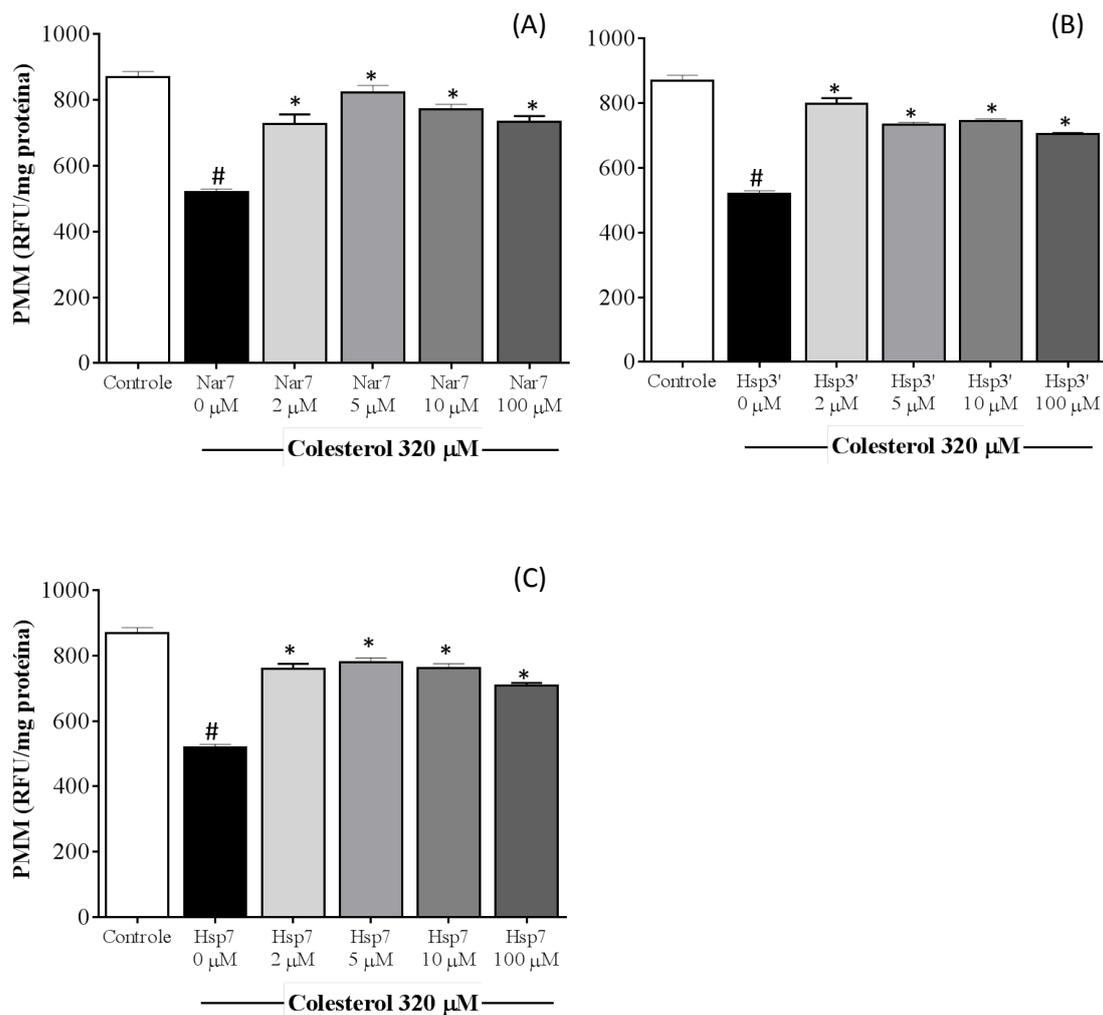


Figura 24. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na função mitocondrial em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. Os resultados do Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) foram expressos como RFU/mg de proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle e * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito ($n = 6$).

7.8 Efeito dos metabólitos de flavanonas na secreção de insulina em células Min6 tratadas com colesterol

O efeito da glicose (25 mM) na secreção de insulina foi avaliado pelas células β no meio de cultura. Foi observado um aumento significativo em 4 vezes na secreção de insulina quando estimulado com glicose em comparação com células Min6 não estimuladas com glicose (insulina basal) (Figuras 25 e 26). O tratamento com colesterol diminuiu a secreção de insulina basal e estimulado com glicose em 30% e 40%, respectivamente. Entretanto, células tratadas com AHPP e Hsp7, na concentração de 5 μ M, aumentaram a secreção de insulina após estímulo com glicose em 12% quando comparadas com células tratadas com colesterol (Figuras 25 e 26). Os ácidos fenólicos e os metabólitos de flavanonas, a partir da concentração de 2 μ M, tiveram efeito positivo na secreção de insulina basal, atingindo concentração de secreção de insulina semelhante às células controle (não tratadas com colesterol).

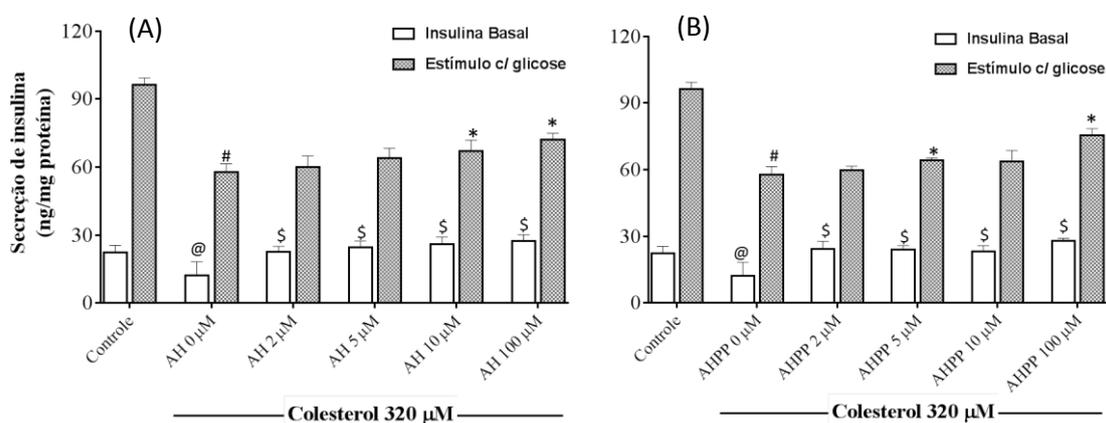


Figura 25. Efeito dos ácidos fenólicos na secreção de insulina em células Min6 tratadas com 320 μ M de colesterol em 6 h de incubação. (A) ácido hipúrico, (B) ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico. Os resultados de secreção de insulina foram expressos como ng/mg proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle após estímulo com glicose (25 mM), * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μ M na ausência do metabólito após estímulo com glicose (25 mM), @ $p < 0,05$ em relação ao controle na insulina basal, \$ $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μ M na ausência do metabólito na insulina basal (n = 6).

