

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia (Área Fisiopatologia)

Efeito da ingestão do suco de laranja Moro sobre a migração de leucócitos em mulheres em sobrepeso. Participação da cianidina 3 glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular

Luciene Assaf de Matos

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia (Área Fisiopatologia)

Efeito da ingestão do suco de laranja Moro sobre a migração de leucócitos em mulheres em sobrepeso. Participação da cianidina 3 glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular

Luciene Assaf de Matos

Versão Corrigida

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2023

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

M425e Matos, Luciene Assaf
Efeito da ingestão do suco de laranja Moro sobre a migração de leucócitos em mulheres em sobrepeso. Participação da cianidina 3 glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular / Luciene Assaf Matos. - São Paulo, 2023.
73 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Cianidina. 2. Inflamação. 3. Migração Celular.
4. NFkB. 5. Citocinas. I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

Luciene Assaf de Matos

Efeito da ingestão do suco de laranja Moro sobre a migração de leucócitos em mulheres em sobrepeso. Participação da cianidina 3 glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular

Comissão julgadora da defesa para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
Orientador/ Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. Examinador

4º. examinador

São Paulo, de de 2023.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido e aos meus filhos por todo encorajamento, respeito e compreensão nos meus períodos de ausência. Por vocês cheguei até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me for sustentar até aqui.

Ao Professor Doutor Ricardo Ambrósio Fock por ter sido orientador no sentido literal da palavra e inspiração como ser humano.

Ao Professor Doutor Marcelo Macedo Rogero, do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, pelas contribuições realizadas ao trabalho.

A minha amiga Juliana Gimenez Casagrande que me indicou e tem caminhado comigo todos os dias.

Aos amigos do laboratório de Hematologia Clínica Experimental que souberam dividir tristezas e alegrias ao longo desses anos.

Ao técnico do laboratório de Hematologia Clínica, Edson Naoto Makiyama, por toda paciência e atenção durante meus treinamentos.

Aos meus pais e irmãos cuja contribuição que cabe em palavras escritas.

Ao apoio financeiro da FAPESP (2021/08658-1), sem o qual este trabalho não poderia ter sido executado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Sobrepeso, Obesidade e Inflamação	15
1.2 Inflamação: Citocinas e NFκB	16
1.3 Recrutamento e Migração Celular	19
1.4 Laranja Moro e antocianinas	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 População do estudo	25
3.1.1 Critérios de inclusão.....	26
3.1.2 Critérios de exclusão	26
3.1.3 Caracterização dos participantes.....	27
3.2 Delineamento do estudo	28
3.3 Suco de laranja Moro	28
3.4 Análises bioquímicas e determinação da concentração sérica de biomarcadores inflamatórios.....	29
3.5 Sangue periférico	29
3.5.1 Hemograma	29
3.5.2 Citometria de Fluxo	29
3.6 Separação das células polimorfonucleares e quantificação da expressão de moléculas NFκB, STAT-3, Rho e CDC42.....	30
3.6.1 Western blot.....	30
3.7 Análise <i>in vitro</i>	31
3.7.1 Ensaio de citotoxicidade celular	31
3.7.2 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo.	32
3.7.3 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	32
3.8 Dosagem de citocinas.....	32

3.9. Determinação da expressão das proteínas NFκB (total e fosforilado) NFκB, STAT-3, Rac, Rho, CDC42	33
3.10 Ensaio de migração.....	33
3.11 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Avaliação da Composição do Suco de Laranja	34
4.2 Identificação e quantificação de flavonoides	35
4.3 Dados do estudo.....	35
4.4 Antropometria.....	35
4.4.1 Peso e Índice de massa corporal (IMC)	35
4.4.2 Circunferência da cintura (CC) e relação cintura quadril (RQC)	36
4.5 Avaliação bioquímica	37
4.6 Interleucinas e moléculas de adesão (ICAM e VCAM)	42
4.7 Western blot (WB).....	43
4.8 Citometria de fluxo	43
4.8.1 Imunofenotipagem leucocitária	43
4.9 Análise <i>in vitro</i>	45
4.9.1 Ensaio de proliferação celular	45
4.9.2 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo	47
4.9.3 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	48
4.9.4 Dosagem de citocinas.....	49
4.9.5 Determinação da expressão das proteínas NFκB (total e fosforilado) NFκB, STAT-3, Rac, Rho, CDC42	50
4.9.6 Efeito da cianidina 3 glicosídeo sobre a migração de células C1498	53
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS.....	70

RESUMO

MATOS, L. A. Efeito da ingestão do suco de laranja Moro sobre a migração de leucócitos em mulheres em sobrepeso. Participação da cianidina 3 glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular. 2023. 73f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O aumento da adiposidade corpórea pode gerar diversos mediadores inflamatórios com capacidade de influenciar a proliferação e a diferenciação hematopoética e, conseqüentemente, a complexa regulação que envolve os processos de migração celular. O recrutamento contínuo de leucócitos durante vários estágios do processo inflamatório apresenta importante papel na gênese desse processo. Na literatura, vários estudos demonstraram a capacidade anti-inflamatória das antocianinas sobre vários órgãos; contudo poucos estudos avaliam a influência das antocianinas sobre a migração celular. As antocianinas são substâncias responsáveis pelas cores azul, violeta e vermelha da maioria das frutas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do suco de laranja Moro sobre aspectos da inflamação e migração celular em mulheres com sobrepeso e a participação da cianidina 3 glicosídeo (C3G), principal antocianina presente nesta laranja, na modulação de mecanismos de migração celular. Para tanto, esse estudo foi dividido em duas etapas: *(i)* uma realizada em pacientes com sobrepeso que consumiram 500ml de suco de laranja Moro durante 28 dias, sendo os dados avaliados no primeiro dia, no 14º dia e no 28º dia; *(ii)* uma segunda etapa, *in vitro*, onde foi avaliado o efeito da C3G sobre mecanismos envolvidos na inflamação e na modulação dos processos de migração. Na etapa inicial foram avaliados parâmetros antropométricos, bioquímicos, hematológicos bem como a expressão de moléculas de adesão de células polimorfonucleares do sangue periférico, a quantificação de citocinas inflamatórias, alguns fatores de transcrição envolvidos nos processos de inflamação e proteínas envolvidas na migração celular. Na segunda etapa, células C1498 foram tratadas com 50 µM de C3G e estimuladas ou não com LPS. Foram avaliados parâmetros de inflamação como interleucinas, TNF- α e CCL2, expressão de fatores de transcrição e proteínas envolvidas na migração celular. Posteriormente, células também tratadas com 50 µM de C3G, foram estimuladas com LPS e fMLP e avaliada a migração quantitativamente. Os resultados *in vivo*, não demonstraram alterações nos parâmetros avaliados. Já *in vitro*, a C3G foi capaz de modular a inflamação após estímulo com LPS e de modular a migração após estímulo com fMLP. Estes achados podem descrever alguns dos mecanismos pelos quais as antocianinas são consideradas anti-inflamatórias, sugerindo novas abordagens que possam ser promissoras em seu uso como um potencial agente terapêutico.

Palavras-chaves: Cianidina, NFkB, Inflamação, Citocinas, Migração

ABSTRACT

MATOS, L. A. The effect of Moro orange juice on leukocyte migration in overweight women. Participation of cyanidin 3 glycoside as a potential modulator of the inflammatory profile and cell migration. 2023. 73f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The increase in body adiposity can create several inflammatory mediators with the ability to influence hematopoietic proliferation and differentiation and, consequently, the complex regulation that involves cell migration processes. The continuous recruitment of leukocytes during various stages of the inflammatory process plays an important role in the beginning of this process. In the literature, several studies have demonstrated the anti-inflammatory capacity of anthocyanins on various organs; however, few studies have analyzed the influence of anthocyanins on cell migration. Anthocyanins are the substances responsible for the blue, violet and red colors of most fruits. The goal of this study was to analyze the effect of Moro orange juice on aspects of inflammation and cell migration in overweight women and the participation of cyanidine 3 glycoside (C3G), the main anthocyanin present in it, in the modulation of cell migration mechanisms. Therefore, this study was divided into two stages: *(i)* one performed in overweight patients who consumed 500ml of Moro orange juice for 28 days, and the data was evaluated on the first day, on the 14th day, and on the 28th day; *(ii)* the second, *in vitro*, where the C3G effect on mechanisms involved in inflammation and modulation of migration processes was analyzed. In the initial stage, anthropometric, biochemical, hematological parameters were analyzed, as well as the expression of adhesion molecules of polymorphonuclear cells of peripheral blood, the quantification of inflammatory cytokines, some transcription factors involved in inflammation processes and proteins involved in cell migration. In the second stage, C1498 cells were treated with 50 μ M of C3G and stimulated or not with LPS. Inflammation parameters such as interleukins, TNF- α and CCL2, expression of transcription factors and proteins involved in cell migration were analyzed. Subsequently, cells also treated with 50 μ M of C3G were stimulated with LPS and fMLP and the migration was analyzed quantitatively. The *in vivo* results demonstrated no changes in the parameters analyzed. On the other hand, *in vitro*, C3G was able to modify the inflammation after stimulation with LPS and to modify the migration after stimulation with fMLP. These findings may demonstrate some of the mechanisms by which anthocyanins are considered anti-inflammatory, suggesting new approaches that may be promising in their use as a potential therapeutic agent.

Keywords: Cyanidin, NFkB, Inflammation, Cytokines, Migration

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina aminotransferase
AST: Aspartato aminotransferase
C3G: Cianidina 3 glicosídeo
CAT: Catalase
CC: Circunferência da cintura
DASH: Dietary approaches to stop hypertension
DCNT: Doença crônica não transmissível
EPIC: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
FA: Ácido felúrico
GamaGT: Gama glutamiltransferase
GPx: Glutathione peroxidase
HDL: Lipoproteína de alta densidade
IFN γ - Interferon γ
IL10: Interleucina 10
IL12: Interleucina 12
IL1 β : Interleucina 1 β
IL6: Interleucina 6
IL8: Interleucina 8
IMC: Índice de massa corporal
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LPS: Lipopolissacarídeo
NF κ B : Fator de transcrição nuclear kappa B
OMS: Organização mundial da saúde
PCR: Proteína C reativa
RCQ: Relação cintura quadril
ROS: Espécie reativa de oxigênio
SOD: superóxido dismutase
TG: Triglicérides
TLR: Receptor toll-like
TNF α : Fator de necrose tumoral alfa
VA: Ácido vanílico
VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação de um intestino com permeabilidade normal e um intestino com permeabilidade aumentada.

Figura 2 – Etapas do processo de rolagem, adesão e migração leucocitária.

Figura 3 – Estrutura química de antocianinas e alimentos que as representam.

Figura 4 – Delineamento do estudo.

Figura 5 – Resultados dos parâmetros antropométricos.

Figura 6 – Resultados dos níveis de colesterol total, lipoproteína de alta densidade – HDL; lipoproteína de baixa densidade – LDL; e triglicérides – TG.

Figura 7 – Resultados dos parâmetros de função hepática – Amilase, Alanina aminotransferase – ALT, Aspartato aminotransferase – AST e Gama glutamiltransferase.

Figura 8 – Resultados dos níveis de glicemia, progesterona e marcadores de formação de fibrina: D-dímero e fibrinogênio.

Figura 9 – Resultados dos parâmetros de função renal: ureia e creatinina.

Figura 10 – Resultados dos níveis de eletrólitos: Cálcio, Magnésio, Sódio, Potássio e Cloro; e Proteína C reativa.

Figura 11 – Resultados das interleucinas: IL-6, IL-10 e TNF-alfa.

Figura 12 – Resultados dos valores séricos das moléculas de adesão ICAM (12A) e VCAM

Figura 13 – Resultados do Western Blot da relação da expressão total e fosforilada de NF- κ B e STAT 3. E expressão das proteínas CDC42 e Rho. Foto representativa das análises das membranas de Western Blot.

Figura 14 – Valores referentes à marcação fenotípica: CD4⁺ e CD8⁺; CD11b e CD18.

Figura 15 – Resultados referentes a média \pm desvio padrão da porcentagem da marcação fenotípica CD4⁺, CD8⁺, razão CD4⁺/CD8⁺ e MFI de CD4⁺ e CD8⁺.

Figura 16 - Resultados referentes a média \pm desvio padrão da MFI de CD14, CD11 e CD18.

Figura 17 – Avaliação da citotoxicidade celular para definição da dose de cianidina 3 glicosídeo.

Figura 18 - Representação dos grupos analisados referente a análise da viabilidade e apoptose celular.

Figura 19 - Representação dos histogramas dos grupos analisados, referente ao ciclo celular.

Figura 20 - Quantificação de citocinas IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10, CCL2 e IL-1 β nas células C1498 tratadas com e sem 50 μ M de cianidina e estimuladas ou não com LPS.

Figura 21 – Quantificação da expressão de NF- κ B e STAT-3 nas células C1498 tratadas com e sem 50 μ M de cianidina e estimuladas ou não com LPS.

Figura 22 – Quantificação da expressão de Rac-1, CDC42 e RhoA nas células C1498 tratadas com e sem 50 μ M de cianidina e estimuladas ou não com LPS.

Figura 23 - Efeitos da cianidina 3 glicosídeo sobre a capacidade de migração de células C1498 e estimuladas ou não com LPS ou fMLP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade, fenólicos totais, ácidos orgânicos e fibra alimentar de sucos de laranja pasteurizados, cv. Pera e Moro.

Tabela 2 - Conteúdo de flavonoides no suco de laranjas cv. Pera e cv. Moro.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sobrepeso, Obesidade e Inflamação

Segundo a OMS a obesidade vem aumentando em todos os países, tendo quase triplicado entre 1975 e 2016, afetando mais o continente americano com 29% da população acima do peso (WHO, 2018). No Brasil, segundo a VIGITEL 2021, a obesidade atinge 22,4% da população e o sobrepeso 57,2% (BRASIL, 2022).

Classifica-se como obesidade os indivíduos cujo IMC (índice de massa corpórea) é maior ou igual a 30 kg/m² e sobrepeso quando o IMC está entre 25 e 29,9 kg/m² (WHO, 1995)

A etiologia da obesidade é multifatorial e descrevem-se interações entre fatores genéticos, epigenéticos, microbiota, ambientais e psicossociais (PIGEYRE et al, 2016) (BELTRÁN-CARRILLO et al, 2022). Entre os fatores alimentares destacam-se o excesso de energia e dieta rica em gordura, principalmente animal, açúcares e alimentos refinados, conhecida como dieta ocidental, que favorece o aumento da adiposidade (FRANCISCHI et al, 2000).

Pesquisas populacionais mostram forte associação entre a dieta ocidental e a prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (CLARO et al, 2015; BILLINGSLEY et al, 2018).

A quantidade e a qualidade de macronutrientes presentes na refeição são determinantes na resposta pós-prandial. O consumo de alimentos com alta concentração de gordura e de carboidratos pode acarretar alterações metabólicas, como dislipidemia e hiperglicemia, sobretudo no período pós-absortivo (O'KEEFE *et al.*, 2008). O aumento dos lipídios plasmáticos e da glicemia provocam estresse oxidativo e aumento de mediadores inflamatórios, condições que favorecem o desenvolvimento da resistência à ação da insulina e da diminuição da função endotelial (O'KEEFE *et al.*, 2008).

A relação entre o aumento do consumo de lipídios e as DCNT tem sido atribuída aos seus efeitos biológicos sobre o sistema imune e, mais recentemente, à sua relação com a endotoxemia, um estado inflamatório subclínico que favorece o desenvolvimento de

resistência à insulina e doenças associadas. O tipo de lipídio consumido também influencia a presença ou não desta inflamação (MORENO, 2018).

O acúmulo excessivo de gordura corporal leva ao desenvolvimento de um quadro de inflamação de baixa intensidade e crônica que, de acordo com Gregor e Hotamisligil et al. (2006) é conhecida como inflamação metabólica ou metainflamação, que tem sua origem no sedentarismo, baixa qualidade da dieta e estilo de vida. Com o ganho de peso corpóreo, o aumento do volume dos adipócitos, ocasionam uma condição de hipóxia, com estresse do retículo endoplasmático e lipotoxicidade (GE et al., 2014). A mediação desta resposta inflamatória no tecido adiposo é feita, principalmente, por macrófagos que passam do perfil M2, denominado anti-inflamatório, para o perfil M1, denominado pró-inflamatório. Os macrófagos M1 produzem mediadores inflamatórios como a quimiocina, MCP-1 e as moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1, que atuam diretamente no processo de migração celular, assim estimulado a migração de outras células imunes para o tecido inflamado, enquanto as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, denominadas pró-inflamatórias atuam contribuindo para a progressão da inflamação (UNAMUNO et al., 2018).

1.2 Inflamação: Citocinas e NF κ B

A inflamação é um processo fisiológico de proteção do organismo contra danos de origem química, física ou biológico. A resposta imune é um complexo sistema que envolve a participação de leucócitos (linfócitos, monócitos e neutrófilos), células que se encontram circulantes no sangue periférico. Essas células produzem uma série de mediadores como citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides entre outras, culminando na efetivação da resposta imune. A ativação de moléculas do endotélio permite a migração de neutrófilos e extravasamento de substância solúveis para os tecidos onde essas células se tornarão ativadas e executarão as suas funções para a eliminação de possíveis agentes infecciosos (MONTEIRO; AZEVEDO, 2010).

A inflamação envolve o aumento da concentração plasmática de diversos biomarcadores, como quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, proteínas de fase aguda positiva e moléculas de adesão (CALDER *et al.*, 2011). O aumento de proteínas quimiotáticas aumenta o recrutamento de leucócitos do sangue periférico para o tecido alvo, como, por exemplo, o tecido adiposo branco, exacerbando a síntese e a secreção de

citocinas pró-inflamatórias (ZEYDA e STULNIG, 2009). Dentre as citocinas com ação pró- inflamatória, destacam-se: o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12. Por outro lado, a IL-10 e a adiponectina, que apresentam papel anti-inflamatório, encontram-se reduzidas na inflamação (GREENBERG e OBIN, 2006).

A ingestão elevada de lipídios, também pode favorecer a resistência periférica à ação da insulina, pois ele se liga a receptores do tipo Toll 4 (TLR4) ativando a via JNK e IKK, que fosforilam resíduos de serina no IRS1 (receptor de insulina-1), levando-o a ubiquitinação, resultando na diminuição da ação da insulina. Além disso, aumenta a transcrição do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B) e proteína ativadora-1 (AP-1), com conseqüente aumento da expressão de genes pró-inflamatórios (MAJOLO e REIS, 2018).

O excesso de peso pode provocar um quadro de desequilíbrio na microbiota intestinal, com proporção de bactérias Gram-negativas do que Gram-positivas, além de uma maior concentração plasmática de lipopolissacarídeo (LPS) quando comparado à microbiota de indivíduos com peso adequado (NEVES et al., 2013). Essa maior concentração plasmática de LPS quando associada ao padrão alimentar é denominada endotoxemia metabólica (CANI et al., 2007) (MOREIRA *et al.*, 2012).