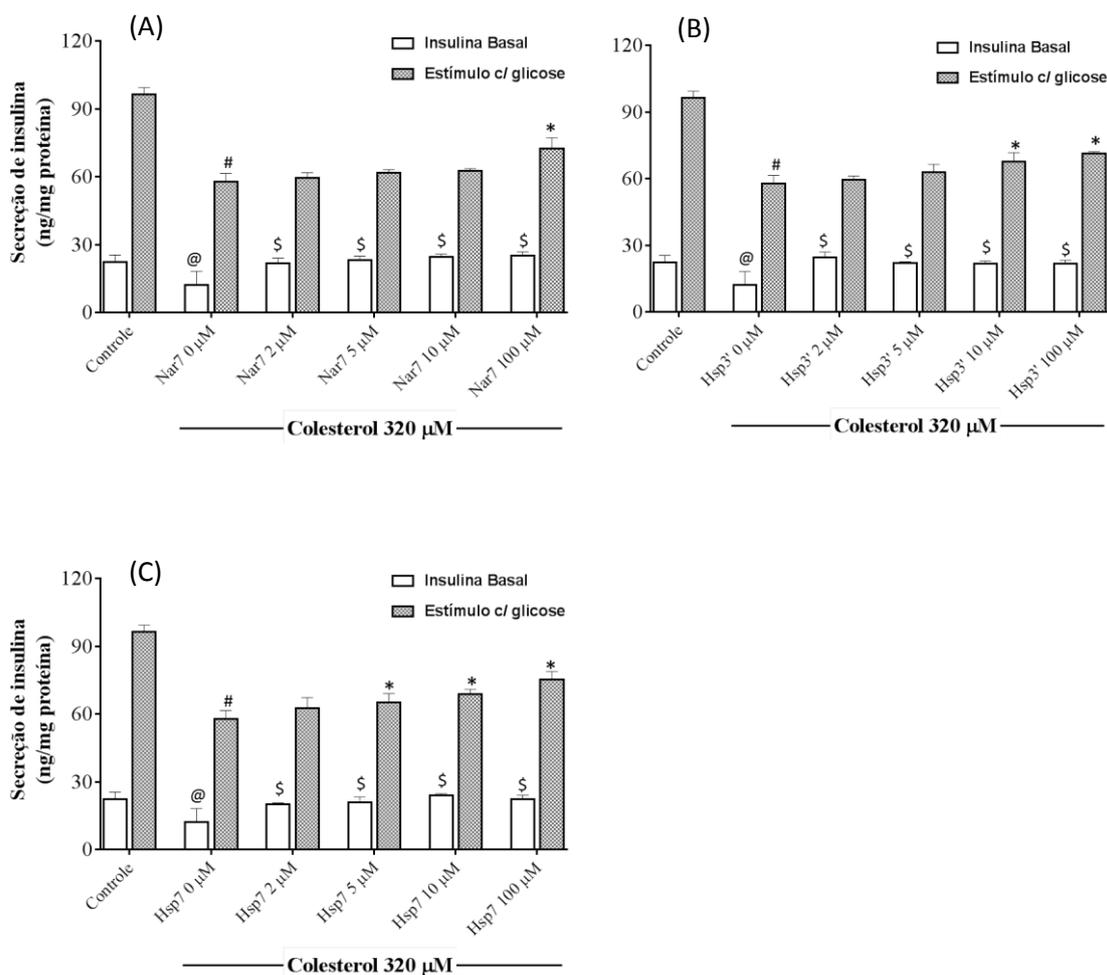


Figura 26. Efeito dos metabólitos de flavanonas glucuronizados na secreção de insulina em células Min6 tratadas com 320 μM de colesterol em 6 h de incubação. (A) naringenina 7-glucuronídeo, (B) hesperetina 3'-glucuronídeo e (C) hesperetina 7-glucuronídeo. Os resultados de secreção de insulina foram expressos como ng/mg proteína. # $p < 0,05$ em relação ao controle após estímulo com glicose (25 mM), * $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito após estímulo com glicose (25 mM), @ $p < 0,05$ em relação ao controle na insulina basal, \$ $p < 0,05$ em relação ao colesterol 320 μM na ausência do metabólito na insulina basal (n = 6).

7.9 Uptake celular dos metabólitos de flavanonas

Após 6 h de incubação, nas concentrações de 5 μM e 10 μM , todos os metabólitos de fase-II e o AH foram recuperados no meio celular e nas células β . As porcentagens de recuperação dos metabólitos detectados no interior da célula foram 15%, 19%, 0,17% e 0,22% para o AH, Nar7, Hsp3' e Hsp7, respectivamente, na menor concentração (Figura 27). Por outro lado, o AHPP não foi identificado no meio celular e na célula.

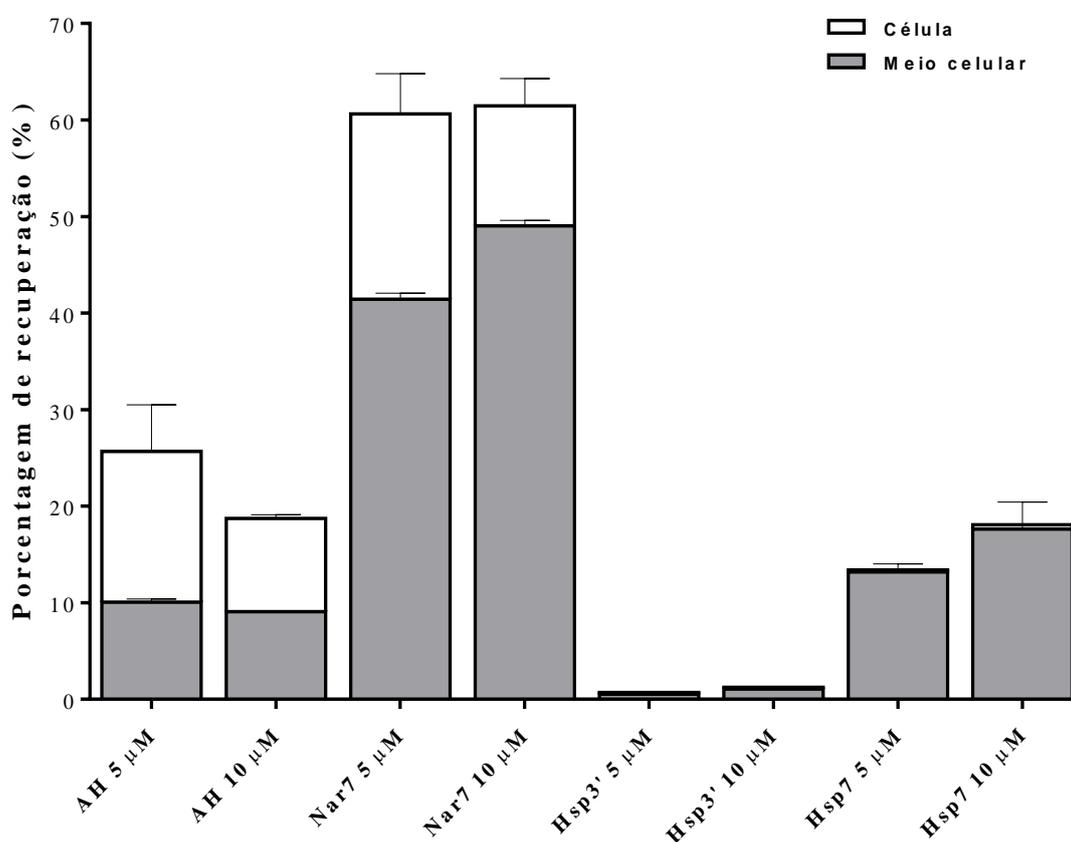


Figura 27. Uptake celular e concentração no meio celular dos metabólitos de flavanonas após tratamento de 6 h de incubação na ausência de colesterol. O uptake celular e concentração no meio celular foi analisada por LC-MS. Ácido hipúrico (AH), Naringenina 7-glucuronídeo (Nar7), Hesperetina 3'-glucuronídeo (Hsp3'), Hesperetina 7-glucuronídeo (Hsp7) (n = 6).

8. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor *in vitro* dos principais metabólitos das flavanonas, naringenina 7-glucuronídeo, hesperetina 3'-glucuronídeo e hesperetina 7-glucuronídeo e de seus principais catabólitos, ácido hipúrico e ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico contra o estresse oxidativo induzido por colesterol nas células β -pancreáticas.

O colesterol é um dos fatores que desencadeiam o estresse oxidativo e disfunção na célula β -pancreática, gerando aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. O aumento das EROs acarreta em comprometimento da função celular, incluindo síntese e secreção de insulina (Ishikawa et al., 2008; Dirx et al., 2012). O estresse oxidativo é uma via comum para vários tipos de danos, incluindo glucotoxicidade, lipotoxicidade e apoptose celular (Li et al., 2013). No presente trabalho, os metabólitos de flavanonas e seus catabólitos mostraram proteger as células β -pancreáticas *in vitro* contra a disfunção induzida pelo colesterol, e esse efeito pode estar associado às propriedades anti-apoptóticas e antioxidantes desses compostos, além de sua capacidade de prevenir a disfunção mitocondrial.

A linhagem celular de insulinoma INS-1 e Min6 tem sido utilizada como um modelo experimental pela sua capacidade de secretar insulina sob concentrações de glicose fisiológicas e a sua susceptibilidade à glicotoxicidade, tal como se encontra nas células β -pancreáticas *in vivo* (Hohmeier et al., 2000; Skelin et al., 2010). No presente estudo, as condições para a indução do estresse oxidativo nas células β -pancreáticas da linhagem Min6 foi padronizado em 320 μ M de colesterol e 6 h de incubação. Esta concentração, apesar de induzir o estresse oxidativo, é fisiológica e encontrada em níveis circulantes, uma vez que valores de até 5,2 mM no plasma humano são

considerados normais (Rauchhaus et al., 2003). Resultados semelhantes também foram encontrados em outros estudos utilizando a mesma linhagem celular (Zhao et al., 2010 e Carrasco-Pozo et al., 2015).

O estresse oxidativo induzido pelo colesterol acarretou em redução da viabilidade celular, evidenciado pelo aumento de liberação de LDH e diminuição da redução de MTT pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase no interior da mitocôndria (Fang et al., 2019), mostrando um comprometimento da função celular e mitocondrial. O efeito danoso do colesterol na função mitocondrial também foi estudado. Os resultados mostraram que o colesterol diminuiu o PMM, diminuindo a capacidade de reter a rodamina 123, confirmando os resultados encontrados por Carrasco-Pozo et al. (2015). Além disso, o colesterol aumentou o estresse oxidativo das células Min6, promovendo a produção de EROs e peroxidação lipídica. O radical ânion superóxido é um precursor para a geração de outras EROs, que possui potencial elétrico necessário para desencadear uma reação em cadeia oxidativa, como a peroxidação lipídica, tendo efeito danoso para a membrana celular e mitocondrial (Bogan et al., 2012; Silvius 2003). De fato, as EROs podem induzir a peroxidação lipídica e romper o arranjo da bicamada lipídica da membrana que pode inativar receptores de membrana e enzimas, aumentando a permeabilidade do tecido (Birben et al., 2012).

Em resposta à alteração no potencial redox em nosso modelo, observou-se um aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e da glutathione peroxidase (GPx), diminuindo assim a reatividade das EROs geradas (Tahara et al., 2009), possivelmente pela ativação da via Keap1-Nrf2-ARE (Abdel-Magied et al., 2019). Assim, a redução da viabilidade celular e da função mitocondrial em células tratadas com colesterol pode ser decorrente do aumento de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio ocasionado pelo estresse oxidativo, como mostrado neste estudo,

provavelmente pela inibição enzimática do complexo I da cadeia de transporte de elétrons I (Turrens, 2003). Este mecanismo foi proposto para rotenona e indometacina que inibiram o complexo I na mitocôndria, aumentando ânion superóxido (Murphy, 2009).

A diminuição da capacidade de reter a rodamina 123, após o tratamento com colesterol, confirma a alteração da função mitocondrial, que por sua vez pode levar à apoptose (Zhao et al., 2010). Essa disfunção mitocondrial pode induzir uma alteração no poro de transição da permeabilidade mitocondrial, um principal efeito para desencadear a via da apoptose celular mediada pela liberação do citocromo c (Giorgio et al., 2013). Além disso, o colesterol pode induzir a apoptose nas células β promovendo o estresse oxidativo e a ativação da sinalização de p38 MAPK (Lu et al., 2011). O efeito do colesterol no status redox das células β causou degradação tanto na membrana mitocondrial quanto na membrana plasmática, podendo ter ativado assim a apoptose via mitocondrial, o que explica o aumento da apoptose celular no grupo tratado com colesterol, conforme observado neste estudo. Portanto, o tratamento com colesterol diminuiu a viabilidade celular e aumentou a apoptose celular, sugerindo que a mitocôndria desempenha um papel vital na apoptose celular induzida por colesterol.

Considerando que a insulina é uma molécula chave em relação à homeostase da glicose, o efeito do colesterol na secreção de insulina foi estudado, especificamente em resposta à glicose. O colesterol prejudicou a capacidade dos grânulos secretores de insulina de responder a estímulos, alterando o tráfico de membranas devido ao seu efeito na rigidez de membrana, resultando em diminuição na secreção de insulina (Bogan et al., 2012). O efeito danoso do colesterol na secreção de insulina também foi descrito em ilhotas de Langerhans isoladas de camundongos C57BL/6J e em células β pancreáticas INS-1, mostrando que o colesterol interage com domínios lipídicos da

membrana celular (Dirkx et al., 2012; Hao et al., 2007). Este dano na secreção de insulina pode ter resultado em níveis elevados de superóxido e diminuição da sensibilidade à insulina, causando um comprometimento da capacidade da secreção de insulina pelas células β em suportar a homeostase de glicose (Miranda et al., 2005). As alterações na ação da insulina podem levar à condição de resistência insulínica. Há um comprometimento à tolerância à glicose a medida que os níveis de glicose no sangue aumentam, podendo desencadear diabetes tipo 2 (Jellinger, 2007).

A hesperetina e a naringenina são polifenóis encontrados em frutas cítricas. Elas são encontradas na corrente sanguínea principalmente como metabólitos conjugados de fase II e ácidos fenólicos produzidos a partir da microbiota intestinal, podendo reduzir o estresse oxidativo nas células β , melhorando sua função (Crozier, 2009). Os metabólitos da hesperetina alcançam concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) entre 0,2 a 1,6 $\mu\text{mol/L}$ após 4-5 h da ingestão de suco de laranja, enquanto que o $C_{m\acute{a}x}$ para a naringenina é bem menor (0,015 a 0,20 $\mu\text{mol/L}$) (Manach et al., 2003; Pascual-Teresa et al., 2007; Mullen et al., 2008; Vallejo et al., 2010; Schär et al., 2015). Já para os ácidos fenólicos oriundos da ação da microbiota sobre as flavanonas, foi encontrado $C_{m\acute{a}x}$ de 13 $\mu\text{mol/L}$, com o ácido hipúrico respondendo por 54% do total circulante (Schär et al., 2015). Desta forma, do ponto de vista fisiológico, os ácidos fenólicos e os metabólitos da fase II das flavanonas são compostos biologicamente ativos em relação à saúde humana. Em nosso trabalho foi possível observar que os metabólitos de fase II e os ácidos fenólicos foram detectados no interior da célula, o que indica possível absorção.

Neste estudo, os metabólitos de flavanonas e seus catabólitos protegeram as células Min6 contra a perda da viabilidade celular induzida pelo colesterol. Efeito semelhante foi observado em células Min6 tratadas com ácido 3,4-dihidroxifenilacético,

um metabólito de quercetina derivado da microbiota intestinal, atenuando a redução da viabilidade celular induzida pelo colesterol (Carrasco-Pozo et al., 2015). Além disso, a atenuação do estresse oxidativo, apoptose e disfunção mitocondrial por todos os metabólitos foi evidenciada pela melhoria da viabilidade celular, função mitocondrial, redução das atividades de SOD e GPx, redução da peroxidação lipídica, ânion superóxido e formação de peróxido de hidrogênio e melhora da secreção de insulina.

É possível que o efeito protetor dos metabólitos das flavanonas contra a peroxidação lipídica, ânion superóxido e a queda das atividades das enzimas antioxidantes possam estar relacionadas com sua capacidade de neutralização de radicais livres, atuando como antioxidantes direto no sequestro de radicais livres, oriundos da peroxidação lipídica ou outras EROs, tais como o ânion superóxido e radical hidroxila geradas pela indução do colesterol (Birben et al., 2012). Neste contexto, a presença dos metabólitos no interior da célula reforça esta hipótese. Apesar disso, a taxa de *uptake* celular de flavanonas *in vitro* pode não ser semelhante ao *uptake* celular *in vivo*. *In vitro*, as células crescem na forma de monocamada. Por isso, elas podem ser mais expostas aos metabólitos de flavanonas no meio de cultura. Já *in vivo*, a quantidade dos metabólitos expostos às células pode não ser tão alta quanto *in vitro*, devido à superfície de crescimento limitada no ambiente celular (Pham, 2012).

De outra forma, os metabólitos podem ter minimizado os efeitos do colesterol sobre as enzimas do complexo I na mitocôndria, agindo na proteção mitocondrial, diminuindo a produção do ânion superóxido. Esse mecanismo foi proposto para a quercetina e a cianidina, o qual atenuaram a inibição da atividade do complexo I mitocondrial, induzido por hipóxia e pela rotenona em linhagens celulares de coração e fígado, respectivamente (Zholobenko et al., 2017 e Khailova et al., 2017), eventos fortemente ligados a formação de EROs mitocondriais (Carrasco-Pozo et al., 2015).

Ambos os mecanismos poderiam reduzir a geração de EROs, peroxidação lipídica e apoptose nas células β e, conseqüentemente, menor ativação da via Nrf2, evidenciada pela redução da atividade das enzimas antioxidantes.

A redução no estresse oxidativo induzida pelos metabólitos de flavanonas provavelmente refletiu na melhora significativa da secreção de insulina nas células β -pancreáticas, comprometida pelo estresse oxidativo. A naringina, um metabólito de flavanona, também mostrou uma capacidade de prevenir a disfunção e diabetes em ilhotas de Langerhans, diminuindo a hiperglicemia e melhorando a disfunção das ilhotas em camundongos diabéticos com deficiência de insulina (Lim et al., 2018).

Além do efeito protetor contra o estresse oxidativo, um outro fator observado foi o aumento de mais de 100% na viabilidade celular em relação ao controle em células tratadas com a maioria dos metabólitos de flavanonas, nos maiores tempos de incubação e na ausência de colesterol. O mecanismo deste efeito ainda é desconhecido. No entanto, uma vez que não foi observado aumento significativo na proliferação celular, o aumento da viabilidade celular pode ser em decorrência de aumento no número de mitocôndrias celulares, o qual é analisado pelo método MTT. Vários polifenóis, como o resveratrol e a quercetina, demonstraram uma capacidade de ativar a *Sirtuin 1* (SIRT1) *in vitro*, que está relacionado com a biogênese mitocondrial através da ativação da PGC-1 α mediada por deacetilação (Santos et al., 2018; Park et al., 2012). Deste modo, um possível aumento no número de mitocôndrias nas células β pode estar relacionado com melhora na função celular.

9. CONCLUSÃO

Em conclusão, os metabólitos de flavanonas protegeram as células β -pancreáticas contra o estresse oxidativo induzido pelo colesterol e reduziram os efeitos em cadeia sobre a sua função. O ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico e a hesperetina 7-glucuronídeo apresentaram efeito significativo reduzindo o estresse oxidativo induzido pelo colesterol e aumentando a secreção de insulina já nas menores concentrações (2 μ M e 5 μ M), mostrando maior eficiência em comparação aos demais metabólitos. Além disso, os metabólitos de fase II e seus catabólitos provenientes das flavanonas da laranja, que são encontrados circulantes, apresentam ação protetora nas células β , podendo contribuir para reduzir as comorbidades.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - PROEX e também com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº Processo 2018/03965-0 e 2018-26584-2).

10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdel-Magied, N., Shedid, S. M. (2019). The effect of naringenin on the role of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2 (Nrf2) and haem oxygenase 1 (HO-1) in reducing the risk of oxidative stress-related radiotoxicity in the spleen of rats. *Environmental Toxicology*, 34(7):788-795.
- Anacleto, S. L., Lajolo, F. M., Hassimotto, N. M. A. (2019). Estimation of dietary flavonoid intake of the Brazilian population: A comparison between the USDA and Phenol-Explorer Databases. *Journal of Food Composition and Analysis*, 78, 1-8.
- Araújo, M. F. M., Beserra, E. P., Araújo, T. M., Chaves, E. S. (2006). Childhood obesity: a reflection about familiar dynamics through an ethnographic point of view. *Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste*, 7, 103-108.
- Azzini, E., Venneria, E., Ciarapica, D., Foddai, M. S., Intorre, F., Zaccaria, M., Maiani, F., Palomba, L., Barnaba, L., Tubili, C., Maiani, G., Polito, A. (2017). Effect of Red Orange Juice Consumption on Body Composition and Nutritional Status in Overweight/Obese Female: A Pilot Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-9.
- Bhattacharya, S., Oksbjerg, N., Young, J. F., Jeppesen, P. B. (2014). Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 16, 602-612.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
- Bogan, J. S., Xu, Y., Hao, M. (2012). Cholesterol accumulation increases insulin granule size and impairs membrane trafficking. *Traffic*, 13, 1466-1480.

- Bonaventura, J., Schroeder, W. A., Fang, S. (1972). Human erythrocyte catalase: an improved method of isolation and a reevaluation of reported properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics – Journal*, 150, 606-617.
- BRASIL. (2016). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP). São Paulo. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/>. Acesso em: 15.03.2017.
- Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Castillo, R. L., Chen, C. (2015). 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic β -cells dysfunction induced by high cholesterol. *Experimental Cell Research*, 3334, 270-282.
- Carrasco-Pozo, C., Pastene, E., Vergara, C., Zapata, M., Sandoval, C., Gotteland, M. (2012). Stimulation of cytosolic and mitochondrial calcium mobilization by indomethacin in Caco-2 cells: modulation by the polyphenols quercetin, resveratrol and rutin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 2052-2061.
- Cerf, M. E. (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 1-12.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, 1001-1043.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. Comprehensive Invited Review. *Antioxidants & Redox signaling*, 18, 1818-1892.
- Dirkx, R. Jr., Solimena, M. (2012). Cholesterol-enriched membrane rafts and insulin secretion. *Journal of Diabetes Investigation*, 3(4):339-46.
- Donadio, J. L. S. (2011). Polimorfismos nos genes da enzima glutationa peroxidase e biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio em população adulta de São

Paulo. 75f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Ewing, J. F., Janero, D. R. (1995). Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry*, 232, 243-248.