O LPS é um componente estrutural integral e predominante da membrana externa de bactérias Gram-negativas, que tem a capacidade de se ligar aos receptores TLR2 e TLR4, juntamente com as proteínas CD14 e a proteína ligante do LPS (LBP). Essa ligação induz a ativação da via de sinalização do fator de transcrição NF κ B e das proteínas kinases ativadas por mitógenos (MAPK), aumentando a resposta inflamatória (MOREIRA *et al.*, 2012). O LPS também estimula a produção de citocina inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α após a ativação de monócitos e macrófagos (DOBROVOLSKAIA e VOGEL, 2002). Dieta rica em lipídios e pobre em fibras alimentares está relacionada com a alteração da microbiota intestinal e com maior permeabilidade intestinal ao LPS. Provocando aumento da concentração plasmática de LPS (MOREIRA *et al.*, 2012), conforme demonstra a figura 1.

O consumo de refeições ricas em gordura, leva a um aumento da concentração plasmática de LPS, em pouco tempo, como demonstraram estudos de intervenção. Um dos mecanismos propostos para esclarecer esse fato é o aumento da permeabilidade intestinal ocasionada por este tipo de refeição (MOREIRA et al., 2012; QUINTANILHA et al., 2018).

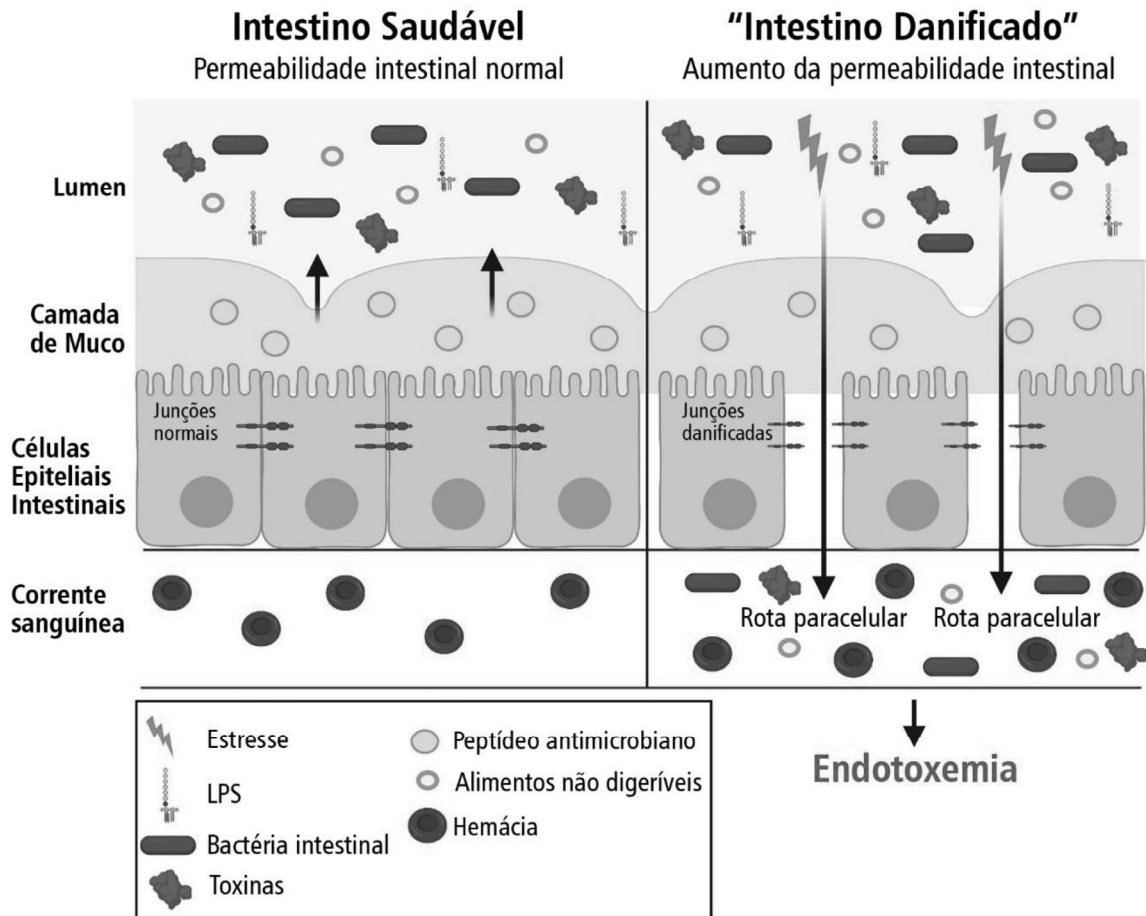


Figura 1 - Comparação de um intestino com permeabilidade normal e um intestino com permeabilidade aumentada. Fonte: MOHAMMAD E THIEMERMANN, 2021.

Não somente o LPS ativa receptores do tipo TLR4, como os ácidos graxo saturados – que fazem parte da dieta ocidental – com consequente aumento da atividade do NFκB (LEE *et al.*, 2001). Sucintamente, a transdução de sinal ocorre a partir de um estímulo extracelular ao TLR-4. Esse fato acarreta no recrutamento de proteínas intracelulares adaptadoras, como a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), provocando a ativação da via de sinalização do NFκB, levando a fosforilação de proteínas quinases, como a quinase ativada pelo fator de transformação de crescimento β (TAK)-1 e o complexo IκB quinases (IKK). Esse complexo é composto de duas subunidades catalíticas IKK-α e IKK-β e uma subunidade regulatória IKKγ e induz a fosforilação do

inibidor do NF κ B, designado I κ B- α . Quando I κ B- α é fosforilado, resulta na sua poliubiquitinação, com conseqüente degradação mediada pelo proteossoma 26S, permitindo que o NF κ B transloque para o núcleo da célula e possibilite a transcrição de diversos genes dependentes do κ B, como das citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (KARALIS *et al.*, 2009; THIEMERMANN E MOHAMMAD, 2021).

Citocinas pró-inflamatórias também podem ativar vias de sinalização inflamatória. Um exemplo disso, é quando o TNF- α estimula o seu receptor (TNFR) promovendo a ativação das proteínas da família das MAPK, (ERK, p38 e a JNK), que ativam o fator de transcrição designado proteína ativadora (AP)-1 (SUGANAMI e OGAWA, 2010). Algumas quinases ainda podem inibir a via de sinalização da insulina, desencadeando a resistência a ação da insulina, uma vez que a ativação das quinases designadas IKK- β e da JNK promovem a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS)-1 e 2 em resíduos de serina, comprometendo a sinalização e reduzindo a captação celular de glicose (SCHENK *et al.*, 2008).

Um estudo epidemiológico mostrou associação positiva entre o consumo de alimentos processados ricos em ácidos graxos trans e as concentrações de biomarcadores plasmáticos ligados à inflamação, incluindo a IL-6 e a proteína C reativa (PCR) (LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2005). A PCR é uma proteína de fase aguda positiva sintetizada, principalmente, pelo fígado em resposta à elevada concentração de IL-6 circulante, sendo o seu aumento um sinal precoce para o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2 e de doenças cardiovasculares (GALLAND, 2010). Outro importante marcador inflamatório de fase aguda é a proteína sérica amilóide A (SAA), que tem sua expressão induzida por estímulos pró-inflamatórios como a IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α (ZHAO *et al.*, 2010). A SAA também possui a capacidade de ligação e ativação dos receptores do tipo Toll (TLR) -2 e 4, os quais estão envolvidos com a ativação de determinadas proteínas quinases, como a quinase do inibidor do κ B (IKK)- β e c-Jun N-terminal quinase (JNK), as quais estão envolvidas com a translocação dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1, respectivamente. A ativação desses fatores de transcrição promove o aumento da expressão de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória (EKLUND *et al.*, 2012).

1.3 Recrutamento e Migração Celular

A ativação do NF- κ B promove a liberação de inúmeros mediadores, como citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda, mediadores gasosos, espécies reativas de oxigênio, mediadores inflamatórios lipídicos, entre outros (LEE et al, 2014). Isso acarreta em alterações importantes no recrutamento e migração de leucócitos, aumentando a interações vaso-leucócito, adicionalmente o fluxo circulatório perde o ritmo permitindo que os leucócitos se movam para a periferia e assim, interajam com o endotélio vascular, evento conhecido como marginalização (TAN et al, 2017). Assim, além da marginalização dos leucócitos os mediadores inflamatórios atuam induzindo a expressão moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos, e assim facilitando o recrutamento para o foco inflamatório (KUBES, 2002; SCHURMANN, et al 1995; KUBES et al, 2002).

A locomoção e a transmigração dos leucócitos resultam de uma reorganização coordenada do citoesqueleto e de ciclos de adesão e não adesão, chamado de turnover de adesão, em resposta a quimiocinas e moléculas de adesão (FILIPPI, 2016). Na circulação sistêmica, o processo de migração se inicia quando moléculas de adesão da família das selectinas promovem uma adesão transitória entre os leucócitos e o endotélio das vênulas pós capilares. A L-selectina (CD62L) é expressa constitutivamente na maioria dos leucócitos e possuem capacidade de mediar a adesão precoce ao endotélio em eventos inflamatórios (WAGNER et al., 2000). A P-selectina (CD62P) aparece na superfície de células endoteliais e plaquetas após exposição a mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β , mediando as interações entre endotélio, plaquetas e leucócitos. Algumas horas depois também surge na superfície das células endoteliais a E-selectina (CD62E), também induzidas pelo TNF- α e IL-1 β . Essas selectinas, CD62P e CD62E, interagem com certas glicoproteínas como as moléculas PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) e ESL-1 (*E-selectin ligand-1*), presentes na membrana de leucócitos (LEY et al., 1998; LEY 2003). Essa adesão temporária mediada pelas selectinas possibilita que os leucócitos rolem através da superfície endotelial, abrindo caminho para ações mais fortes, que compreende a adesão firme entre leucócitos e endotélio, esta, mediada pelas integrinas (KUBES, 2002; SCHURMANN, et al 1995; KUBES et al, 2002).

As integrinas (CD11/CD18) presentes nos leucócitos interagem com as moléculas VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) e ICAM- 1 e 2 (*intercellular adhesion molecule*), do endotélio. Normalmente, estas não têm uma capacidade de alta adesão, no entanto, sofrem uma mudança conformacional quando a interleucina IL-8 e outras

quimiocinas, como MIP-2 (*macrophage-inflammatory protein 2*) e KC (*keratinocyte-derived chemokine*), estão ligadas a proteoglicanos na superfície das células endoteliais, aumentando sua capacidade de aderir. Conseqüentemente, o rolamento é interrompido e os leucócitos aderem firmemente ao endotélio vascular e com auxílio de enzimas proteolíticas degradam a membrana basal, ultrapassando a barreira endotelial (HUTTENLOCHER et al., 1995; KUBES, 2002; WAGNER et al., 2000). A fase seguinte à firme adesão é a diapedese, onde os leucócitos ultrapassam a parede endotelial (Figura 2).

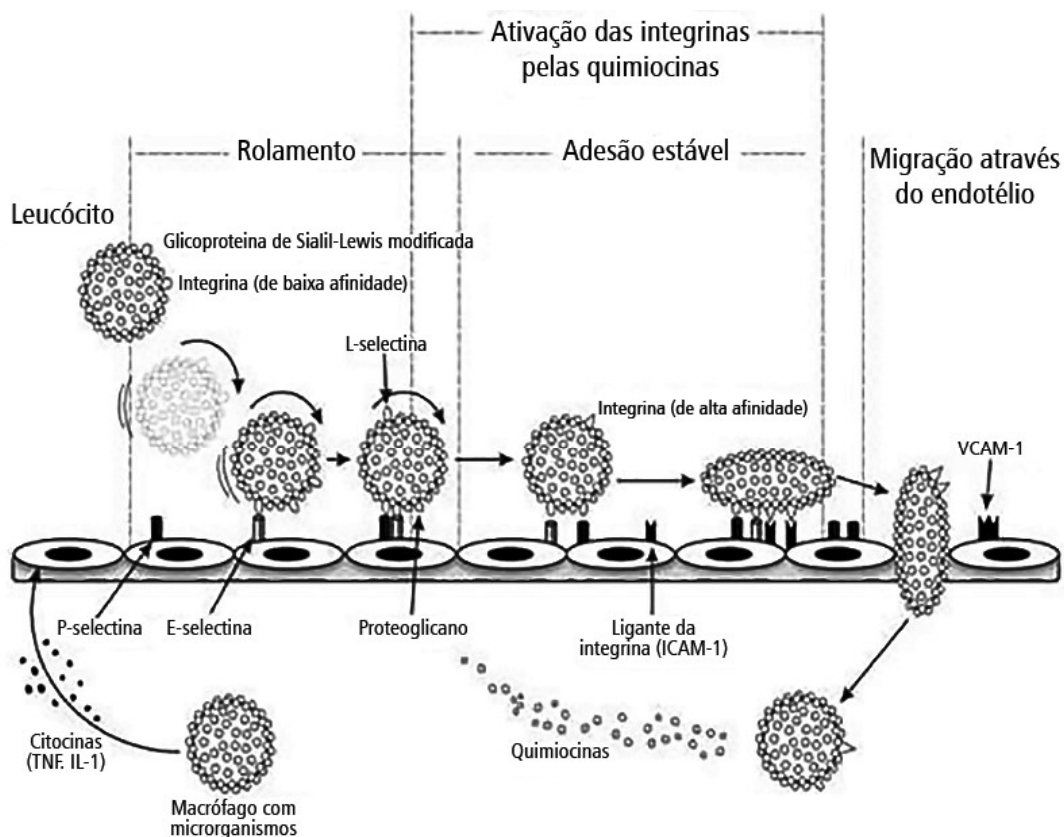


Figura 2 - Etapas do processo de rolagem, adesão e migração leucocitária. Fonte: FRANCISCHETTI et al 2010.

A diapedese leucocitária é afetada por fatores quimiotáticos que favorecem a apresentação de pseudópodes e o movimento leucocitário (FRANCISCHETTI I et al, 2010). O processo de migração é complexo e dependente da reorganização dos componentes internos da célula, modificando sua estrutura, permitindo o movimento. As proteínas da família RhoGTPases são centrais nesse processo, pois organizam o citoesqueleto e promovem a contração dos filamentos de actina que possibilita a retração do corpo celular durante a migração. Rho regula a organização de filamentos contráteis de

actina:miosina, enquanto a Rac e Cdc42 regulam a polimerização da actina, direcionando o caminho (RAFTOPOULOU e HALL, 2004; FILIPPI, 2016).

Além desta função bem descrita na literatura em regular a migração celular, as proteínas Rho podem ativar a via JNK em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, alterando a permeabilidade endotelial (MONG et al, 2008). Além disso, as ligações moleculares entre as proteínas da família RhoGTPases e a via NF- κ B, vem sendo descritas como pontos chaves em alguns desfechos clínicos, como artrite reumatóide, carcinoma de mama, doença de Chron, infecções na pele (celulite), linfoma de células B e doenças metabólicas como hiperlipidemia (TONG e TERGAONKAR, 2014)

1.4 Laranja Moro e antocianinas

A associação entre o padrão de dieta ocidental e sua relação com o desenvolvimento do processo inflamatório e conseqüentemente com o surgimento de DCNT (O'KEEFE *et al.*, 2008), são bem descritos na literatura e a maioria dos guias alimentares enfatizam um padrão alimentar saudável com o consumo diário de oleaginosas, peixes, óleos vegetais, grãos integrais, frutas e hortaliças como sendo essencial para diminuir o risco de DCNT (KIMOKOTI; MILLEN, *et al.*, 2016; SLAVIN; LLOYD *et al.*, 2012).

Frutas e vegetais fornecem micronutrientes, minerais, fibras e vitaminas, mas também compostos fitoquímicos, entre os quais metabólitos secundários de natureza fenólica, como as antocianinas, que se destacam pela atividade antioxidante. As mais de 600 antocianinas conhecidas, são distribuídas em inúmeras espécies de alimentos e são responsáveis pela coloração vermelha, azul e púrpura (MARTIN et al, 2017).

Os estudos estimam que a população consuma cerca de 200mg/dia de antocianinas, mas não existe uma recomendação específica. Seu potencial antioxidante é regulado por sua estrutura química: variação da posição, tipos de grupos hidroxilas e presença de elétrons doadores no anel estrutural (Figura 3). Estudos que avaliaram a capacidade antioxidante das antocianinas demonstraram uma atividade 2 a 3 vezes maior que outros antioxidantes, como a catequina, a vitamina E e antioxidantes sintéticos (MARTIN et al, 2017; STRINGHETA et al, 2010). Seus efeitos podem ser por potencializar os mecanismos antioxidantes endógenos, reagir com o óxido nítrico, inibir a peroxidação lipídica, formar complexos cianidina-DNA, reduzir a agregação plaquetária e a imobilização dos leucócitos na parede do endotélio (STRINGHETA et al, 2010, NIJVELDT et al, 2001).

As antocianinas têm sido associadas, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, à melhora do perfil lipídico com diminuição do LDL, do colesterol total e dos triglicérides, bem como aumento do HDL (QIN et al 2009; CARDOSO et al, 2011; WALLACE et al, 2016).

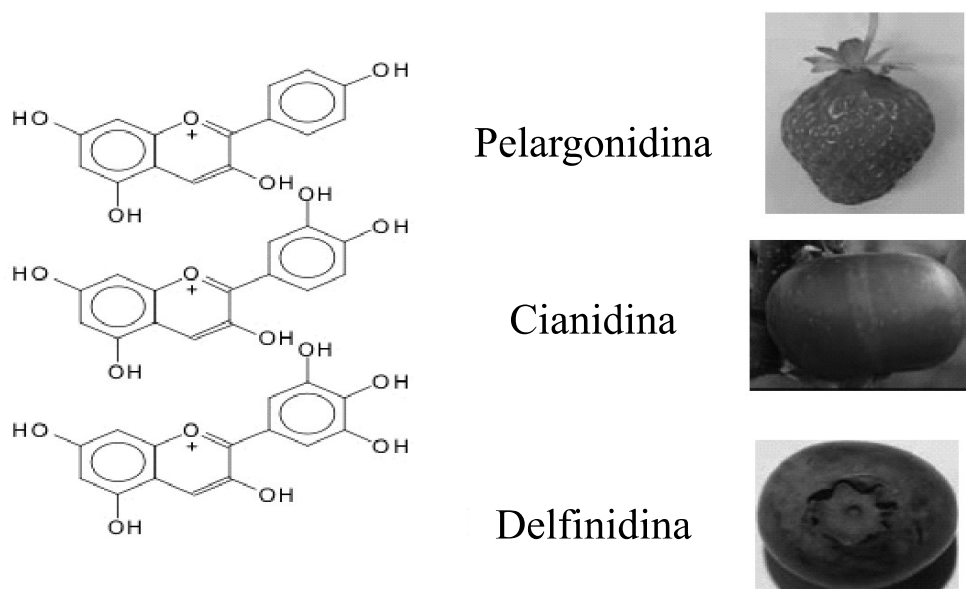


Figura 3 - Estrutura química de antocianinas e alimentos que as representam. Fonte: Adaptada MARTIN, et al 2017.