Fang, J., Zhao, X., Li, S., Xing, X., Wang, H., Lazarovici, P., Zheng, W. (2019). Protective mechanism of artemisinin on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells against apoptosis induced by hydrogen peroxide via activation of c-Raf-Erk1/2-p90rsk-CREB pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1):312.

Figueira, T. R., Barros, M. H., Camargo, A. A., Castilho, R. F., Ferreira, J. C., Kowaltowski, A. J., Sluse, F. E., Souza-Pinto, N. C., Vercesi, A. E. (2013). Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants & Redox signaling*, 18, 2029-2074.

Flohé, L., Gunzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114-120.

Fournier, T., Medjoubi-N, N., Porquet, D. (2000). Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 18, 157-171.

Fu, Z., Gilbert, E. R., Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9, 25-53.

Fujimoto, K., Polonsky, K. S. (2009). Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 4, 30-37.

Gezginci-Oktayoglu, S., Onay-Ucar, E., Sancar-Bas, S., Karatug-Kacar, A., Arda, E. S. N., Bolkent, S. (2018). Involvement of dying beta cell originated messenger molecules in differentiation of pancreatic mesenchymal stem cells under glucotoxic and glucolipotoxic conditions. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 4235-4244.

- Giorgio, V., Stockum, S. V., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G. D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G., Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 5887-5892.
- Halestrap, A. P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(6):821-31.
- Hao, M., Head, W. S., Gunawardana, S. C., Hasty, A. H., Piston, D. W. (2007). Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes*, 56, 2328-2338.
- Harvey, R. A., Ferrier, D. R. (2012). Bioquímica ilustrada. 5. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Henriksen, E. J., Diamond-Stanic, M. K., Marchionne, E. M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 993-999.
- Ho, S., Kuo, C. (2014). Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae* pericarpium). *Food and Chemical Toxicology*, 71, 176-182.
- Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G. X., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., Newgard, C. B. (2000). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, 49, 424-430.
- Hossain, M. K., Dayem, A. A., Han, J., Yin, Y., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G., Choi, H. Y., Cho, S. (2016). Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1-32.

- IBGE. (2011). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil/IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/biblioteca-catalogo>. Acesso em 15.03.2017.
- Inoguchi, T., Nawata, H. (2005). NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Current Drug Targets*, 6, 495-501.
- Ishikawa, M., Iwasaki, Y., Yatoh, S., Kato, T., Kumadaki, S., Inoue, N., Yamamoto, T., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Yahagi, N., Kobayashi, K., Takahashi, A., Yamada, N., Shimano, H. (2008). Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic beta-cell-specific SREBP-2 transgenic mice: a new model for lipotoxicity. *The Journal of Lipid Research*, 49, 2524-2534.
- Jaganath, I. B., Mullen, W., Edwards, C. A., Crozier, A. (2006). The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Research*, 40, 1035-1046.
- Jannat, S., Ali, M. Y., Kim, H., Jung, H. A., Choi, J. S. (2016). Protective effects of sweet orange, unshiu mikan, and mini tomato juice powders on t-BHP-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21, 208-220.
- Jellinger, P. S. (2007). Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clinical Cornerstone*, 8 Suppl 7:S30-42.
- Kemperman, R. A., Bolca, S., Roger, L. C., Vaughan, E. E. (2010). Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology*, 156, 3224-3231.
- Khailova, L. S., Rokitskaya, T. I., Kotova, E. A., Antonenko, Y. N. (2017). Effect of Cyanide on Mitochondrial Membrane Depolarization Induced by Uncouplers. *Biochemistry (Moscow)*, 82, 1140-1146.

- Kitamura, T., Kitamura, Y. I. (2007). Role of FoxO Proteins in Pancreatic β Cells. *Endocrine Journal*, 54, 507-515.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 333-343.
- Kuo, T., Kim-Muller, J. Y., McGraw, T. E., Accili, D. (2016). Altered Plasma Profile of Antioxidant Proteins as an Early Correlate of Pancreatic β Cell Dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*, 291, 9648-9656.
- Latz, E., Xiao, T. S., Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13, 397-411.
- Li, J., Wang, W., Fan, C., Wang, M., Zhang, X., Hu, Q., Kong, L. (2013). Quercetin preserves β -cell mass and function in fructose-induced hyperinsulinemia through modulating pancreatic Akt/FoxO1 activation. *Hindawi Publishing Corporation*, 2013, 1-12.
- 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.
- Li, Y., Boehning, D. F., Qian, T., Popov, V. L., Weinman, S. A. (2007). Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺ uniporter activity. *The FASEB Journal*, 21(10):2474-85.
- Lim, Y. J., Kim, J. H., Pan, J. H., Kim, J. K., Park, T. S., Kim, Y. J., Lee, J. H., Kim, J. H. (2018). Naringin Protects Pancreatic β -Cells Against Oxidative Stress-Induced Apoptosis by Inhibiting Both Intrinsic and Extrinsic Pathways in Insulin-Deficient Diabetic Mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(5).

- Lu, X., J. Liu, F. Hou, Z. Liu, X. Cao, H. Seo, B. Gao. (2011). Cholesterol induces pancreatic beta cell apoptosis through oxidative stress pathway. *Cell Stress Chaperones*, 16(5):539-48.
- Manach, C., Morand, C., Gil-Izquierdo, A., Bouteloup-Demange, C., Rémésy, C. (2003). Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 235-242.
- Miranda, P. J., DeFronzo, R. A., Califf, R. M., Guyton, J. R. (2005). Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms. *American Heart Journal*, 149(1): 33-45.
- Mullen, W., Archeveque, M. A., Edwards, C. A., Matsumoto, H., Crozier, A. (2008). Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11157-11164.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1):1-13.
- Nogueira, F. N. (2004). Sistema Antioxidante e Peroxidação Lipídica em Glândulas Salivares de Ratos Diabéticos. [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP.
- Park, S. J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., Ke, H., Rehmann, H., Taussig, R., Brown, A. L., et al. (2012). Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting camp phosphodiesterases. *Cell*, 148, 421-433.
- Pascual-Teresa, S., Sánchez-Moreno, C., Granada, F., Olmedilla, B., De Ancos, B., Cano, M.P. (2007). Short and mid-term bioavailability of flavanones from oranges in humans. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 5, 129-134.
- Pereira-Caro, G., Borges, G., Hooft, J. V. D., Clifford, M. N., Del Rio, D., Lean, M. E. J., Roberts, S. A., Kellerhals, M. B., Crozier, A. (2014) Orange juice (poly)phenols

are highly bioavailable in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100, 1378-1384.

Pham, Anh., Dang. (2012). Determining the Intracellular Concentrations of Flavonoids in MDA-MB-231 Cells Using HPLC-Coupled Mass Spectrometry. Tese de mestrado. São José, USA.

Disponível em: http://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/4246

Rauchhaus, M., Clark, A. L., Doehner, W., Davos, C., Bolger, A., Sharma, R., Coats, A. J., Anker, S. D. (2003). The relationship between cholesterol and survival in patients with chronic heart failure, *Journal of the American College of Cardiology*, 42, 1933-1940.

Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 212-225.

Ribeiro, C., Dourado, G., Cesar, T. (2017). Orange juice allied to a reduced-calorie diet results in weight loss and ameliorates obesity-related biomarkers: A randomized controlled trial. *Nutrition*, 38, 13-19.

Santos, T. W., Pereira, Q. T., Teixeira, L., Gambero, A., Villena, J. A., Ribeiro, M. L. (2018). Effects of Polyphenols on Thermogenesis and Mitochondrial Biogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9).