O Brasil é um grande produtor e consumidor de laranja (BRASIL, 2016), que contém altas concentrações de flavonoides como hesperidina e naringina, que tanto *in vitro* como *in vivo*, apresentaram uma potencial ação antioxidante e anti-inflamatória (TRIPOLI *et al.*, 2007), quando presentes regularmente na dieta podem exercer efeitos positivos no controle de diversas DCNT (MARTIN; APPEL *et al.*, 2010).

O estudo com a laranja Moro ou laranja sanguínea, uma espécie típica da região da Sicília, na Itália, tem se tornado relevante devido a presença de antocianinas não comumente encontrada em frutas cítricas que demonstrou um importante papel antioxidante, com efeito anticarcinogênese, anti-inflamatório e de proteção cardiovascular (GROSSO et al, 2013).

No estudo de intervenção de Riso et al (2005), 16 mulheres voluntárias, saudáveis receberam 600ml/ dia de suco de laranja sanguínea ou uma dieta sem suco, por 21 dias. O consumo do suco determinou um aumento significativo na vitamina C plasmática, na

cianidina-3-glicosídeo, na β -criptoxantina e zeaxantina, além de melhorar a resistência a danos do estresse oxidativo (RISO et al., 2005).

Li et al (2020) em um estudo randomizado controlado onde os participantes, 5 homens e 10 mulheres com IMC acima de 25kg/m², consumiram 400ml de suco de laranja sanguínea, sendo 200ml após café da manhã e 200ml após o jantar ou bebida controle, por um período de 2 semanas, com intervalo de 1 semana entre elas, induziu uma melhora da função endotelial cujos mecanismos moleculares não foram elucidados (LI et al, 2020). A perda da função endotelial é caracterizada por mudanças nas suas atividades, com a vasodilatação reduzida, o qual é um estado pró-inflamatório, com propriedades pró-trombicas, estando relacionada à maioria das doenças cardiovasculares como hipertensão, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca crônica, doença arterial periférica, diabetes e doença renal crônica (GOMES et al., 2022). Vários estudos demonstraram que a cianidina 3 glicosídeo (C3G) é a principal antocianina presente na laranja Moro e suas propriedades antioxidantes vem sendo demonstradas *in vivo*, sendo dose e tempo dependente (GROSSO et al, 2013).

No organismo a C3G pode ser hidrolisada por enzimas no intestino delgado e posteriormente degradada a compostos fenólicos pela microbiota intestinal. O catabolismo microbiano da C3G no intestino delgado distal e no intestino grosso é realizado pela clivagem do anel C, seguido da desidroxilação ou descarboxilação para formar metabólitos em vários estágios que entram no fígado e nos rins pela circulação. PCA (ácido protocateuico) e PGA (floroglucinaldeído) são os principais metabólitos fenólicos ativos de C3G. PCA foi descrito por inibir a ação da IL-6, TNF- α , IL-1 e prostaglandina E2 suprimindo a ação de NF κ -B em camundongos. Da mesma forma, PGA se mostrou como inibidor da ação inflamatória, modulando IL-6, IL-1 e IL-10 em hemocultura humana. PCA também pode atenuar a peroxidação lipídica por causar aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) (TAN et al., 2019; RAHMAN et al., 2021).

Metabólitos de fase II de C3G derivam de PGA e PCA, como o VA (ácido vanílico) e FA (ácido felúrico). VA pode suprimir geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a peroxidação lipídica, aumentando a ação da SOD, CAT e GPx, bem como o nível antioxidante da vitamina E, vitamina C e glutatona (GSH) em camundongos, hamsters e diabéticos, além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias. FA também foi

descrito como atenuador do estresse oxidativo e da inflamação em estudos *in vitro* e inibidor da expressão de ICAM-1, VCAM-1, IL-18, IL-1, IL-6 e TNF- α (TAN et al., 2019; RAHMAN et al., 2021).

Em relação à interação da C3G com a microbiota, sabe-se que as bifidobactérias transformam as antocianinas em PCA e também são capazes de formar o FA, assim como os lactobacilos. Por outro lado, as antocianinas são capazes de modular o crescimento da microbiota intestinal, promovendo abundância relativa de bactérias benéficas com ação anti-inflamatória (TAN et al., 2019; RAHMAN et al., 2021).

Diante desse cenário, a identificação de alimentos com potencial para atenuar o desenvolvimento do processo inflamatório é de grande interesse e aplicabilidade em estudos de nutrição em saúde pública. Apesar de estudos em indivíduos mostrarem efeito antioxidante, hipolipidêmico e anti-inflamatório após consumo crônico do suco de laranja (GROSSO *et al.*, 2013), nenhum estudo avaliou o efeito da ingestão crônica do suco de laranja Moro sobre os mecanismos de migração celular envolvidos na resposta inflamatória, sendo que o estudo da expressão de marcadores da migração celular envolvidos com o controle do processo inflamatório sob o efeito da alimentação ainda é pouco explorado.

2. OBJETIVOS

Investigar o efeito da ingestão de suco de laranja Moro sobre aspectos da inflamação e migração celular em mulheres com sobrepeso e a participação da cianidina 3 glicosídeo na modulação de mecanismos da migração celular *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

ETAPA I:

3.1 População do estudo

O estudo desenvolvido nas voluntárias é do tipo intervencional. A população do presente estudo foi composta por mulheres (n=24) que se encaixaram nos critérios de inclusão, tendo idade entre 18 e 40 anos, cujo índice de massa corporal (IMC) estava entre

25,0 e 29,9 kg/m², sendo assim, classificada como sobrepeso, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995). Esse trabalho é uma colaboração entre a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, tendo como colaborador o Prof. Marcelo Macedo Rogero. As participantes foram recrutadas por meio de cartazes distribuídos pelo campus e por meio de anúncios no seu jornal eletrônico (www.jornal.usp.br). A coleta de sangue foi realizada no Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula Souza (CSEGPS), o qual está localizado ao lado da Faculdade de Saúde Pública, na Avenida Dr. Arnaldo, 900.

Os indivíduos interessados foram convocados para uma entrevista, na qual responderam a um questionário contendo os critérios de inclusão e tiveram suas medidas antropométricas aferidas. Atendido a todos os critérios de inclusão, os interessados receberam instruções a respeito do delineamento do estudo, tendo esclarecido todo tipo de dúvida. Foi entregue duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**ANEXO 1**) que foram assinadas pelo candidato e pelo responsável da pesquisa, sendo uma delas pertencente ao participante. No final da entrevista, foram agendadas três datas para coleta de sangue, com intervalo de 2 semanas entre as mesmas, ou seja, cada participante é seu próprio controle. Além disso, as voluntárias foram orientadas a não praticarem nenhum tipo de exercício físico no período de 48 horas antecedentes às coletas e a não consumirem nenhum tipo de bebida alcoólica 1 semana antes.

3.1.1 Critérios de inclusão

- Sexo feminino.
- Idade entre 18 e 40 anos.
- Índice de massa corporal (IMC) entre 25,0 e 29,9 kg/m².
- Estar disposto a aderir ao protocolo de estudo.
- Estar disposto a fornecer por escrito um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.1.2 Critérios de exclusão

- Sexo masculino;
- Idade inferior a 18 anos e superior a 40 anos;
- Índice de Massa Corporal (IMC) < 25,0 kg/m² ou > 29,9 kg/m²;
- Ser atleta;
- Diagnóstico de diabetes melito;
- Fazer uso de medicação prescrita para controlar inflamação;

- Fazer uso de medicação prescrita para perfil lipídico plasmático (por exemplo, estatinas, fibratos (fenofibrato) e Omacor);
- Fazer uso de medicação prescrita controlar a pressão arterial sistêmica (inibidores da ECA, bloqueadores do receptor de angiotensina 2, bloqueadores do canal de cálcio, α -inibidores e diuréticos);
- Fazer uso de qualquer tipo de suplemento nutricional;
- Ter o hábito de consumo frequente de suco de laranja e de suco de outra fruta;
- Ter ingerido álcool 7 dias antes do experimento;
- Ser tabagista;
- Possuir algum problema gastrointestinal crônico (por exemplo, doença inflamatória intestinal, doença celíaca, câncer);
- Estar gestante;
- Fazer uso de anticoncepcional hormonal;
- Estar participando de outro estudo;
- Ter praticado exercício físico 48 horas antes da realização do estudo.

3.1.3 Caracterização dos participantes

Primeiramente as participantes responderam um questionário para confirmação da adequação quanto aos critérios de inclusão e exclusão. O peso corporal foi aferido utilizando balança plataforma digital, com precisão mínima de 100 g, posicionada em superfície lisa e nivelada. A estatura foi aferida em um estadiômetro com precisão de 0,5 cm. As participantes ficaram descalças, eretas e foi solicitado para retirar adornos e acessórios. Todas as medidas foram aferidas duas vezes e o valor utilizado neste trabalho foi a média entre as duas medidas. Com os valores de peso e estatura foi calculado o índice de massa corporal (IMC) e classificado segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995).

As circunferências da cintura (CC) e do quadril (CQ) foram medidas com as participantes eretas, braços relaxados ao lado do corpo, abdômen relaxado, pés juntos e a região medida livre de roupas. O ponto de medição utilizado para a CC foi o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca e para aferir a CQ a fita métrica foi colocada na região de maior protuberância, sem comprimir a pele.

A pressão arterial foi aferida por aparelho digital da marca Omron, com a participante sentada e com o braço apoiado, sendo o resultado obtido pela média entre três medidas.

3.2 Delineamento do estudo

No primeiro dia do protocolo do estudo, foram coletados 30 mL de sangue de cada voluntária. Neste mesmo dia, dados de consumo alimentar foram obtidos por meio de um questionário de frequência alimentar desenvolvido pelo grupo, e foram aferidas as medidas antropométricas (peso, estatura e circunferência da cintura) e a pressão arterial. Neste mesmo dia, a voluntária recebeu o número de garrafas correspondente ao consumo diário de 500 mL de suco de laranja Moro a ser ingerido durante 2 semanas, sendo, posteriormente, entregue o restante para completar 4 semanas de intervenção.

Após 2 semanas de intervenção, uma nova coleta de sangue de cada voluntária foi realizada. No dia posterior ao consumo da última garrafa de suco para completar 1 mês 28 dias de intervenção, foi realizada a uma última coleta de sangue, aferida as medidas antropométricas e a voluntária respondeu novamente, ao questionário de frequência alimentar. Todas as coletas de sangue foram de 30 mL, posteriores a 12 horas de jejum. Segue abaixo o delineamento do estudo (Figura 4).

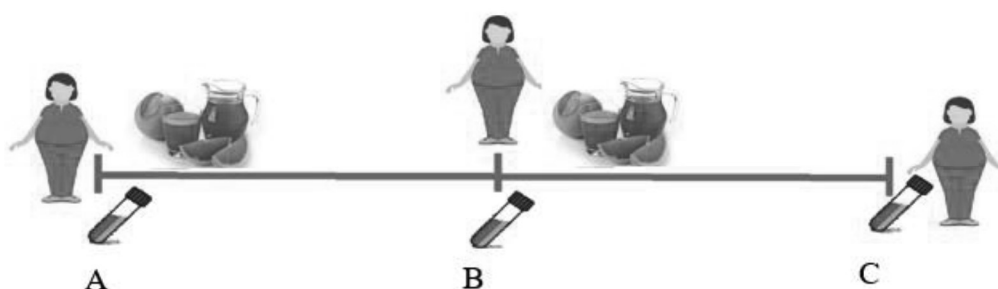


Figura 4 - Delineamento do estudo.

3.3 Suco de laranja Moro

O suco de laranja Moro, sem adição de água, açúcar e conservantes, foi adquirido em um estabelecimento comercial. O produto foi acondicionado em freezer. Um único lote de suco de laranja foi utilizado durante todo o estudo.

O suco de laranja Moro teve sua composição de compostos fenólicos avaliados pelo método DPPH e ORAC de dois lotes do suco. A caracterização dos compostos bioativos presentes no suco de laranja Moro foi realizada no Departamento de Alimentos e Nutrição

Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade da Profa. Neuza Mariko Aymoto Hassimoto.

3.4 Análises bioquímicas e determinação da concentração sérica de biomarcadores inflamatórios

Uma amostra do sangue foi coletada para a realização de dosagens bioquímicas. O sangue total foi coletado em tubo sem anticoagulante, após a coleta essa amostra foi centrifugada e o soro armazenado para posterior dosagem de: Triglicérides, Magnésio, Sódio, Potássio, Cálcio sérico, Insulina, Colesterol total, Lipoproteína de alta densidade (HDL), Lipoproteína de baixa densidade (LDL), Proteína C reativa (PCR), Progesterona, Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), Gama GT, Creatina, Ureia, Amilase, Complemento por metodologia automatizada (Cobas 6000® - Roche Diagnostics). As concentrações séricas de biomarcadores inflamatórios (IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1) e a dosagem das moléculas solúveis de adesão (VCAM e ICAM) foram analisadas por kits comerciais (Merck Millipore), assim como, a leptina pela técnica de imunoenensaio (Enzo Life Sciences).

3.5 Sangue periférico

3.5.1 Hemograma

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA K3 e utilizadas para a realização do hemograma por metodologia automatizada (ABX® HORIBA). Valores diferenciais, quando necessários, foram confirmados por microscopia em extensões sanguíneas coradas pela coloração de May Grunwald-Giensa modificada (ROSENFELD, 1947).

3.5.2 Citometria de Fluxo

Para realização da quantificação das Integrinas CD11b e CD18 por citometria de fluxo, também foram utilizadas amostras coletadas com EDTA K3. As células foram incubadas com os respectivos anticorpos CD11b (Cat. 11-0112-82; eBioscience, San Diego, CA, USA) e CD18 (Cat. 555923; BD, Franklin Lakes, NJ, USA), após a incubação prosseguimos com a lise das hemácias. A seguir as células foram lavadas com PBS e

centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi desprezado por inversão e foi adicionado 400 µL de Formaldeído a 1% e imediatamente realizou-se a aquisição no FACSCanto II (Becton Dickson, NJ, USA) foram adquiridos 50.000 eventos. As aquisições foram analisadas e compensadas pelo software FLOW JO 7.6 (TreeStar, OR, USA).

3.6 Separação das células polimorfonucleares e quantificação da expressão de moléculas NFκB, STAT-3, Rho e CDC42.

Uma alíquota da amostra sanguínea foi destinada para a obtenção de células polimorfonucleares. Para essa etapa utilizamos gradiente de densidade para separação das células polimorfonucleares do sangue das voluntárias.

Brevemente, o sangue foi centrifugado, o plasma removido e armazenado, o sangue ressuspenso em PBS e posteriormente adicionado a um gradiente previamente preparado de solução de Percoll 60% e solução de Percoll 70%. Após a centrifugação, as células polimorfonucleares foram obtidas. Essas células passaram por dois processos de lavagem com PBS para retirada do reagente Percoll®. Após a lavagem, uma alíquota das células foi utilizada para extração de RNAm e outra alíquota destinada para a extração de proteínas com reagente RIPA. A partir desse lisado celular foram realizados os ensaios de determinação das proteínas NFκ-B, STAT-3, Rho e CDC42 por *Western Blot*.

3.6.1 Western blot

Para a realização do Western blot, 30 µg de proteínas totais do extrato de células foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE 8 ou 10%) em aparelho para minigel Mini-Protean (BioRad). Após a eletroforese, as proteínas separadas no gel foram transferidas eletricamente para membranas de nitrocelulose por 2 horas a 120V. Após a transferência, a ligação inespecífica de anticorpos à membrana foi diminuída pela incubação dessas com solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) por 2 horas, à temperatura ambiente sob agitação. As membranas foram incubadas com anticorpos específicos (Santa Cruz Biotechnology), NFκB (sc-372), pNFκB (sc-33039), Stat3 (sc-8019), pStat3 (sc-8059), Rho (sc-418) e Cdc42(sc-8401) na diluição 1:1000, contra proteínas-alvo encontrados em solução bloqueadora (com 3% de BSA), por 4 horas, à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por 30 minutos com a mesma solução, sem albumina sérica bovina (BSA). Após a lavagem as membranas foram incubadas com anticorpo secundário

adequado conjugado com peroxidase e, em seguida, incubadas com solução contendo reagentes de quimioluminescência. As membranas foram então expostas a filmes fotográficos que foram imediatamente revelados. A intensidade das bandas de autorradiografia reveladas foi determinada por densitometria óptica. A determinação da expressão das proteínas foi normalizada por quantificação de β -actina (1:10000; Sigma, St. Louis, EUA, #A3854).

ETAPA II

3.7 Análise *in vitro*

Foram utilizadas as células de linhagem C1498 (ATTCC®TIB-49™) para avaliar os efeitos da C3G em parâmetros inflamatórios em especial sobre os processos de migração celular.

As células foram devidamente cultivadas em meio DMEM alta glicose 10% e mantidas em incubadora em uma atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ a 37°C. Foram plaqueadas 1x10⁶ células/poço/mL e expostas por 24 horas a C3G em diferentes concentrações, e estimuladas ou não com 1,25 μ g/mL de LPS (Lipopolissacarídeo Gram-negativo, 055:B5, Sigma, St. Louis, EUA). Para escolha da dose de C3G, foi inicialmente realizada uma curva dose resposta nas concentrações de 3, 6, 12, 25, 50, 100 e 200 μ M (QIN et al, 2009) e avaliada proliferação, ciclo celular e apoptose.

3.7.1 Ensaio de citotoxicidade celular

A citotoxicidade celular foi realizada pela técnica do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), que avalia a atividade mitocondrial de células viáveis pela quantificação da atividade da desidrogenase. Essa técnica baseia no princípio das células viáveis de reduzirem metabolicamente o sal de MTT por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul-púrpura, que se acumula no citoplasma celular (MOSMANN, 1983).

Foram plaqueadas 1x10⁶ células/poço/mL e após 24 horas de exposição das células as diferentes concentrações de C3G e estimuladas ou não com 1,25 μ g/mL de LPS, o meio de cultura foi retirado e adicionado 100 μ L da solução de MTT (5mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) por poço da placa e posteriormente incubadas por 2 horas em atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ à 37oC. Posteriormente, a solução de MTT foi

aspirada e 100µL de isopropanol foi adicionado por poço para a dissolução dos cristais de formazan. Finalmente, a placa foi incubada 12 horas em temperatura ambiente, e a absorbância (570nm) foi medida. A leitura foi realizada no espectrofotômetro Varioskan LUX Plate Reader (Thermo Scientific™, EUA).

3.7.2 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo.

A avaliação da apoptose das células foi realizado após cultivo com 50µM de C3G e estimuladas ou não com 1,25 µg/mL de LPS, foi realizada pela marcação das células com Anexina V- FITC e Iodeto de Propídio (PI). As células foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/poço/mL e cultivadas 24h em atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ à 37°C. Após 24 horas as células foram removidas centrifugadas e adicionados e no *pellet* 50 µl de tampão de Anexina V, 3 µL de Anexina V-FITC (PharmingenBecton Dickinson) e 8 µL de PI (Invitrogen – Molecular Probes). As células ficaram incubadas durante 20 min protegidas da luz. A aquisição de dados foi realizada por citometria de fluxo (FACScan®, Becton Dickson, San Jose, EUA). A análise foi realizada de acordo com a % de células marcadas, com Anexina V-FITC e o PI sendo para um, ou para ambos os marcadores analisados no programa FlowJo® (Tree Star, Inc, EUA) (RIEGER *et al*, 2011).