Santos, V. S. (2014). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) como importante fonte de alguns elementos químicos essenciais potencialmente biodisponíveis e efeito neuroprotetor de seu extrato frente à neurotoxicidade do Manganês em astrócitos. 135 f. [Tese Doutorado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Schär, M. Y., Curtis, P. J., Hazim, S., Ostertag, L. M., Kay, C. D., Potter, J. F., Cassidy, A. (2015). Orange juice-derived flavanone and phenolic metabolites do not acutely

affect cardiovascular risk biomarkers: a randomized, placebo-controlled, crossover trial in men at moderate risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101, 931-938.

Sharma, A. K., Bharti, S., Ojha, S., Bhatia, J., Kumar, N., Ray, R., Kumari, S., Arya, D. S. (2011). Up-regulation of PPAR γ , heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance, β -cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 106, 1713-1723.

Silvius, J. R. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10, 174-183.

Skelin, M., Rupnik, M., Cencič, A. (2010). Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research. *Altex*, 27, 105-113.

Tahara, E. B., Navarete, F. D. T., Kowaltowski, A. J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology & Medicine*, 46, 1283-1297.

Tomás-Navarro, M., Vallejo, F., Sentandreu, E., Navarro, J. L., Tomás-Barberán, F. A. (2014). Volunteer stratification is more relevant than technological treatment of orange juice flavanone bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 24-27.

Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology (London)*, 552, 335-344.

Vallejo, F., Larros, M., Escudero, E., Zafrilla, M. P., Cerdé, B., Boza, J., García-Conesa, M. T., Espí, J. C., Tomás-Barberán, F. A. (2010). Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6516-6524.

- Youl, E., Bardy, G., Magous, R., Cros, G., Sejalon, F., Virsolvy, A., Richard, S., Quignard, J. F., Gross, R., Petit, P., Bataille, D., Oiry, C. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *British Journal of Pharmacology*, 161, 799-814.
- Zhao, Y. F., Wang, L., Lee, S., Sun, Q., Tuo, Y., Wang, Y., Pei, J., Chen, C. (2010). Cholesterol induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in mouse pancreatic beta-cell line MIN6 cells. *Endocrine*, 37, 76–82.
- Zholobenko, A. V., Mouithys-Mickalad, A., Dostal, Z., Seretyn, D., Modriansky, M. (2017). On the causes and consequences of the uncoupler-like effects of quercetin and dehydrosilybin in H9c2 cells. *PLoS One*, 12, 1-22.
- Zhou, Y., Park, S., Su, J., Bailey, K., Ottosson-Laakso, E., Shcherbina, L., Oskolkov, N., Zhang, E., Thevenin, T., Fadista, J., Bennet, H., Vikman, P., Wierup, N., Fex, M., Rung, J., Wollheim, C., Nobrega, M., Renstrom, E., Groop, L., Hansson, O. (2014). TCF7L2 is a master regulator of insulin production and processing. *Human Molecular Genetics*, 2014, 1-13.

ANEXO 1. Aquisição de células da linhagem Min6 da espécie *Mus musculus* pelo BCRJ

	TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL BIOLÓGICO	
	FOR.GQ.006.3	REVISÃO 01

TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Este Termo de Transferência de Material Biológico (TTM) foi instituído para a remessa de material biológico com base nas seguintes premissas:

- O reconhecimento de que o intercâmbio do material biológico realizado entre instituições de pesquisa nas áreas biológicas e afins, sediadas no Brasil e no exterior, é fundamental para o avanço do conhecimento.
- A garantia do cumprimento do disposto na legislação nacional, em especial, no consentimento prévio fundamentado e a repartição de benefícios, decorrentes do uso do material biológico em questão.
- O cumprimento às exigências e/ou restrições estabelecidas pelo depositante do material a ser remetido, quando houver.

Dados do Material Transferido

Célula: MIN-6

Código BCRJ: 0293

Instituição Remetente

Nome: Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ

Endereço: Rua Nossa Senhora das Graças 50 – Parque Tecnológico de Xerém – Prédio 32
Xerém – Duque de Caxias, RJ – Brasil – CEP 25.250-020

Dados do Representante da Instituição Remetente

Nome: Antonio Martins Monteiro

Cargo: Curador

Instituição Destinatária

Nome: Universidade de São Paulo

Endereço completo: Av. Professor Lineu Prestes, 580, bloco 14. Bairro: Butantã. CEP:05508-000. São Paulo-SP

Dados do Representante da Instituição Destinatária

Nome: Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

Cargo: Docente

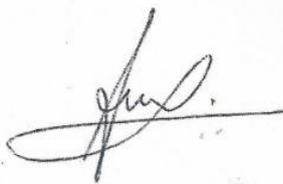
CPF: 759.809.759-34

As instituições signatárias, acima qualificadas, por meio de seus representantes devidamente constituídos, comprometem-se a utilizar as amostras transferidas entre si de acordo com as seguintes condições:

1. O material acima descrito é mantido no BCRJ sob a forma de depósito aberto, sem restrições de repasse ou utilização por parte do depositante, e, portanto, poderá ser utilizado pela instituição destinatária para o desenvolvimento de pesquisa científica, assim como para potencial de uso econômico, sendo que jamais será utilizada para aplicação em humanos.

	TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL BIOLÓGICO	
	FOR.GQ.006.3	REVISÃO 01

2. Caso haja interesse em solicitação de patente a partir de amostra remetida com base neste Termo, a instituição destinatária obriga-se a comunicar o fato à instituição remetente.
3. É vedado o início das atividades mencionadas no item anterior sem a observância ao disposto na legislação vigente, em especial, a obtenção das autorizações específicas e da autorização, por escrito, emitida e assinada pelo representante legal do BCRJ.
4. As amostras somente poderão ser repassadas a terceiros pela instituição destinatária com a assinatura de novo TTM, firmado entre a instituição remetente original e a nova instituição destinatária.
5. A instituição destinatária deverá respeitar os termos deste TTM e não será considerada provedora do material recebido.
6. Qualquer publicação advinda de utilização ou de estudo da amostra remetida deverá reconhecer expressamente a origem do material, e conter créditos à instituição remetente.
7. São de inteira responsabilidade da instituição remetente a identificação e embalagem adequada do material, e a realização dos procedimentos de remessa segundo as regulamentações pertinentes à classificação de risco biológico e de contenção do material a ser transferido, observando-se as recomendações dos órgãos competentes, normas internacionais e legislação específica do país destinatário.
8. A instituição destinatária compromete-se a manter registros de toda a informação associada ao material remetido a partir do momento de seu recebimento, e responsabiliza-se pela veracidade e manutenção adequada da rastreabilidade destas informações.
9. As instituições destinatária e remetente se isentam da responsabilidade em cumprir com os termos de qualquer outro TTM associado ao material transferido que tenha sido acordado e assinado pelo depositante antes de seu depósito no BCRJ.
10. O descumprimento do disposto neste TTM implicará a aplicação das sanções previstas na legislação vigente.
11. O foro competente para a solução de controvérsias entre as instituições envolvidas neste TTM será o da sede da instituição remetente.
12. Os compromissos relativos ao material transferido por meio deste TTM permanecem válidos por tempo indeterminado, independentemente de sua renovação. Por concordarem com todos os termos acima expostos, os representantes da instituição destinatária e da instituição remetente, assinam o presente Termo em três vias de igual teor e forma, para um só efeito legal.