3.7.3 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

Para a avaliação do ciclo das células após cultivo com 50µM de C3G e estimuladas ou não com 1,25 µg/mL de LPS, foram preparadas placas com 1×10^6 células/poço/mL e incubadas por 24 horas, em atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ à 37°C. Após, as células foram coletadas centrifugadas e ressuspensas em 50µl de PBS e 200µl de etanol 70%, sendo os tubos mantidos no gelo por 20 minutos. Após esse período as células foram centrifugadas, desprezado o sobrenadante retirado e no *pellet* foi adicionado 2,5µl de RNase durante 30 minutos a 37° C. Em seguida foram adicionados aos tubos 4µl de iodeto de propídeo por mais 30 minutos. A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo (FACScan®, Becton Dickson, San Jose, EUA). A análise se deu pela quantificação da porcentagem das regiões G0/G1 e S/G2/M, utilizando o programa FlowJo® (Tree Star, Inc, EUA)

3.8 Dosagem de citocinas

As células C1498 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/poço/mL e cultivadas em DMEM alta glicose 10%, em atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ à

37°C, durante 24h na presença de 50µM C3G e estimuladas não com 1,25 µg/mL de LPS. A análise quantitativa das citocinas pró e anti-inflamatórias IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, e CCL2, no sobrenadante das células cultivadas foi realizada pelo método de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) – kits R&D Systems, seguindo as instruções do fabricante.

3.9. Determinação da expressão das proteínas NFκB (total e fosforilado) NFκB, STAT-3, Rac, Rho, CDC42

Uma vez coletado o sobrenadante para dosagem de citocinas, as células também foram coletadas, lisadas e a expressão do NFκB total e fosforilado, bem como STAT-3, Rac-1, RhoA e CDC42 foram quantificadas por Western blot. Os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology), utilizados foram, NFκB (sc-372), p NFκB (sc-33039), Stat3 (sc-8019), pStat3 (sc-8059), Rac (sc-514583), Rho (sc-418) e Cdc42(sc-8401) na diluição 1:1000 e a metodologia foi realizada como já descrito no item 4.6.1.

3.10 Ensaio de migração

As células (C1498) na concentração de 1×10^6 C1498 foram plaqueadas utilizando placas de 24 poços e *transwells* com poros de 8 µm (Corning, New York, NY, EUA, cat. 353097). As células foram incubadas na parte superior da caçapa com 300 µL de DMEM sem suplementação de soro bovino fetal e na presença ou ausência de 50µM C3G. Adicionalmente, na parte inferior da caçapa foi adicionado somente meio DMEM ou meio DMEM com 1,25 µg/mL de LPS, ou meio DMEM 0.1 µM de fMLP (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, Sigma, St. Louis, EUA cat. F3506). As células foram incubadas 6h em atmosfera umidificada a 95%, 5% de CO₂ à 37°C, e após esse período o número de células que migrou da parte superior da caçapa para a parte inferior foi contado manualmente em câmara de Neubauer (SENGER *et al*, 2002).

3.11 Análise estatística

Os dados foram primeiramente submetidos a testes de normalidade aplicando o teste Kolmogorov-Smimov e classificados em paramétricos e não paramétricos. Os resultados já obtidos foram apresentados em média e desvio padrão quando classificados em paramétricos e em mediana e percentil quando classificados como não paramétricos. Inicialmente, os dois tempos (A e B) foram avaliados em relação ao momento *baseline*

por meio do teste ANOVA com pós-teste de múltipla comparação de Holm-Sidak quando forem classificados como paramétricos e pelo teste de Friedman e pós-teste de múltiplas comparações de Dunn quando classificados como não paramétricos. Para as análises *in vitro* na definição da dose foi utilizado ANOVA de uma via com pós-teste de Dunnett e nos demais estudos foi utilizado ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, para um nível de significância de 95%. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism[®] (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

4. RESULTADOS

ETAPA I

4.1 Avaliação da Composição do Suco de Laranja.

Tabela 1 - Parâmetros de qualidade, fenólicos totais, ácidos orgânicos e fibra alimentar de sucos de laranja pasteurizados, cv. Pera e Moro.

Composição	Laranja Pera	Laranja Moro
Açúcares Solúveis**		
Sacarose	3,00 ± 0,33	“continuação”
Frutose	1,21 ± 0,18	2,96 ± 0,05
Açúcares Solúveis**		
Total	5,24	10,52
pH	4,08 ± 0,00	4,14 ± 0,00
TSS (°Brix)	7,2 ± 0,00	6,5 ± 0,00
Fenólicos Totais*	46,04 ± 0,00	45,75 ± 0,00
Ácidos Orgânicos*		
Ácido Málico	419,16 ± 0,20	257,18 ± 0,04
Ácido Succínico	102,98 ± 0,00	Nd
Ácido Ascórbico	180,00 ± 0,41	353,09 ± 0,12
Fibra Alimentar**		
Fibra Insolúvel	0,05 ± 0,01	0,20 ± 0,04
Fibra Solúvel	0,11 ± 0,00	0,13 ± 0,02
Total	0,31	0,18

Valores expressos como média ± desvio padrão; nd – não detectado; *Valores expressos em mg/100 mL; ** valores expressos em g/100 mL.

4.2 Identificação e quantificação de flavonoides.

Tabela 2 - Conteúdo de flavonoides no suco de laranjas cv. Pera e cv. Moro.

Compostos	Pera		Moro	
	Sobrenadante	Pellet	Sobrenadante	Pellet
Narirutina	1,10 ± 0,66	2,79 ± 0,02	2,48 ± 0,28	1,71 ± 0,96
Hesperidina	3,44 ± 2,63	36,09 ± 0,20	5,89 ± 0,62	30,56 ± 13,58
Didimina	0,96 ± 0,42	2,08 ± 0,01	0,68 ± 0,16	1,22 ± 0,69
Naringina	0,43 ± 0,33		0,33 ± 0,01	
Naringenina	0,68 ± 0,20		0,11 ± 0,01	
Eriocitrina	0,84 ± 0,65			
Neohesperidina	0,08 ± 0,11			
Hesperitina			0,09 ± 0,02	
Cianidina-3-O-glicosídeo			12,23 ± 1,76	
Cianidina-3-O-(6"-malonyl glicosídeo)			2,89 ± 1,14	
Flavanonas totais	7,53	40,96	9,58	33,49
Antocianinas totais			15,12	
Flavonoides totais		48,49	58,19	

Valores expressos em mg/100 mL de suco (média ± desvio padrão)

4.3 Dados do estudo

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, número do CAAE 69382217.9.0000.5421.

Foram incluídas no estudo 24 voluntárias que se encaixaram nos critérios de inclusão. Após a primeira coleta foram excluídas 13 participantes, por terem feito uso de medicamentos anti-inflamatórios ou por não terem aderido adequadamente ao protocolo estabelecido, também foi excluída uma paciente que apresentou dosagem de hemoglobina abaixo dos valores de referência.

4.4 Antropometria

4.4.1 Peso e Índice de massa corporal (IMC)

O IMC foi realizado para definir o estado nutricional das participantes no *baseline* (tempo A), 14 dias após a suplementação com 500 ml de suco de laranja Moro (tempo B) e 28 dias após a intervenção (tempo C). Todas as participantes entraram no estudo classificadas como sobrepeso (média IMC 28 kg/m²). No entanto, 2 participantes (18%) terminaram o estudo

com diagnóstico nutricional de obesidade grau 1 ($31,2\text{kg}/\text{m}^2$ e $30,2\text{kg}/\text{m}^2$) (figura 5A). O peso médio no início da intervenção (tempo A) foi de $75,09\text{ kg}$, no tempo B e C foi de $75,54\text{ kg}$ (figura 5B).

4.4.2 Circunferência da cintura (CC) e relação cintura quadril (RCQ)

A circunferência da cintura foi realizada para avaliar o acúmulo de gordura na região abdominal que é preditora de risco de doenças cardiometabólicas. A medida da RCQ tem o mesmo objetivo da CC, os valores de referência para mulheres são $0,80\text{ cm}$ e 88 cm , respectivamente.

O valor médio da RCQ na população estudada no momento da admissão foi de $0,81$ e ao término do estudo $0,80$ (figura 5C). Já o valor médio da CC na admissão no estudo foi de $89,93\text{ cm}$ e ao término $88,09\text{cm}$ (figura 5D). Não houve diferença estatística entre os três tempos em nenhum destes parâmetros.

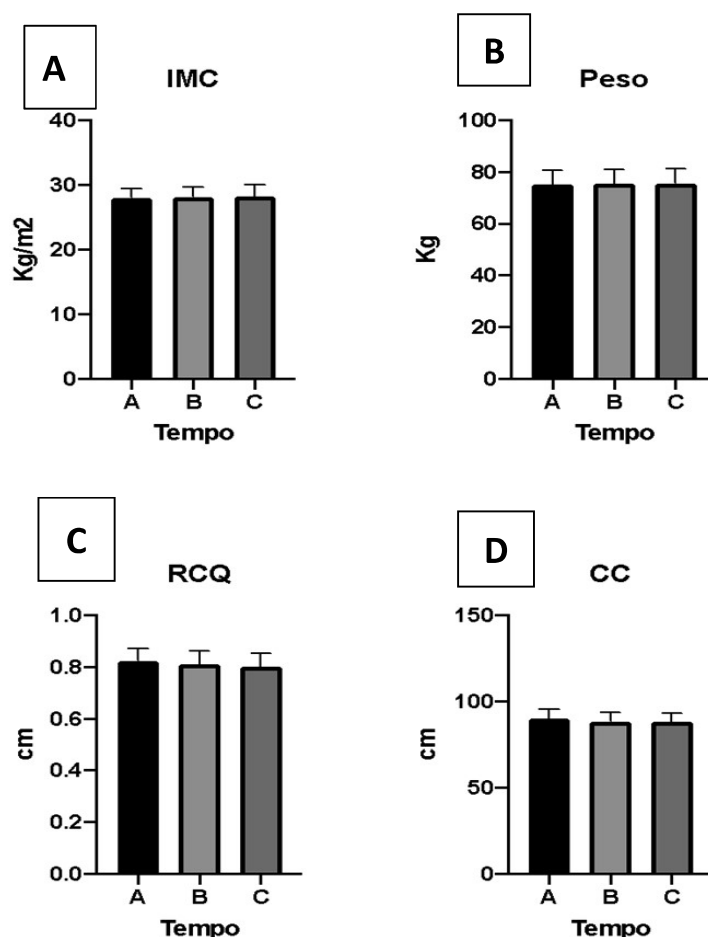


Figura 5 – Resultados antropométricos (n=11); IMC - índice de massa corporal kg/m^2 (5A); Peso em kg (5B); RCQ – relação cintura quadril em cm (5C); CC – circunferência da cintura em cm (5D). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

4.5 Avaliação bioquímica

A avaliação bioquímica das 11 amostras foi realizada nos três tempos de A, B e C considerando os seguintes parâmetros: lipoproteínas (figura 6), enzimas hepáticas (figura 7), glicemia, progesterona, marcadores de formação de fibrina (figura 8), marcadores de função renal, ureia e creatinina (figura 9), proteína C reativa e eletrólitos (figura 10), sendo que dentre todos as dosagens realizadas não foi encontrada diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados.

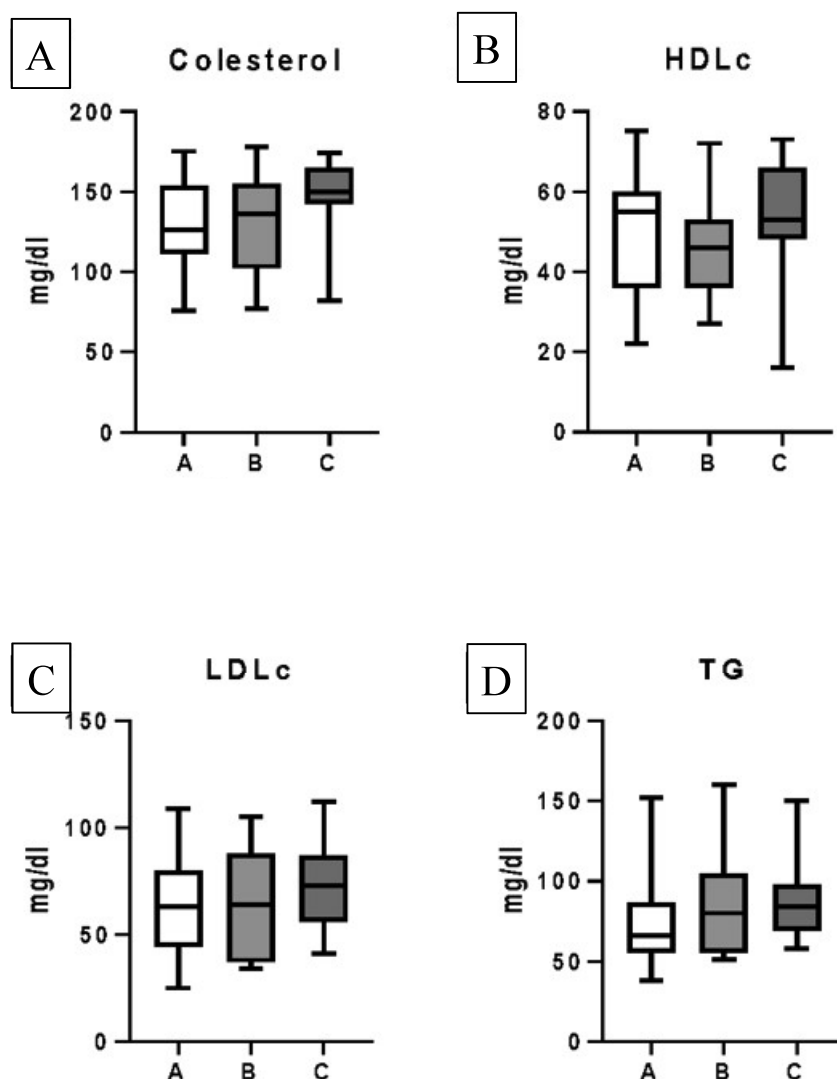


Figura 6 – Resultados nos diferentes tempos avaliados (n=11) de colesterol total mg/dl (6A); lipoproteína de alta densidade – HDL mg/dl (6B); lipoproteína de baixa densidade – LDL mg/dl (6C); e triglicérides – TG mg/dl (6D). Resultados expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90).

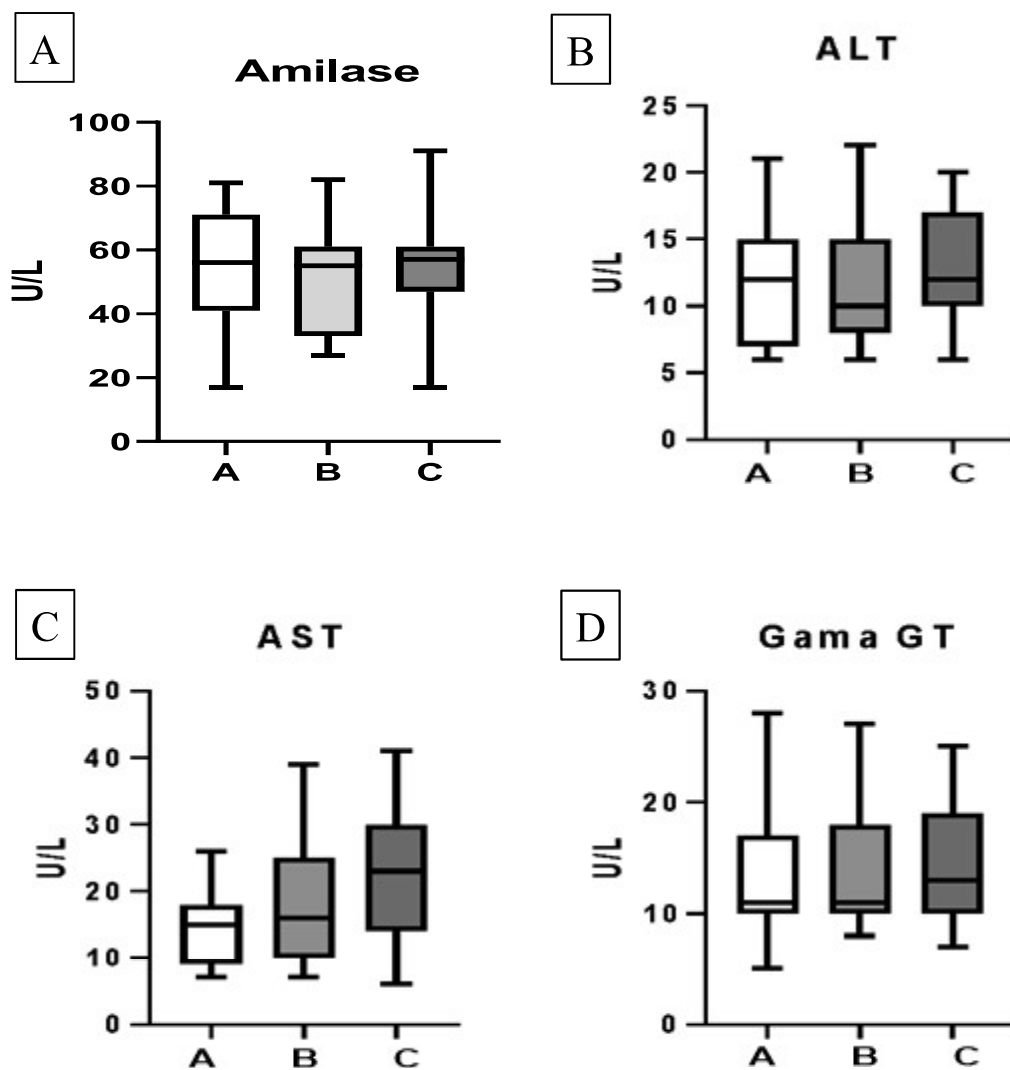


Figura 7 – Resultados nos diferentes tempos avaliados (n=11) de Amilase (7A); Alanina aminotransferase - ALT (7B); Aspartato aminotransferase – AST (7C); e Gama glutamiltransferase (7D). Resultados expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90).

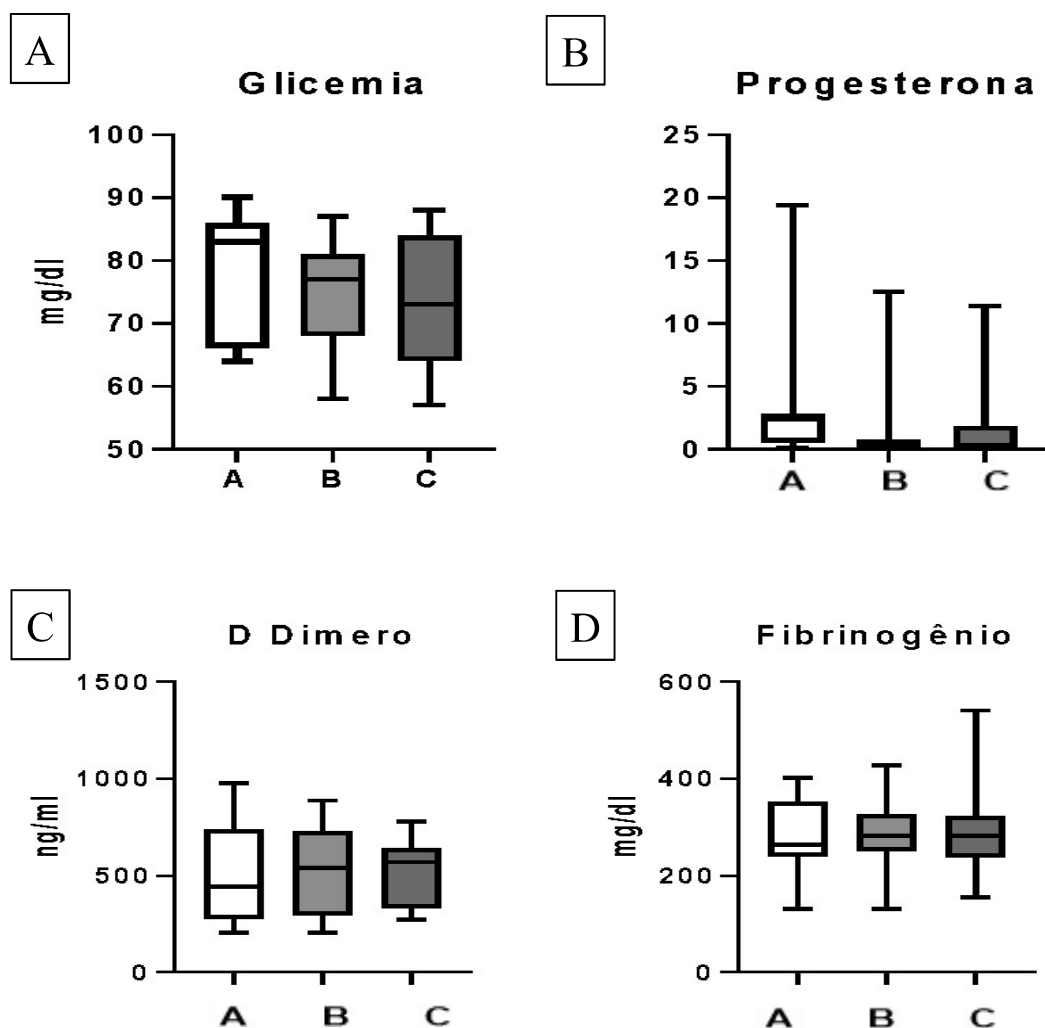


Figura 8 – Resultados nos diferentes tempos avaliados (n=11) de Glicemia mg/dl (8A); Progesterona mg/dl (8B); e marcadores de formação de fibrina: D-dímero ng/dl (8C) e fibrinogênio mg/dl (8D). Resultados expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90).

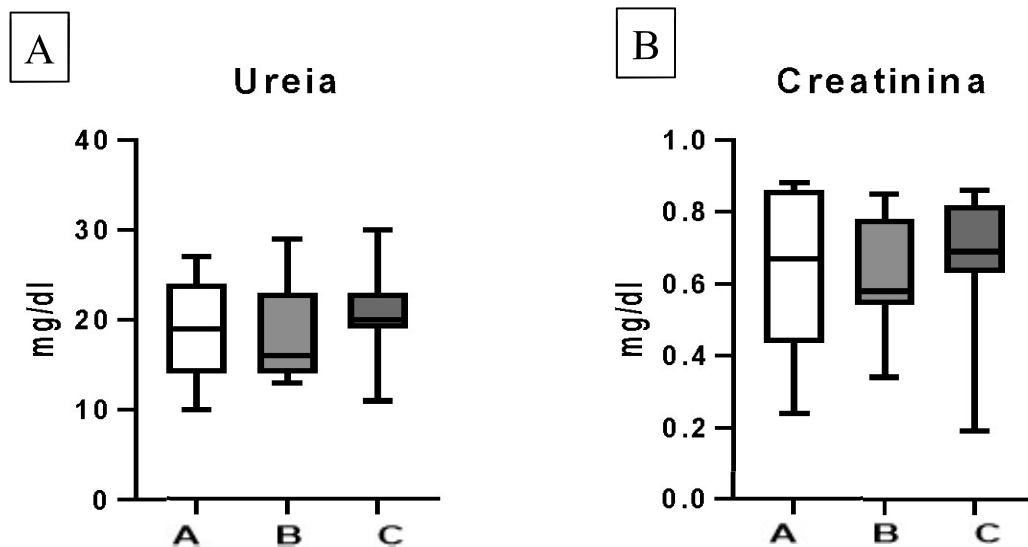


Figura 9 – Resultados nos diferentes tempos avaliados (n=11) de Ureia mg/dl (9A) e Creatinina mg/dl (9B). Resultados expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90).

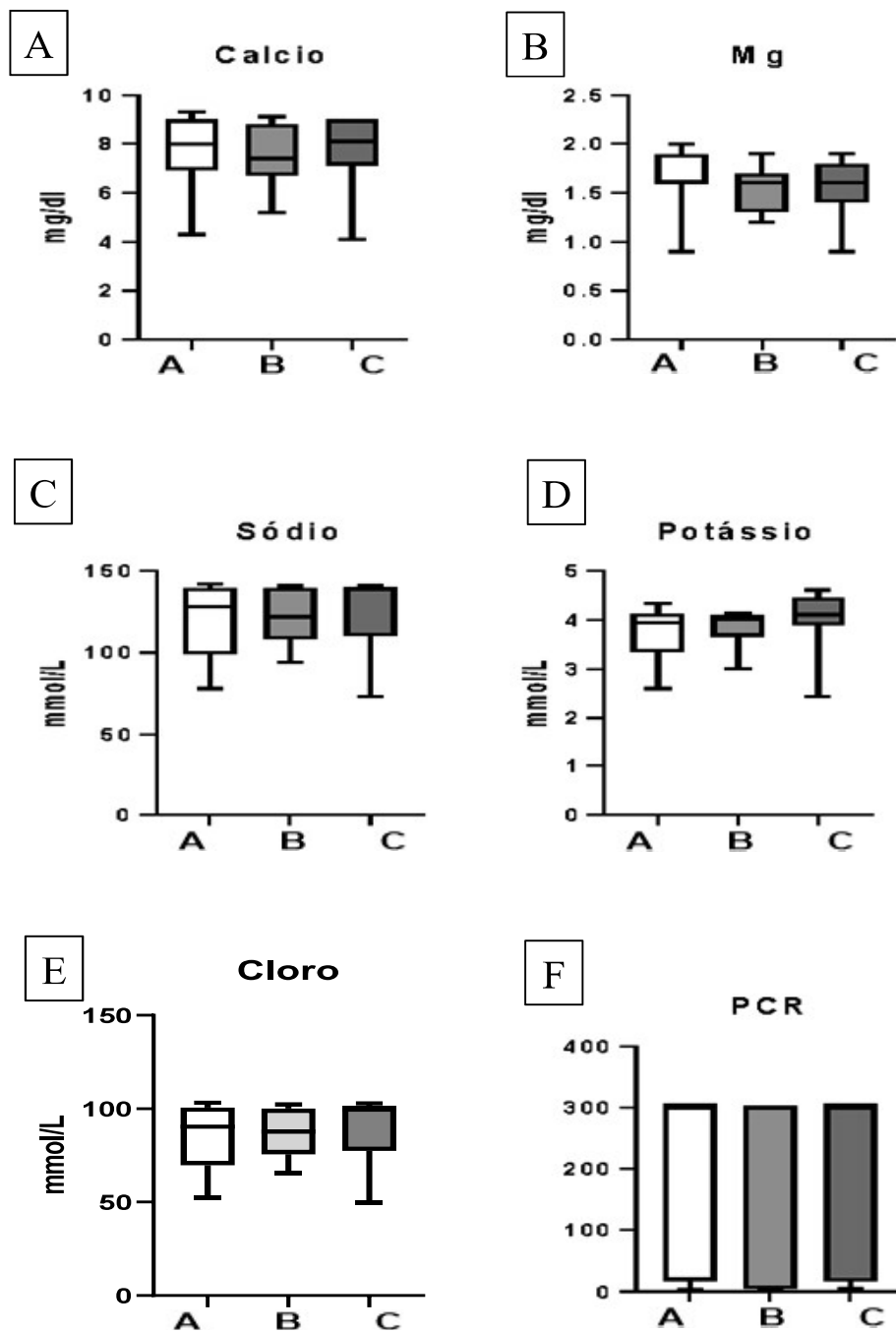


Figura 10 – Resultados nos diferentes tempos avaliados (n=11) dos eletrólitos: Cálcio mg/dl (10A), Magnésio mg/dl (10B), Sódio mmol/litro (10C), Potássio mmol/litro (10D) e Cloro mmol/litro (10E); e Proteína C reativa µg/dl (PCR) (10F) Resultados expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90).

4.6 Hemograma

As amostras de sangue periférico foram coletadas no três tempos avaliados e não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados, conforme mostra a figura a seguir.

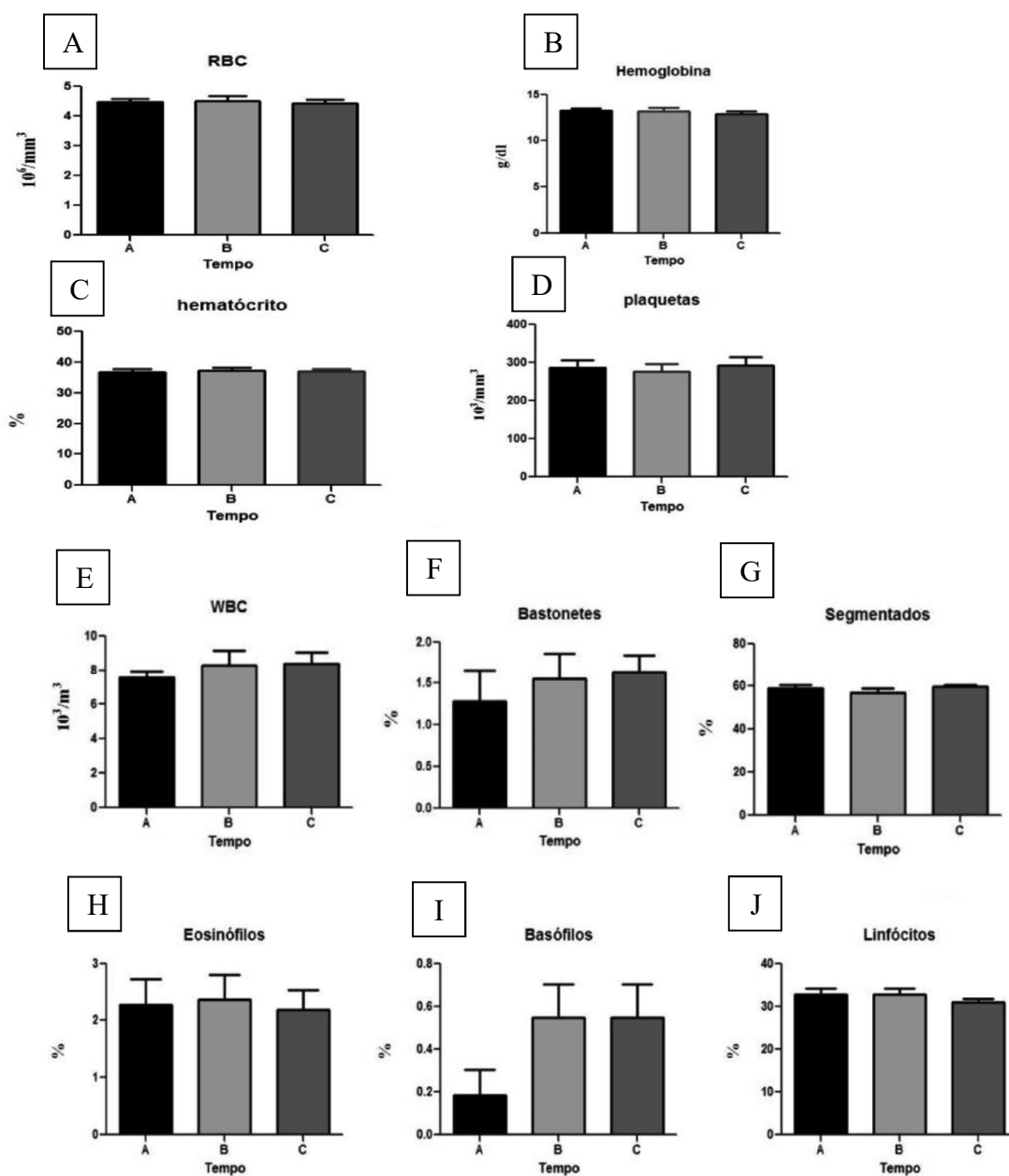


Figura 11 – Resultados nos diferentes tempos avaliados (n=11) de RBC $10^6/\text{m}^3$ (11A), Hemoglobina g/dl (11B), Hematócrito % (11C), Plaquetas $10^3/\text{m}^3$ (11D), WBC $10^3/\text{m}^3$ (11E), Bastonetes % (11F), Segmentados % (11G), Eosinófilos % (11H), Basófilos % (11I), Linfócitos % (11J). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

4.7 Interleucinas e moléculas de adesão (ICAM e VCAM)

A avaliação sérica das interleucinas IL-6, IL-10 e TNF- α e das moléculas de adesão ICAM e VCAM está demonstrada nas figuras 12 e 13. Em todos os parâmetros avaliados não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados.

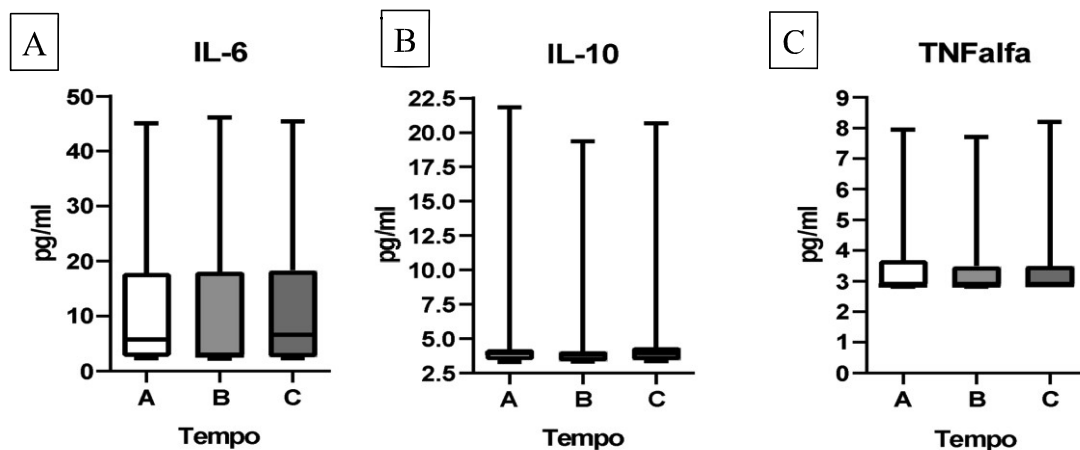


Figura 12 – Resultados dos valores séricos nos diferentes tempos avaliados (n=11) das Interleucinas – IL-6 (12A), IL-10 (12B) e TNF-alfa (12C). Resultados expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90).

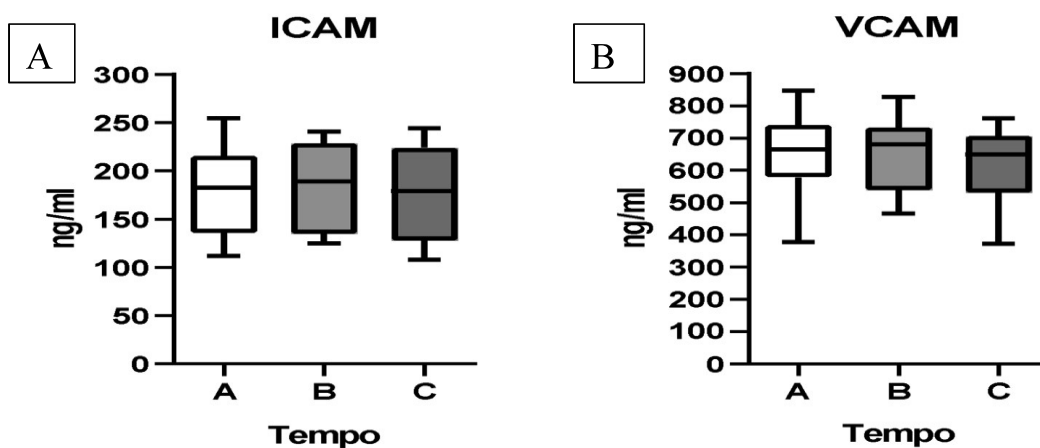


Figura 13 – Resultados dos valores séricos nos diferentes tempos avaliados (n=11) das moléculas de adesão ICAM (13A) e VCAM (13B). Resultados expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90).

4.8 Western blot (WB)

As análises da expressão proteica dos fatores de transcrição NF κ B total e fosforilado, STAT-3 total e fosforilado, bem como as proteínas de migração celular CDC42 e Rho, também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados.

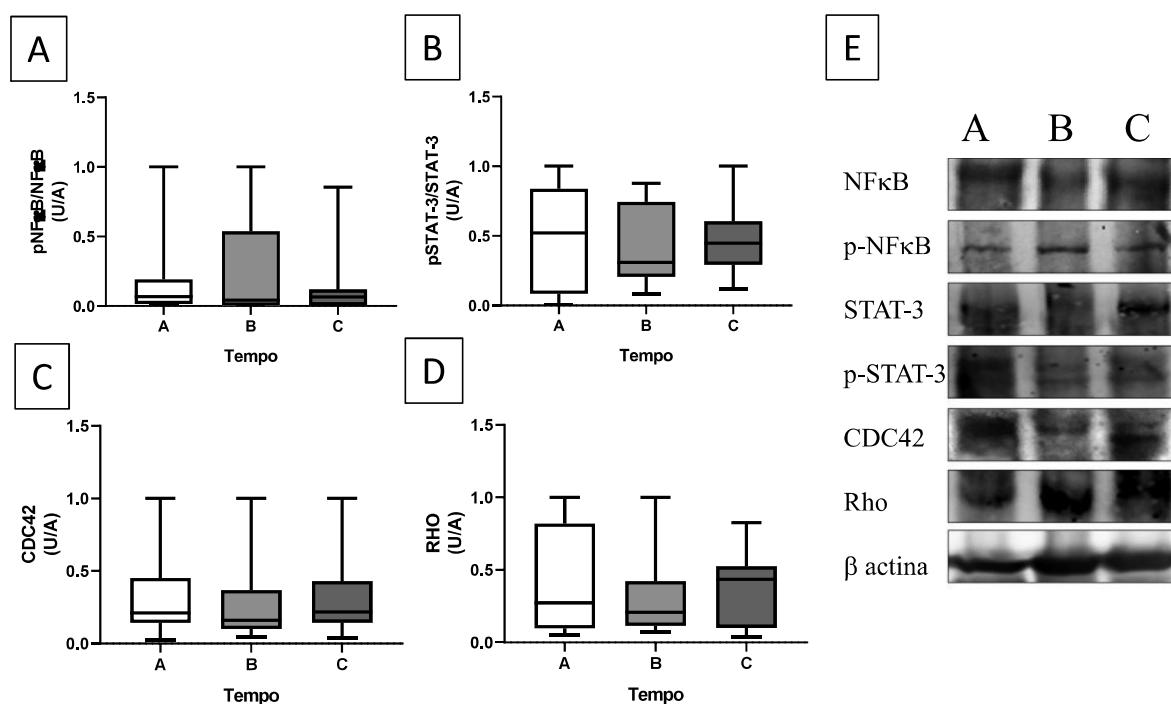


Figura 14 – Resultados do WB nos diferentes tempos avaliados (n=5) da relação da expressão total e fosforilada de NFκB (14A) e STAT 3 (14B). E expressão das proteínas CDC42 (14C) e Rho (14D). Foto representativa das análises das membranas de Western Blot (14E). Resultados expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90).