Antonio Martins Monteiro
Representante da Instituição Remetente



Representante da Instituição Destinatária

ENVIO DE CÉLULAS ADERENTES		
	FOR.PR.008.1	REVISÃO 03
		PÁGINA 1/1
DADOS DA CULTURA ENVIADA		
OS: C.4138.17		
Célula: MIN-6	Código BCRJ: 0293	
Lote: 000652	Passagem: 44	Nível de Biossegurança: 2
CONTROLE DE QUALIDADE		
Teste microbiológico: Negativo		
Teste para avaliação da presença de micoplasma: Negativo		
<p>Para maiores informações sobre o cultivo dessas células, consulte a ficha de dados (Data Sheet) em nosso site (www.bcrj.org.br). Essa ficha foi enviada ao seu e-mail quando informamos sobre a entrega das células.</p>		
DADOS DO TRANSPORTE		
Data de saída: 01/08/2017	Validade do transporte: 04/08/2017	Apresentação: garrafa de 25 cm ²
Meio de transporte: RPMI 1640 com Soro Fetal Bovino 5 %		
PROCEDIMENTOS NECESSÁRIOS AO RECEBER A CULTURA		
<p>Ao receber as células, o operador deve fazer uma avaliação da garrafa por visualização a olho nu. Turvação do meio de cultivo pode indicar presença de agentes contaminantes. Se isto ocorrer, entre em contato o mais breve possível com o BCRJ. No microscópio invertido deve-se avaliar as condições da cultura. Se possível, antes de qualquer procedimento recomenda-se que as células sejam colocadas na estufa para repouso por 1 a 2 horas.</p> <p>É possível que algumas linhagens celulares aderentes apresentem a não adesão da monocamada devido aos procedimentos de transporte. Caso isso ocorra, o cliente deve dissociar mecanicamente os grumos celulares, centrifugar e refazer o plaqueamento em outra garrafa que ficará na estufa por 1 – 2 horas e verificar a adesão e posterior proliferação.</p> <p>Após este período, proceder a tripsinização ou troca do meio. No caso de troca do meio, como a tampa encontra-se molhada, recomenda-se a substituição da tampa a fim de evitar contaminações. Não utilizar o meio de envio no cultivo, este meio é somente para o transporte da célula.</p> <p>O BCRJ prepara e mantém uma contraprova da cultura por aproximadamente 15 dias úteis para qualquer eventualidade que venha ocorrer com a cultura enviada. Em caso de perda da cultura, o cliente pode requisitar esta contraprova que será entregue apenas com o custo de frete.</p> <p>No caso de qualquer dúvida, favor entrar em contato com o Banco de Células.</p>		

ANEXO 2. Ficha do aluno gerada pelo sistema administrativo da pós-graduação

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 8035091/1 - Sara Lima Anacleto

Email: sara.lima@usp.br
Data de Nascimento: 12/09/1991
Cédula de Identidade: RG - 36.444.877-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharela em Nutrição - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2017

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 15/05/2017
Início da Contagem de Prazo: 15/05/2017
Data Limite para o Depósito: 18/11/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - 15/05/2017 até o presente. Email: aymoto@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 15/05/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 06/07/2018
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 15/05/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 03/10/2019 21:16:47



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 8035091/1 - Sara Lima Anacleto

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ICB5702-10/3	Bases Moleculares das Funções Celulares (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/08/2017	29/11/2017	225	0	-	-	N	Matrícula cancelada
QFL5727-3/3	Introdução à Espectrometria de Massas (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	17/08/2017	18/10/2017	90	6	90	B	N	Concluída
BMH5778-1/1	Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/09/2017	16/10/2017	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5751-2/2	Minerais em Nutrição: Distribuição Compartimental e Mecanismos de Regulação de sua Homeostase	07/11/2017	27/11/2017	30	0	-	-	N	Turma cancelada
FBA5896-7/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	17/11/2017	25/01/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5870-8/1	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição I	26/02/2018	07/05/2018	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-4/6	Aprimoramento Pedagógico	03/04/2018	30/04/2018	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5756-1/2	Alergia Alimentar	21/05/2018	27/05/2018	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5970-1/1	Nanotecnologia de Alimentos: Fundamentos e Avanços Recentes (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	23/07/2018	29/07/2018	30	2	100	A	N	Concluída
HNT5707-7/3	Métodos para Avaliação do Estado Nutricional de Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	30/07/2018	02/09/2018	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5788-1/3	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	06/08/2018	26/08/2018	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5754-2/1	Atualização em Ciências Farmacêuticas	22/10/2018	28/10/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5753-2/1	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	05/11/2018	11/11/2018	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação de trabalho original intitulado "Estimation of dietary flavonoid intake of the Brazilian population: A comparison between the USDA and Phenol-Explorer Databases Journal of Food Composition and Analysis" publicado no Journal of Food Composition and Analysis em 23 de janeiro de 2019 (https://authors.elsevier.com/c1YV4-3AAyUSbZv). Article reference YJFCA3176 (1)	23/01/2019	23/01/2019	-	2	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 13/03/2019.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 03/10/2019 21:19:43

ANEXO 3. Currículo do Sistema de Currículos Lattes



Sara Lima Anacleto

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2115050440584733>

Última atualização do currículo em 05/10/2019

Resumo informado pelo autor

Mestranda em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. Possui graduação em Nutrição pela Universidade de São Paulo (2016). Possui certificado em Iniciação Científica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP (2013-2014), habilitação em Técnica de Nutrição e Dietética pela ETEC Parque Belém (2011).
(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Sara Lima Anacleto

Dados pessoais

Nascimento 12/09/1991 - São Paulo/SP - Brasil

Formação acadêmica/titulação

- 2017** Mestrado em Ciências dos Alimentos.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
com **período sanduíche** em University of California, Davis (Orientador: Dragan Milenkovic)
Título: Flavanonas de Citrus - mecanismos de proteção de células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo
Orientador: Neuzi Mariko Aymoto Hassimoto 
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2012 - 2016** Graduação em Nutrição.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Estimativa de Ingestão de Flavonoides avaliada a partir de dados da POF e de Preparações Alimentares Oferecidos em uma Unidade de Alimentação e Nutrição
Orientador: Neuzi Mariko Aymoto Hassimoto
- 2010 - 2011** Ensino Profissional de nível técnico .
Etec Parque Belém - Centro Paula Souza, ETEC PQ BELÉM, Brasil

Atuação profissional

1. Instituto da Criança - Hospital das Clínicas da FMUSP - ICR-HC FMUSP

Vínculo institucional

- 2016 - 2016** Vínculo: Estagiária de nutrição , Enquadramento funcional: Estagiária de nutrição na área de Nutrição CI , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Atividades desenvolvidas: avaliação nutricional inicial e sequencial dos bebês internados; participação de reuniões clínicas e de pais com a equipe médica; verificação das prescrições em cada leito; fechamento de indicadores e estatística mensal.
- 2016 - 2016** Vínculo: Estagiária de nutrição , Enquadramento funcional: Estagiária nutrição na área de Saúde Pública , Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Atividades desenvolvidas: orientação e atendimento nutricional para mães de recém-nascidos internados no Centro de Terapia Intensiva 1; orientação para as mães sobre aleitamento materno e ordenha de leite materno no Banco de Leite Humano para estas mães; prescrição de dieta para os bebês recém-nascidos internados; supervisão da administração dos leites feita pela equipe de enfermagem; supervisão dos serviços e execução das Boas Práticas no Banco de Leite Humano; orientação nutricional no momento da alta hospitalar.