4.9 Citometria de fluxo

4.9.1 Imunofenotipagem leucocitária

Com a finalidade de caracterizar as células foram selecionados os marcadores CD4⁺, CD8⁺, CD14, importantes para o sistema imune e CD11b e CD18, ambos participantes do processo de migração celular.

Os histogramas foram obtidos por meio da citometria de fluxo e os resultados e a estratégia de análise estão apresentados na figura 15. Os resultados apresentados nas figuras 16 e 17 demonstram que nesses parâmetros também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos estudados.

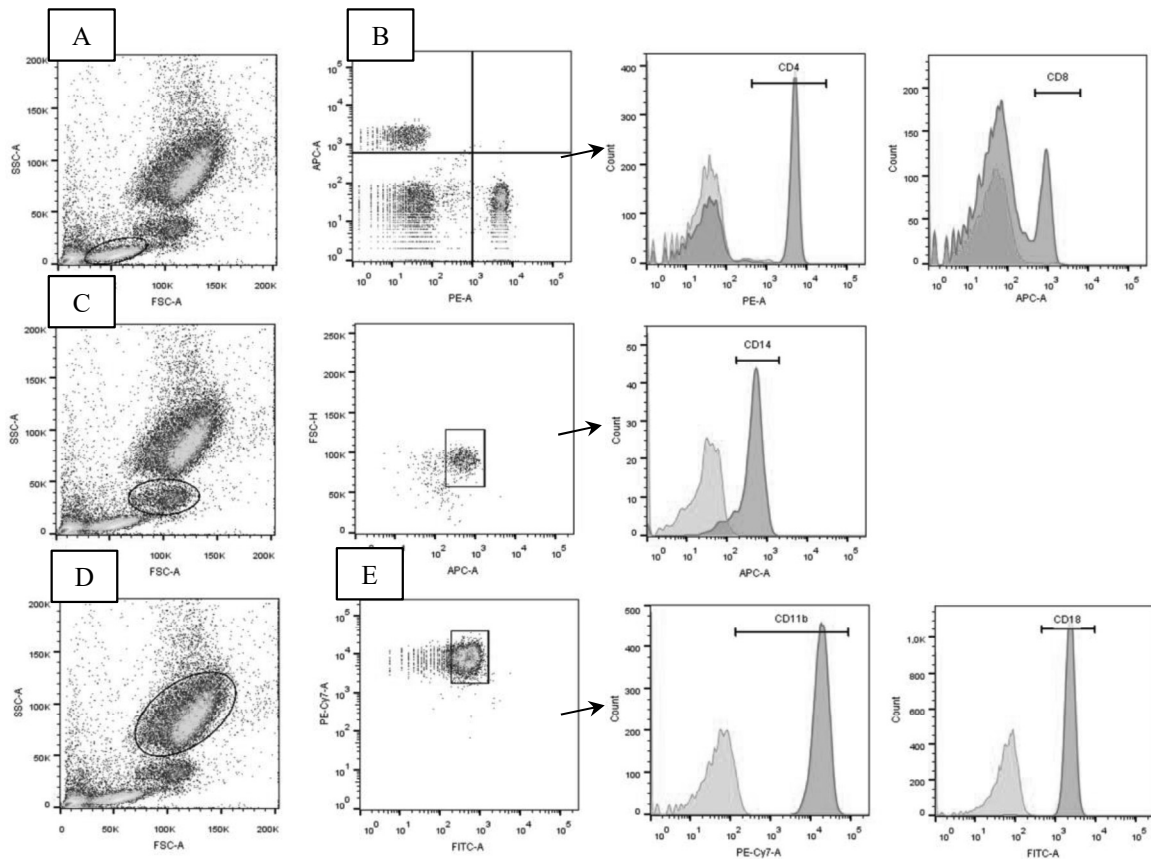


Figura 15 – Valores referentes à marcação fenotípica. FSC X SSC (A), (C) e (D); CD4⁺ e CD8⁺ (B); CD11b e CD18 (E). Estratégia de análise.

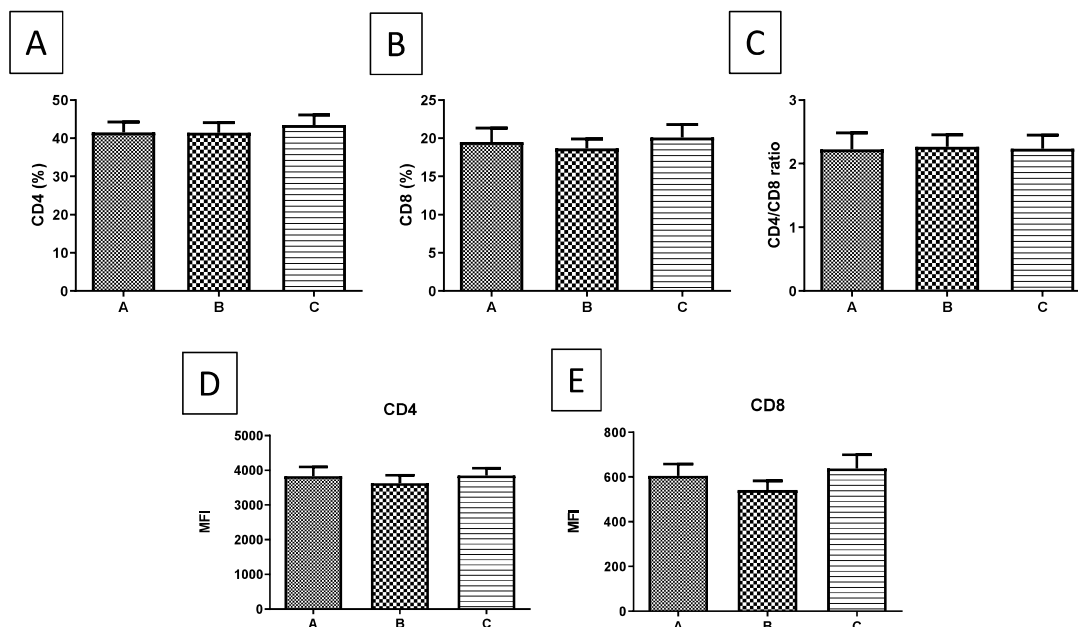


Figura 16 – Resultados nos diferentes tempos avaliados (n=6) referentes a média \pm desvio padrão da porcentagem da marcação fenotípica CD4⁺ (A), CD8⁺ (B), razão CD4⁺/CD8⁺ (C) e MFI de CD4⁺ (D) e CD8⁺ (E).

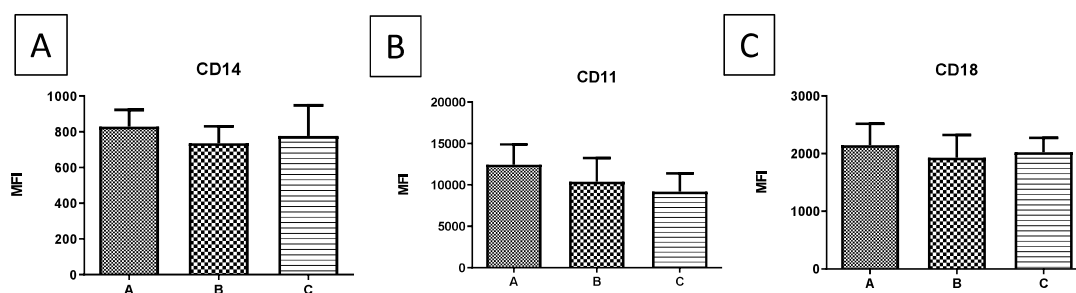


Figura 16 - Resultados nos diferentes tempos avaliados (n=6) referentes a média \pm desvio padrão da MFI de CD14 (A), CD11 (B) e CD18 (C).

ETAPA II

5 Análise *in vitro*

5.1 Ensaio de proliferação celular

A escolha da dose de C3G, foi realizada após análise da curva dose resposta às concentrações de 3, 6, 12, 25, 50, 100 e 200 μ M (QIN et al, 2009) pela técnica do MTT.

Dessa forma, a citotoxicidade celular foi analisada pelo ensaio calorimétrico MTT, onde células viáveis apresentam coloração roxa e células não viáveis não coram. Isso é resultado da conversão do sal MTT [3-(4,5-dimetiltiazol- 2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] em formazan, substância de cor roxa. Essa conversão acontece na membrana interna da mitocôndria que o formazan não atravessa ficando retido dentro das células vivas (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

O resultado do ensaio do MTT, realizado com as concentrações propostas neste trabalho para a C3G está apresentado na figura 18. As células cultivadas, tanto estimulados ou não com LPS, mostraram aumento significativo de citotoxicidade quando foram cultivadas com dose de C3G acima de 100 μ M. Concentrações entre 3 e 50 μ M não ocasionaram aumento da citotoxicidade No entanto, a concentração de 50 μ M foi escolhida para os demais experimentos, uma vez que essa dose não apresentou diferenças estatística em relação as células cultivadas na ausência de C3G (figura 18)

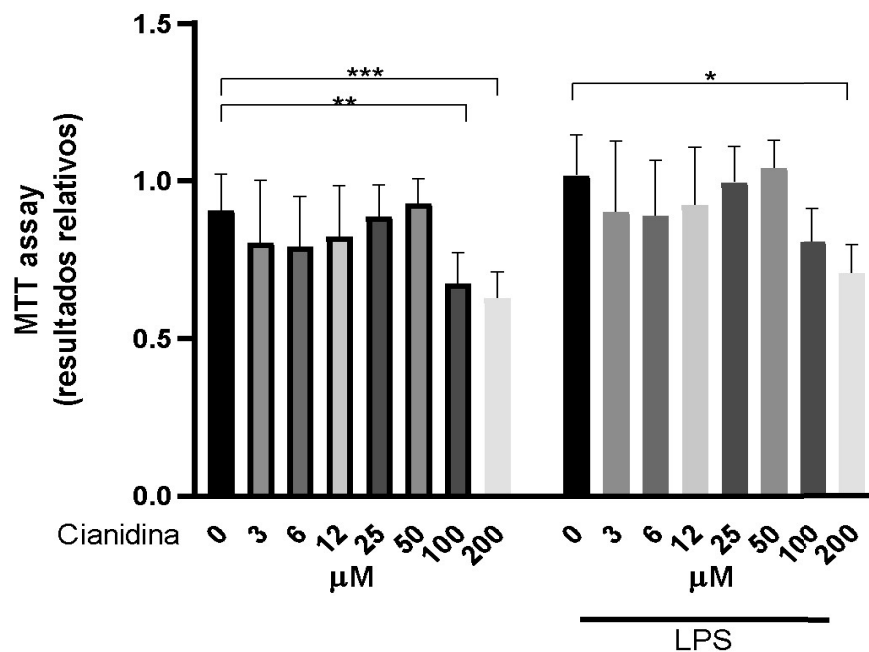


Figura 18 – Avaliação da citotoxicidade celular para definição da dose de cianidina 3 glicosídeo. As células foram cultivadas na ausência ou presença de 1,25μg/mL de LPS. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão da média. Resultado representativo de 9 ensaios independentes. * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0,05, ** para p-valor < 0,01 e *** para p-valor < 0,001.

5.2 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo.

As células foram tratadas com 50 μ M de C3G, estimuladas ou não com LPS e posteriormente realizada a citometria para avaliação da viabilidade e apoptose. A figura 18 A-D representa as estratégias de análise e confirmam que a concentração de 50 μ M de cianidina não altera a viabilidade celular, porém células estimuladas com LPS apresentaram de maneira significativa diminuição da viabilidade celular (figura 19E).

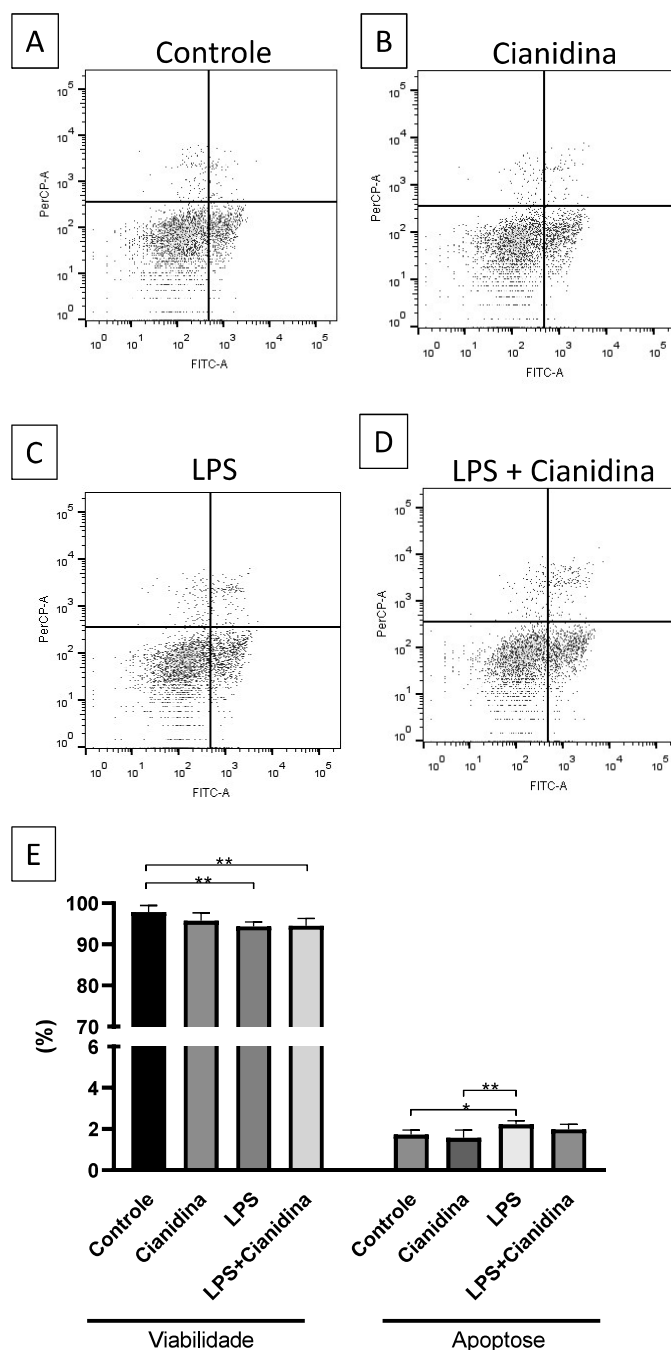


Figura 19 - Representação (A-D) dos grupos analisados referente a análise da viabilidade e apoptose celular apresentado em Dot plot com marcação de PI (Iodeto de Propídio) e Anexina V. Q1: Apoptose; Q2: Apoptose tardia; Q3: Necrose; Q4: Viáveis. Resultado representativo de 6 ensaios independentes. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média

da porcentagem de células em apoptose e de células viáveis (E) * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0,05 e ** para p-valor < 0,01.

5.3 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

O ciclo celular, foi avaliado em células C1498 tratadas com 50 μ M, de C3Ga e estimuladas ou não com LPS. A análise foi realizada quantificando-se a porcentagem das regiões G0/G1 e S/G2/M. Os resultados mostraram que nenhum dos grupos estudados apresentaram diferenças significativas no ciclo celular, confirmando que a dose escolhida poderia ser utilizada nos experimentos subsequentes (figura 20).

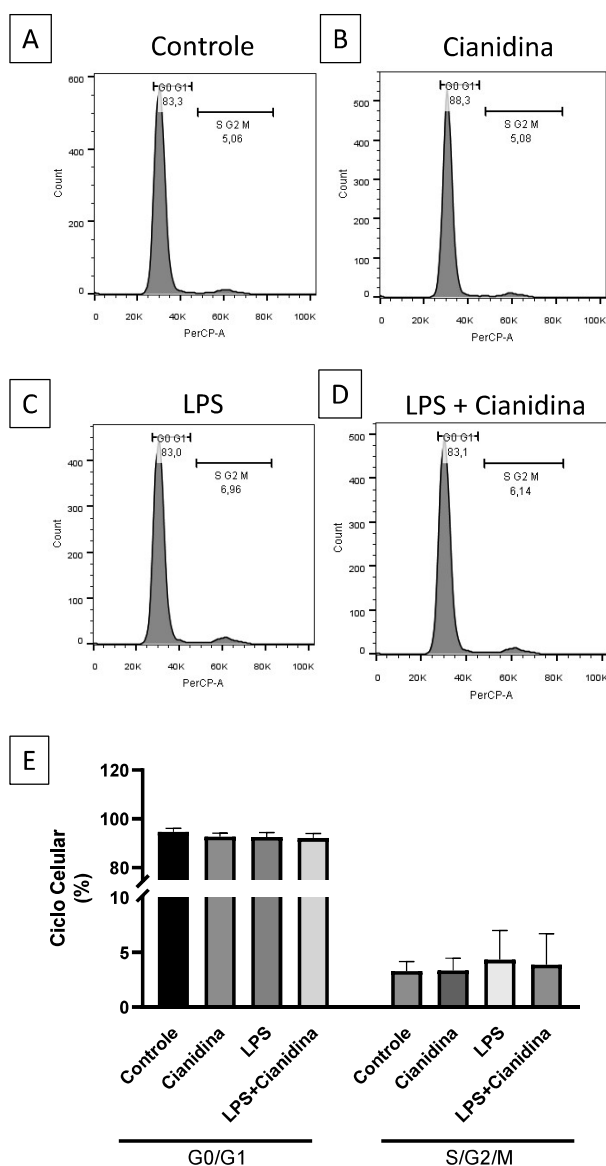


Figura 20 - Representação dos histogramas (A-D) dos grupos analisados, referente ao ciclo celular. Avaliação do Ciclo Celular pela quantificação das regiões G0/G1 e S/G2/M. Resultado representativo de 6 ensaios independentes. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média da porcentagem de células nas fases G0/G1 e S/G2/M (E).