2. GR Serviços e Alimentação LTDA - GRSA

Vínculo institucional

- 2016 - 2016** Vínculo: Estagiária de nutrição , Enquadramento funcional: Estagiária na área de Alimentação Coletiva , Carga horária: 30, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividades desenvolvidas: gestão e supervisão dos processos de produção de alimentação e refeição do almoço e jantar nos setores da cozinha; planejamento de cardápio; pedido de compra e controle de estoque; supervisão de procedimentos de sanitização, temperatura de cocção e de exposição dos alimentos servidos no balcão de distribuição.

3. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - FCF-USP

Vínculo institucional

- 2013 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Atividade de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva
 Outras informações:
 Iniciação Científica em Ciências dos Alimentos com Projetos intitulados: "Efeitos do consumo materno e/ou paterno de extrato de amora preta (*Rubus spp.*) nos marcadores antioxidantes da prole feminina submetida à carcinogênese mamária quimicamente induzida"; e "Efeito da radiação ionizante no conteúdo de fenólicos e capacidade antioxidante de espinafre (*Tetragonia expansa*) minimamente processado". Orientadora: Prof. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto. Bolsista pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq)

4. Faculdade de Saúde Pública - USP - FSP-USP

Vínculo institucional

- 2016 - 2016** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitora pelo Programa Aluno Monitor , Carga horária: 12, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividades desenvolvidas na disciplina HNT – 210 Avaliação do Estado Nutricional - Noturno: orientação aos alunos quanto às dúvidas dos assuntos ministrados em aula; elaboração e tabulação das listas de chamadas; tabulação das notas; suporte à distância em atividades de ensino e aprendizagem da disciplina ministrada.
- 2016 - 2016** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitora pelo Programa Aluno Monitor , Carga horária: 12, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividades desenvolvidas na disciplina HSA – 0125 Estrutura Física e Ergonomia para Produção de Refeições - Noturno: orientação aos alunos quanto às dúvidas dos assuntos ministrados em aula; elaboração e tabulação das listas de chamadas; suporte presencial e à distância em atividades de ensino e aprendizagem da disciplina ministrada.
- 2012 - 2012** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitora pelo Programa Aluno Monitor , Carga horária: 12, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividades desenvolvidas na disciplina HNT – 203 Educação Nutricional - Noturno: orientação aos alunos quanto às dúvidas dos assuntos ministrados em aula; elaboração e tabulação das listas de chamadas; suporte presencial e à distância em atividades de ensino e aprendizagem da disciplina ministrada.

5. Casa Civil do Estado de São Paulo - Centro de Convivência Infantil - CCI

Vínculo institucional

- 2010 - 2011** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiária de técnica de nutrição e dietética , Carga horária: 30, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividades desenvolvidas: planejamento de cardápios; realização de encontros de nutrição e Oficinas Culinárias; supervisão das Boas Práticas quanto à higiene e desinfecção do ambiente e dos utensílios; acompanhamento da preparação e distribuição das refeições da cozinha e lactário; controle de temperatura de freezers e geladeiras; auxílio na organização de festas e eventos.

6. Atento Brasil S/A - ATENTO

Vínculo institucional

2010 - 2010 Enquadramento funcional: Teleoperadora , Carga horária: 30, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividades desenvolvidas: atendimento e venda de seguros de acidentes pessoais e cartões adicionais aos clientes do banco Unibanco e Itaú.

7. Etapa Educacional - ETAPA

Vínculo institucional

2012 - 2012 Vínculo: Freelancer , Enquadramento funcional: Fiscal de prova no Curso ETAPA , Carga horária: 12, Regime: Parcial
 Outras informações:
 Atividades desenvolvidas: aplicação e fiscalização de simulados, provas e atividades para alunos do curso ETAPA preparatório para o vestibular.

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.  **ANACLETO, SARA L.; LAJOLO, FRANCO M.; HASSIMOTTO, NEUZA M.A.**
 Estimation of dietary flavonoid intake of the Brazilian population: A comparison between the USDA and Phenol-Explorer databases. JOURNAL OF FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS. [3CB](#), v.78, p.1 - 8, 2019.

Apresentação de trabalho e palestra

1.  **Anacleto, S. L.; Lajolo, F.M.; Hassimoto, N. A.**
 Estimation of dietary flavonoid intake from food preparations offered in a food service and the foodstuffs from national demographic census, 2018. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
2.  **Anacleto, S.L.; Kroon, P.; Needs, P.; Lajolo, F.M.; Hassimoto, N M.A.**
 Flavanone metabolites protect Pancreatic-β cells Min6 line against oxidative stress induced by cholesterol, 2018. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
3.  **Anacleto, S. L.; Lajolo, F.M.; Hassimoto, N. A.**
 Estimation of dietary flavonoid intake from food preparations offered in a food service and the foodstuffs from National Demographic Census, 2017. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
4.  **Anacleto, S. L.; Hassimoto, N. A.**
 Estimativa de ingestão de flavonoides avaliada a partir de dados da POF e de preparações alimentares oferecidos em uma Unidade de Alimentação e Nutrição, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. **Anacleto, S. L.; Hassimoto, N. A.**
 Estimativa de Ingestão de Flavonoides avaliada a partir de dados da POF e de Preparações Oferecidas em uma Unidade de Alimentação e Nutrição, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)
6. **Anacleto, S. L.; Pires, V. C.; Ong, T. P.; Hassimoto, N. A.**
 Efeito do consumo materno e paterno de extrato de amora preta (*Rubus spp.*) nos marcadores antioxidantes da prole feminina, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
7. **Anacleto, S. L.; Lajolo, F.M.; Hassimoto, N. A.**
 Ácido protocatecúico é extensamente metabolizado e atravessa a barreira hematoencefálica em modelo animal, 2013. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
8. **Anacleto, S. L.; LLORCA, C. R.; REZENDE, A. C. B.; LANDGRAF, M.; Hassimoto, N. A.**
 Efeito da radiação ionizante sobre o conteúdo de flavonoides e capacidade antioxidante em espinafre (*Tetragonia expansa*), 2013. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **Anacleto, S. L.;** Milenkovic, D.; Hassimotto, N M.A.
Effect of citrus flavanones in Min6 cells under oxidative stress: Proteomic approach, 2019. (Relatório de pesquisa)
2. **Anacleto, S. L.;** Hassimotto, N M.A.
Flavanonas de Citrus - mecanismos de proteção de células β -pancreáticas submetidas ao estresse oxidativo, 2018. (Relatório de pesquisa)
3. **Anacleto, S. L.;** Pires, V. C.; Ong, T. P.; Hassimotto, N. A.
Efeitos do Consumo Materno e/ou Paterno de Extrato de Amora Preta (Rubus spp.) nos Marcadores Antioxidantes da Prole Feminina Submetida à Carcinogênese Mamária Quimicamente Induzida, 2014. (Relatório de pesquisa)
4. **Anacleto, S. L.;** LLORCA, C. R.; REZENDE, A. C. B.; Hassimotto, N. A.
Efeito da Radiação Ionizante no Conteúdo de Fenólicos e Capacidade Antioxidante de Espinafre (Tetragonia expansa) Minimamente Processado, 2013. (Relatório de pesquisa)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	1
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra)	1
Apresentações de trabalhos (Congresso)	1
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	5
Apresentações de trabalhos (Outra)	1

Produção técnica

Relatório de pesquisa	4
-----------------------	----------

Eventos

Participações em eventos (congresso)	3
Participações em eventos (seminário)	1
Participações em eventos (simpósio)	7
Participações em eventos (encontro)	2
Participações em eventos (outra)	4