5.4 Dosagem de citocinas

Uma vez definida e confirmada a dose de 50 μ M de C3Ga ser utilizada, as células foram cultivadas na presença e ausência de cianidina e estimuladas ou não com LPS, com o objetivo de avaliar a capacidade da cianidina em modular a síntese de importantes citocinas com ação inflamatória.

Dentre os resultados obtidos, inicialmente observamos que a cianidina, *per si*, não foi capaz de modular as citocinas estudadas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e CCL2) (Figura 21 A-F). Entretanto, quando comparado o grupo controle com o grupo LPS as concentrações de IL-6, IL-8, TNF- α e CCL2 (figura 20 A, B, C e E) tiveram um aumento significativo. Adicionalmente, observamos que células estimuladas com LPS e comparadas com células estimuladas com LPS na presença de cianidina apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação a produção IL-8, TNF- α e CCL2 (figura 20 B, C e E), demonstrando que a cianidina é capaz de atenuar a produção dessas citocinas quando a célula é estimulada com LPS. Outro ponto interessante foi que células estimuladas com LPS na presença de cianidina apresentaram maior capacidade de produção de IL-10 (figura 20 D). Em relação à produção de IL-1 β não observamos diferenças estatísticas entre os grupos estudados (figura 20 F).

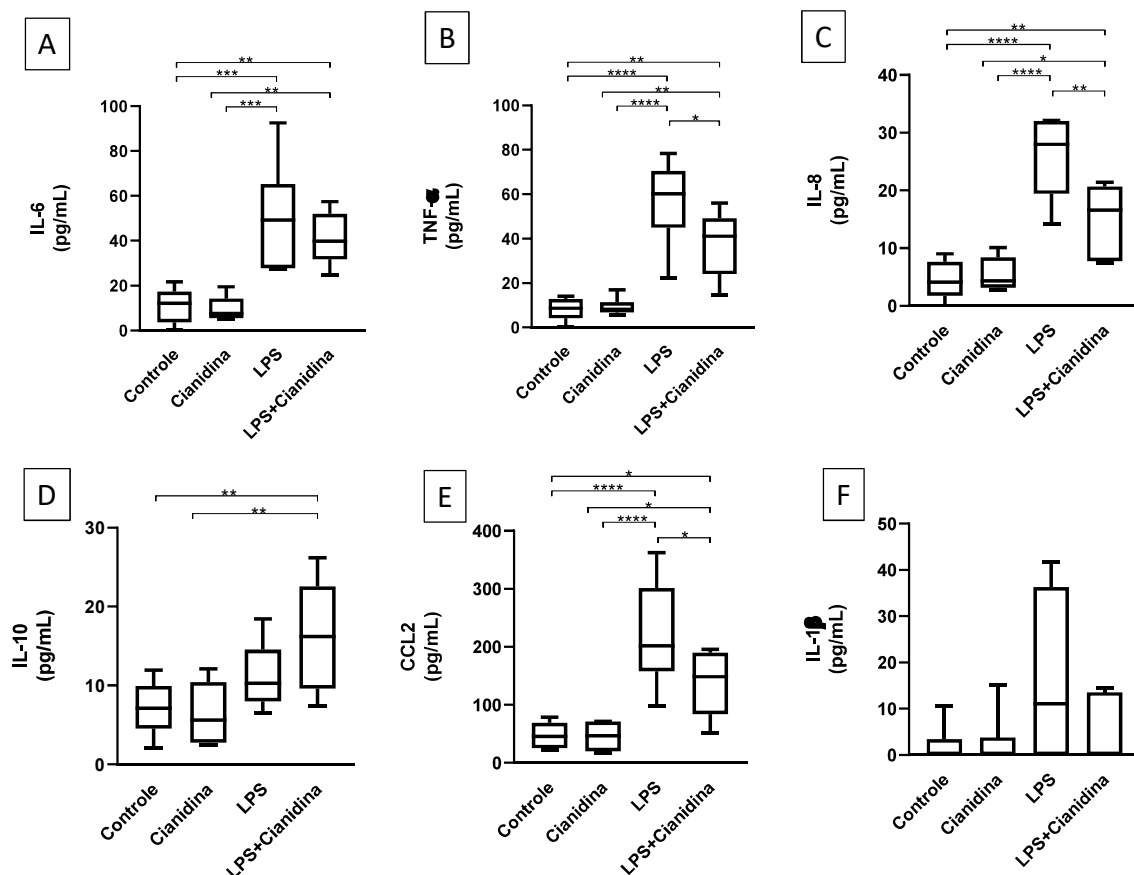


Figura 20 - Quantificação de citocinas nas células C1498 tratadas com e sem 50 μ M de cianidina e estimuladas ou não com LPS (n=6). Resultados da quantificação de IL-6 (A), TNF- α (B), IL-8 (C), IL-10 (D), CCL2 (E) e IL-1 β (F), expressos em box plot (A linha horizontal representa a mediana, a caixa engloba o percentil 25 a 75 e as barras de erro abrangem o percentil 10 a 90). * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0,05, ** para p-valor < 0,01, *** para p-valor < 0,001 e **** para p-valor < 0,0001.

5.5 Determinação da expressão das proteínas NF κ B (total e fosforilado) NF κ B, STAT-3, Rac, Rho, CDC42

A expressão das proteínas envolvidas na resposta inflamatória NF κ B e STAT-3 (Figura 21 A-C) também foram avaliadas nas células C1498, bem como a expressão das proteínas envolvidas na migração celular Rac, Rho e CDC42 (figura 22 A-F). Os resultados demonstram que a expressão da relação p-NF κ B/NF κ B é atenuada na presença de cianidina em células que foram estimuladas com LPS (figura 21A) e que a cianidina *per si* não altera a expressão de NF κ B (figura 21A). Entretanto, em relação a expressão da p-STAT3/STAT3 o LPS aumenta sua expressão, embora a análise estatística não demonstrou diferenças significativas quando comparado o grupo LPS com o grupo LPS + cianidina, apesar de uma tendência de redução da expressão (Figura 21 B).

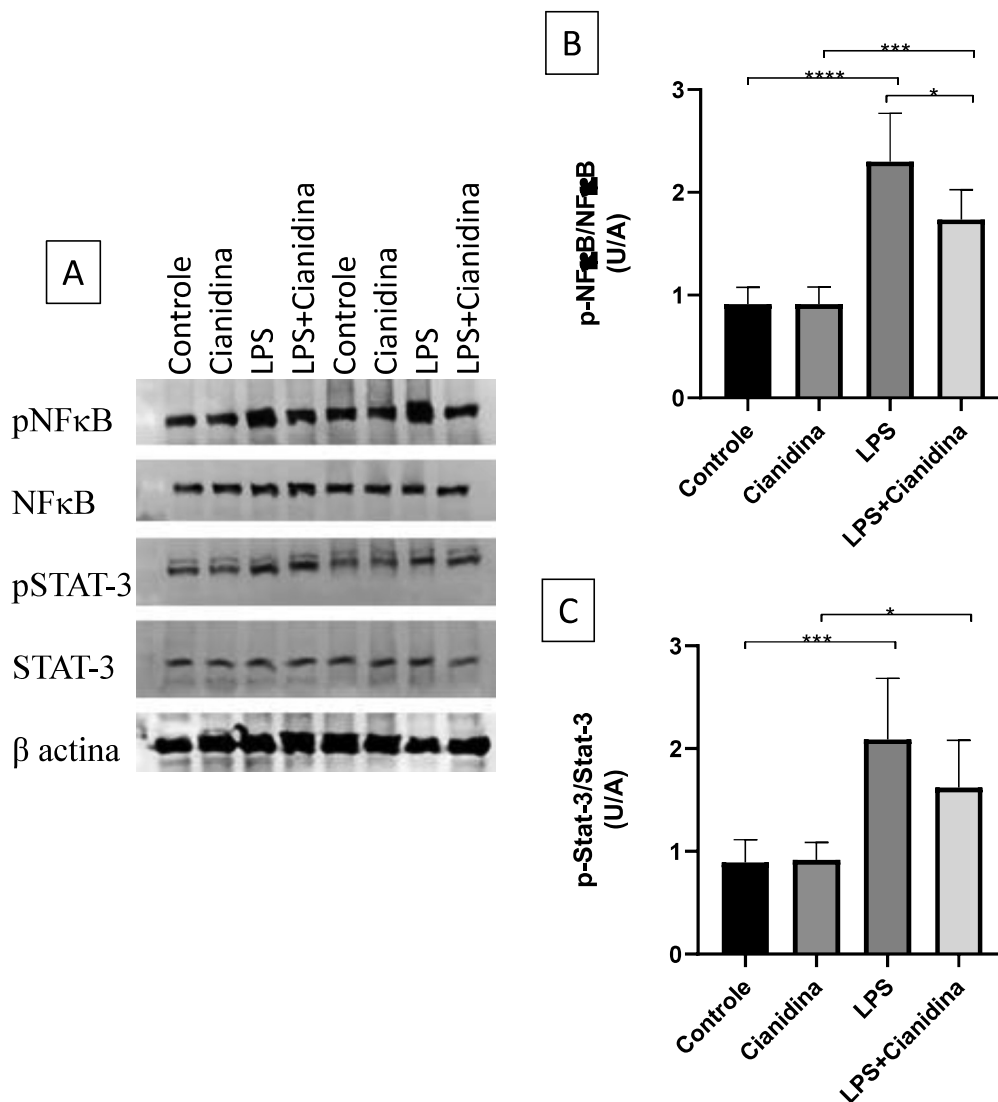


Figura 21 – Quantificação da expressão de NFκB e STAT-3 nas células C1498 tratadas com e sem 50 μM de cianidina e estimuladas ou não com LPS (n=6). Foto representativa das análises das membranas de Western Blot (A). Resultado representativo de 6 ensaios independentes. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média da expressão da razão p-NFκB/NFκB (B) e da razão pSTAT3/STAT3 (C). * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0,05, *** para p-valor < 0,001 e **** para p-valor < 0,0001.

Diferentemente do que observamos com a expressão dos fatores de transcrição NF-κB e STAT-3, não observamos diferenças estatisticamente significativa entre os grupos estudados em relação a expressão de Rac-1 e CDC42 (Figura 22 A e C, respectivamente). Entretanto a análise da expressão de RhoA (figura 22E) apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo controle e o grupo LPS, embora não tenhamos observado ação da cianidina nesses parâmetros avaliados.

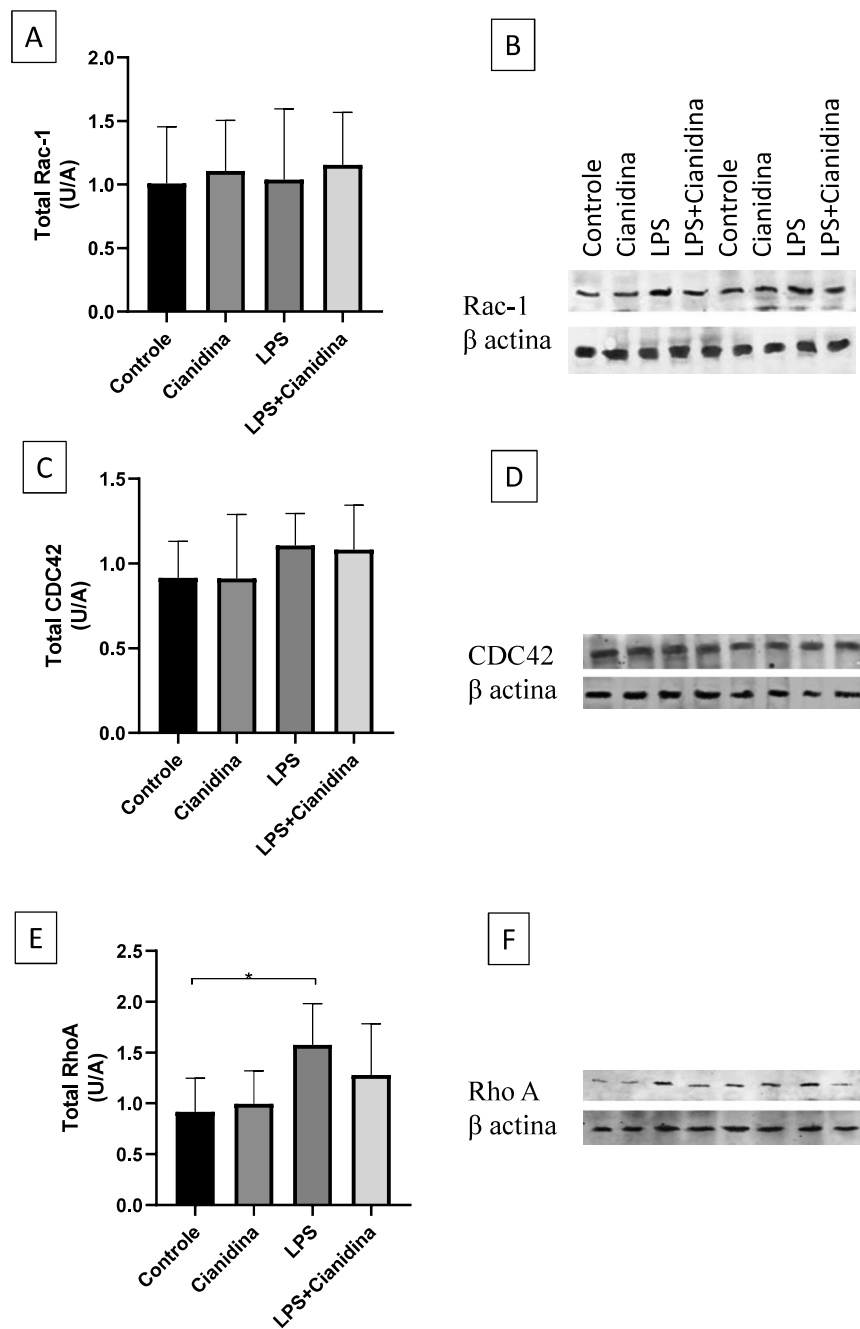


Figura 22 – Quantificação da expressão de Rac-1 (A e B), CDC42 (C e D) e RhoA (E e F) nas células C1498 tratadas com e sem 50 μ M de cianidina e estimuladas ou não com LPS (n=6). Foto representativa das análises das membranas de Western Blot (B, D e E). Resultado representativo de 6 ensaios independentes. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média. * representa diferença estatística significativa para p-valor < 0,05.

5.6 Efeito da cianidina 3 glicosídeo sobre a migração de células C1498

Para avaliar a capacidade da cianidina modular a migração celular as células C1498 foram cultivadas na presença de 50 μ M de C3Ge estimuladas com LPS ou fMLP. A figura

23 ilustra os resultados obtidos, onde não observamos alteração na migração relativa das células quando estimuladas apenas com LPS, independente do tratamento com cianidina. No entanto, quando as células foram estimuladas com fMLP, observamos aumento da taxa de migração celular e que a cianidina foi capaz de atenuar este aumento.

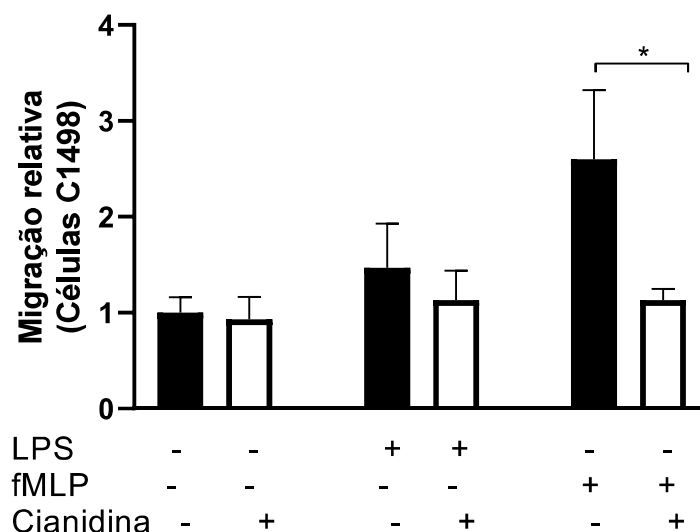


Figura 23 - Efeitos da cianidina 3 glicosídeo sobre a capacidade de migração de células C1498 e estimuladas ou não com LPS ou fMLP. Resultado representativo de 4 ensaios independentes. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média. * representa diferença estatística significativa para p-valor $< 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Modificações dietéticas e no estilo de vida têm sido descritas como principais estratégias para diminuir o risco de doenças cardiovasculares (DCV), principal causa de morte no mundo. Grande parte desses estudos avaliam a associação entre nutrientes específicos e o risco de DCV. No entanto, nutrientes não são consumidos isoladamente, mas em combinações que podem modificar a ação em cada indivíduo (SHAN et al, 2020).

Historicamente temos acompanhado uma mudança das diretrizes alimentares que vêm tirando o foco dos nutrientes e enfatizando o padrão alimentar como potencial promotor de saúde. Grandes coortes relataram a associação inversa entre dieta saudável e o risco de DCV e algumas modificações são pontuadas como essenciais para uma alimentação saudável em determinados grupos populacionais (SHAN et al, 2020). Maior consumo de alimentos saudáveis e limitada ingestão de alimentos não saudáveis, são hábitos intrínsecos de regiões como o mediterrâneo e são projetados para redução do risco de doenças como hipertensão, conhecida como dieta DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*) e para diminuir o risco de neurodegeneração, como a dieta MIND (CENA e CALDER, 2020).

É consenso que um padrão alimentar com maior consumo de frutas e vegetais frescos, grãos integrais, sementes e oleaginosas e menor consumo de alimentos de origem animal especialmente as carnes gordurosas e processadas, reduzem o risco de doenças crônicas não transmissíveis, doenças cardiovasculares e câncer (SHAN et al, 2020; CENA e CALDER, 2020; BRASIL, 2014; USDA, 2015).

Estudos apoiam que os benefícios das frutas e vegetais podem ter origem em compostos bioativos, os flavonoides, em especial a subclasse das antocianinas (CASSIDY, 2017). Estudos epidemiológicos, *in vitro* e *in vivo* demonstraram relação entre o consumo de antocianinas e atividade anti-obesogênica, anti-inflamatória e a melhora dos marcadores de risco cardiovascular (CLARO et al, 2015; BILLINGSLEY et al, 2018; WALLACE et al, 2016)

As antocianinas são flavonóides, pigmentos polifenólicos solúveis em água da dieta, responsáveis pela pigmentação de alimentos como ameixas pretas, amoras, mirtilos, uvas, laranja sanguínea, o arroz vermelho e o preto. Fatores ambientais como temperatura, luz e pH podem alterar os níveis de antocianina dos alimentos. O consumo diário varia com a região, clima e estilo de vida, como demonstrado pelo EPIC (*European Prospective Investigation into*

Cancer and Nutrition) após coletar dados de 27 centros em 10 países europeus. Neste estudo, a Itália foi o maior consumidor de antocianinas (ZAMORA-ROS et al, 2011).

Na revisão de YILDIZ et al. (2021) a interação entre as antocianinas e a obesidade se apresenta de quatro diferentes formas: *(i)* inibição da lipase pancreática: estudos mostraram que o consumo de antocianinas inibe a ação da lipase, diminuindo a absorção da gordura da dieta, diminuindo o risco de obesidade; *(ii)* regulação da lipólise e lipogênese – regulação no perfil da composição de gordura corporal; *(iii)* ativação da proteína AMPK – enzima que aumenta o gasto energético estimulando a oxidação de ácidos graxos e a biogênese mitocondrial – inibe o metabolismo lipídico, previne a síntese de triglicerídeos, aumenta a síntese de adiponectina e leptina; *(iv)* no controle de hormônios da digestão (leptina, insulina, grelina, colecistoquinina, GIP e GLP-1) que são responsáveis pela fome e saciedade. Além disso, os autores relataram um efeito indireto na diminuição do risco de obesidade pelo consumo de antocianinas por meio de um efeito prebiótico. Assim, um efeito sinérgico de todas essas atividades pode justificar a relação feita entre o consumo de alimentos fontes de antocianinas e a saúde.

Interações entre o consumo de antocianinas, o metabolismo lipídico e seus resultados na saúde cardiovascular são alvos de diversos estudos *in vitro*, em ensaios clínicos e em testes com animais. Nijveldt et al. (2001) e Stringheta et al. (2010) já relataram que seu consumo estaria associado à inibição da oxidação do LDL, à diminuição da agregação plaquetária e à melhora do estado inflamatório.

No estudo de Gonçalves e César (2013) com pacientes diagnosticados com hepatite C crônica, após a suplementação de 500 ml de suco de laranja vermelha por 14 dias, também não foi observado alteração no peso e na porcentagem de gordura corporal total, mas houve uma redução significativa na circunferência da cintura. Além disso, eles observaram redução no colesterol total, LDL, TG e PCR, bem como nas enzimas hepáticas ALT, AST e GamaGT para os indivíduos que tinham níveis alterados antes da suplementação, mostrando um potencial efeito coadjuvante do suco no tratamento da doença.

Aviram et al. (2004) investigaram o efeito do suco de romã (rico em taninos e antocianinas) em pacientes com aterosclerose carotídea por 3 anos. Após um ano, observaram uma redução significativa na espessura da camada íntima média da carótida, na pressão sistólica e na oxidação do LDL. Não houve diferença significativa no HDL, LDL, colesterol total e

glicemia e alguns pacientes apresentaram um aumento de TG (16%) e VLDL, porém ainda dentro dos parâmetros de referência. Após 3 anos, os resultados não demonstraram tantas alterações como no primeiro ano.

Wallace et al. (2016) fizeram uma revisão sistemática sobre as antocianinas e os marcadores de doença cardiovascular. Em relação aos triglicerídeos, encontraram 9 estudos que compararam a suplementação com antocianinas e a diminuição da trigliceridemia e, apenas 2 foram estatisticamente significativos, ambos eram pacientes com hipertrigliceridemia. Da mesma forma, a maioria dos estudos que mostraram diminuição nos níveis de LDL ou aumento do HDL foi conduzida em pacientes com dislipidemia.

Azzini et al. (2017) realizaram uma intervenção mais prolongada do que no presente estudo, 12 semanas, com 500ml de suco de laranja vermelha, sendo 250ml, 2 vezes ao dia, em mulheres em sobrepeso e obesidade e também não conseguiram observar alterações na composição corporal, na resistência à insulina e nos parâmetros bioquímicos como LDL, HDL, TG, colesterol total, vitaminas A, C e E.

Santana et al. (2022) suplementaram mulheres obesas com resistência à insulina por 15 dias, com 400ml por dia de laranja Pera e laranja Moro com intervalo de 40 dias entre uma e outra intervenção. Eles observaram que as voluntárias apresentavam alterações na microbiota que foi modulada pela ingestão dos dois sucos. O consumo também teve uma ação positiva nos lipídeos plasmáticos e nos biomarcadores de estresse oxidativo nestas mulheres.

Karlsen et al. (2007) suplementaram 118 indivíduos saudáveis com 300mg de antocianinas em cápsulas por 3 semanas e avaliaram marcadores de inflamação, comparando com o grupo placebo. Comparado com o *baseline* os pacientes tiveram redução significativa das concentrações plasmáticas de interleucinas (IL-8 e IFN α), bem como nas interleucinas IL-4 e IL-13 embora não tenha sido estatisticamente significativo. Em paralelo, fizeram um experimento *in vitro* com monócitos e observaram a inibição da ativação do NF κ B após incubar com antocianina, contudo também não encontraram diferença significativa na PCR e nos lipídios plasmáticos.

Em muitos estudos a supressão de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão foi associada à inibição da ativação do NF κ B (WALLACE et al, 2016;

TSAKIROGLOU et al, 2019). Porém no presente estudo, *in vivo*, não observamos alteração na expressão de NFκB.

Li et al (2019) também descreveram os potentes efeitos das antocianinas na saúde e seus mecanismos moleculares. Enfatizaram a sua ação anti-carcinogênica, anti-inflamatória, neuroprotetora, na diminuição do risco de doenças cardiovasculares, por agir no metabolismo dos lipídeos, melhorar a resistência à insulina e o metabolismo dos carboidratos, proporcionando também atividade antidiabetes e antiobesidade. Várias vias de sinalização estão incluídas nesses benefícios, como a MAPK, NFκB, AMPK e Wnt/b-catenina, além de processos como ciclo celular, apoptose, bioquímico e metabólico. Todos são potenciais alvos de estratégias terapêuticas. No entanto, segundo os autores, a atividade biológica dos metabólitos de antocianinas ainda precisa ser mais bem elucidada, visto que são absorvidas e transportadas em humanos como metabólitos. A baixa biodisponibilidade das antocianinas parece ser um obstáculo importante para se alcançar os resultados esperados e abordagens em melhorá-la parece ser promissor, como alguns estudos sugerem o uso da nanotecnologia.

Yildiz et al (2021) consideram que duas definições são importantes quanto se deseja estudar a ação das antocianinas no corpo: biodisponibilidade e bioacessibilidade. Segundo eles, a biodisponibilidade é um termo que pode ser expresso como a quantidade antioxidante com impacto biológico, disponível no sangue e na urina, após a absorção intestinal. Já a bioacessibilidade é uma medida que resulta de estudos *in vitro* que mostra o impacto potencial dos antioxidantes contra as doenças. Tanto uma quanto a outra, para provocar mudanças corporais dependem de diversos fatores, como a natureza do composto estudado, a matriz alimentar, interação com compostos, quantidade consumida, fatores biológicos relacionados ao hospedeiro, fatores que afetam sua absorção e as condições intestinais.

Segundo Unamuno et al. (2018), inúmeras pesquisas ligam a inflamação com doenças metabólicas se concentrando no sistema imunológico inato. Esse sistema compreende células de linhagem mielóide sendo monócitos e macrófagos as mais representativas. Outras células também estão envolvidas na infiltração/ inflamação do tecido adiposo, principalmente abdominal e dentre elas os neutrófilos, associadas à inflamação crônica e resistência à insulina.

A função imune adaptativa por meio dos linfócitos T e B, juntamente com os macrófagos estão presentes ao redor dos adipócitos e a ativação dos macrófagos por essas células foi descrita. Células T CD4⁺ e T CD8⁺ constituem a maioria dos linfócitos T no tecido

adiposo, sendo classificadas como T helper 1 e 2 e em um subgrupo T helper 17 e T regulador (Treg). Th1 e Th17 estimulam a produção de $IFN\gamma$ e IL17 que ativam macrófagos (M1) pró-inflamatórios e estes liberam IL6 e $TNF\alpha$ (UNAMUNO et al, 2018).

O aumento do peso em mulheres foi associado a maiores contagens de $CD4^+$ e $CD8^+$ (WOMACK, et al, 2007). A infiltração de células T $CD8^+$ é considerado um evento inicial durante o desenvolvimento da obesidade, tem papel como mediador de disfunção metabólica sistêmica, além de permitir o recrutamento e diferenciação dos macrófagos (NISHIMURA et al, 2009).

Os sinais que regulam o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo têm sido estudados e a secreção de MCP-1 e a ativação de padrão de receptores de reconhecimento (PRR) têm sido propostos. O CD14 junto com o TLR4 e MD-2 forma um complexo multireceptor que reconhece LPS na membrana da célula, é um PRR que também favorece a produção de citocinas dependente de $NF\kappa B$ (WU et al, 2019; ZANONI I. e GRANUCCI F., 2013).

Em um estudo *in vitro* com células de esplenócitos de modelo de camundongos com diabetes mellitus, tratadas com extrato de arroz preto, que é rico em antocianina, especialmente C3G, os autores observaram atividade anti-inflamatória pela diminuição da atividade do $NF\kappa B$ em células T $CD4^+$, $CD8^+$, diminuição da produção de $TNF-\alpha$ por células T $CD4^+$ e diminuição da produção de IL-6 e $IFN-\gamma$ por macrófagos. A via $NF\kappa B$ é considerada inflamatória porque ela promove a expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (HARTATI et al. 2017).

Panchal et al. (2022) descreveu, resumidamente, os potenciais efeitos das antocianinas: influência na microbiota intestinal, diminuição do estresse oxidativo, diminuição da inflamação e aumento do neuropeptídeo IGF1, que tem um papel na maturação e desenvolvimento do cérebro. Segundo os autores, existem muitos mecanismos pelos quais as antocianinas regulam a inflamação e a inibição da via $NF\kappa B$ é um deles. Como demonstraram Capetini et al. (2023) ao observar que o consumo de 500ml de suco de laranja Moro induziu à menor expressão da proteína $NF\kappa B$ em células mononucleares, de mulheres em sobrepeso. Além de modular a expressão de miRNAs plasmáticos relacionados ao controle da expressão das proteínas das vias de sinalização MAPK e $NF\kappa B$, podendo fazer parte de um controle precoce da via de sinalização inflamatória.

No presente estudo, *in vivo*, não foi observado diferenças na expressão de CD4⁺, CD8⁺, CD14, CD11 e CD18. Da mesma forma, a expressão do NFκB total e fosforilado, STAT 3 total e fosforilado, CDC 42 e Rho não teve alteração significativa após a ingestão do suco.

Em contrapartida, resultados *in vitro* deste estudo corroboram com achados anteriores, onde após sofrerem um estímulo com LPS, que leva a uma condição de inflamação caracterizada pelo aumento da expressão das proteínas de inflamação NFκB e STAT 3, a presença de C3G levou a uma diminuição significativa da expressão das citocinas IL-6, IL-8, TNF-α, IL-10 e CCL2. Semelhante a Hartati et al. (2017), cujas respostas só foram observadas nas células em condições inflamatórias e as concentrações das interleucinas foram significativamente diminuídas, também não retornando à concentração inicial das células controle, sem estímulo inflamatório.

Tan et al. (2021) também demonstraram que um complexo contendo C3G e pectina de *berries* é capaz de provocar efeitos positivos em células Caco-2 induzidas por LPS, sendo um destes efeitos a redução na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), pela redução da expressão de IL-1β, TNF-α e IL-8, bem como a diminuição da expressão de mRNA da IL-10.

Comportamento semelhante foi visto neste estudo, quando analisada, principalmente, a expressão de NFκB, onde a presença de C3G levou a uma diminuição significativa de sua fosforilação, ou seja, a atividade induzida pelo LPS foi diminuída pela presença da C3G. A via NFκB tem um importante papel em desencadear e regular processos inflamatórios. É extensivo o número de pesquisas buscando esclarecer a ação dos compostos bioativos e sua regulação. O fator de transcrição NFκB existe em um estado inativo no citosol por ligação do IκB, após a sua ativação e translocação para o núcleo, induz a expressão de genes envolvidos nos processos inflamatórios, levando a produção de citocinas e enzimas inflamatórias (LI et al., 2017). Corroborando com nossos resultados, Taverniti et al. (2014) utilizaram extratos ricos de antocianinas de mirtilo em células Caco-2 induzidas com IL-1β e demonstraram a redução da expressão de NFκB. De igual modo, Miyake et al. (2012) em um modelo de rato com inflamação na retina, também encontrou diminuição da expressão de NFκB fosforilado, STAT-3 e IL-6 após o tratamento com extrato de antocianinas.

Quando analisadas as proteínas de migração celular Rho, Rac e CDC42, nas células tratadas com C3G e LPS, não foram encontradas diferenças significativas. Contrapondo-se aos

resultados encontrados por Tsakiroglou et al. (2019), que ao expor células HUVECs a antocianinas, documentaram um aumento na expressão de Rac1 e RhoA após 2 horas, que foi significativamente reduzida em concentrações maiores que 60 µg/ml, mostrando a sua capacidade de modular células endoteliais.

As células entram em estresse por diversas alterações, entre elas, por formação de espécies reativas de oxigênio, que impulsionam o remodelamento do citoesqueleto, que possui diversos mecanismos de regulação, como a família das proteínas GTPases (Rho, RAC e CDC42) (FONSECA, 2017). Neste ambiente a C3G pode controlar significativamente a migração celular, como observado em nossos resultados, principalmente quando desafiadas com fMLP.

As respostas imunológicas eficientes são dependentes da capacidade da célula migrar. Esse processo é regulado por quimiocinas, integrinas, moléculas de adesão, como já descrito anteriormente. No entanto, a migração celular também é essencial no processo de metástases de células malignas de tumor primário. As proteínas da família Rho estão envolvidas na migração de células e têm um potencial papel nas metástases. Su et al. (2018) demonstraram que as antocianinas podem atenuar o processo de metástase de melanomas *in vivo* e *in vitro*, sendo um dos caminhos a supressão da expressão de proteínas RhoA, Ras, Rac1, CDC42 e a supressão da ativação do NFκB.

De forma geral, há muitos benefícios no consumo de antocianinas já descritos, como sua capacidade antioxidante, capacidade de prevenir e até ser coadjuvante no tratamento de doenças como Alzheimer, diabetes, disfunção endotelial, doenças cardiovasculares e câncer. No entanto, um aprofundamento do conhecimento dos seus mecanismos de ação e de seus metabólitos, ainda se faz necessário para entender o seu potencial para prevenir doenças e o seu potencial terapêutico (LI et al. 2017; SALEHI et al. 2020).

6. CONCLUSÃO

Nossos dados *in vivo* não apoiam as evidências que o consumo do suco de laranja Moro possa atenuar a inflamação sistêmica decorrente do excesso de peso em mulheres. No entanto, *in vitro*, a C3G se mostra capaz de modular a inflamação, pelo controle da expressão da proteína NFκB após estímulo com LPS. E da mesma forma, é capaz de modular a migração celular após estímulo com quimioatraente. Estes achados podem descrever alguns dos mecanismos pelos quais as antocianinas são consideradas anti-inflamatórias, sugerindo novas abordagens que possam ser promissoras em seu uso como um potencial agente terapêutico.

REFERÊNCIAS

AVIRAM M. et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *CI Nutr* 23, 423-433, 2004.

AZZINI E., VENNERIA D., CIARAPICA M. S. et al. Effect of Red Orange Juice Consumption on Body Composition and Nutritional Status in Overweight/Obese Female: A Pilot Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2017, Article ID 1672567, 2017.

BILLINGSLEY H. E., CARBONE S., LAVIE C.J. Dietary Fats and Chronic Noncommunicable Diseases. *Nutrients* v.10, p.1385 -1401, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Vegetal.2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal>>. Acesso em 20 nov 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2021**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**: promovendo a alimentação saudável. 2014.

BELTRÁN-CARRILLO V. J., MEGÍAS A., GONZÁLEZ-CUTRE D., JIMÉNEZ-LOAISA A. Elements behind sedentary lifestyles and unhealthy eating habits in individuals with severe obesity. *Int J Qualitative Studies on Health and Well-being*. v. 15, 2056967, 2022

CALDER, P.C.; AHLUWALIA, N.; BROUNS, F.; BUETLER, T.; CLEMENT, K.; CUNNINGHAM, K.; *et al.* Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *British Journal of Nutrition*, p. 5-78, 2011.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007.

CAPETINI V. C., QUINTANILHA B. J., OLIVEIRA D. C. et al. Blood orange juice intake modulates plasma and PBMC microRNA expression. In overweight and insulin-resistant women: impact on MAPK and NFκB signaling pathways. *Journal of Nutritional Biochemistry*. v. 112, no. 109240, 2023.

CARDOSO L M, LEITE J P V, PELUZIO M C G. Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, Vol. 40 (1), 116-138, 2011

CASSIDY A. Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine* p. 1 – 7, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2017.05.002>

CENA H., CALDER P.C. Defining a Healthy Diet: Evidence for the Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. *Nutrients* 2020, 12, 334; doi:10.3390/nu12020334

CLARO R.M., SANTOS M.A.S., OLIVEIRA T.P., PEREIRA C.A., SZWARCOWALD C.L., MALTA D.C. Unhealthy food consumption related to chronic noncommunicable. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 24(2): 257-265, abr-jun 2015.

DACIE, J. V., LEWIS, S. M. **Practical haematology**. 8ed., Churchill Livingstone, p.57-8, 1995

DOBROVOLSKAIA, M.A.; VOGEL, S.N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. **Microbes and Infection**, v.4, p.903-914, 2002.

EKLUND, K.K.; NIEMI, K.; KOVANEN, P.T. Immune functions of serum amyloid A. **Critical Reviews in Immunology**, v. 32, n. 4, p. 335-48, 2012.

ERRIDGE, C.; ATTINA, T.; SPICKETT, C.M.; WEBB, D.J. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1286-92, nov. 2007.

FILIPPI, MARIE-DOMINIQUE. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. **Adv Immunol**. 129: 25–53, 2016.

FONSECA M. P. Proteômica abrangente de alta resolução na análise de neutrófilos humanos ativados pelo *peptideo formyl Methyl Leucyl Phenylalanine* (fMLP). Tese de Doutorado em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, 2017. Disponível em https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/24656/1/2017_MicaellaPereiradaFonseca.pdf. Acesso em 05/04/2023.

FOTAKIS G., TIMBRELL J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cádmium chloride. **Toxicology Letters**. v. 160, Issue 2, 5, p. 171-177, January 2006.

FRANCISCHETTI I.; MORENO J.B.; SCHOLZ M.; YOSIDA W.B. Os leucócitos e a resposta inflamatória sistêmica na lesão de isquemia-perfusão. **Rev Bras Cir Cardiovascular**, v. 25 n.4, p.575-584, 2010.

FRANCISCHI, R.P.P, PEREIRA L.O., FREITAS, C.S., KLOPPER M., SANTOS R. C., VIEIRA, P. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Rev Nutr Campinas** v 13(1): 17-28, jan./abr., 2000.

GALLAND, L. Diet and inflammation. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 25, n. 6, p. 634-40, dec. 2010.

GE Q., BRICHARD S., YI XU., LI Q. microRNAs as a new mechanism regulating adipose tissue inflammation in obesity and as a novel therapeutic strategy in the metabolic syndrome. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

GOMES B. B., JESUS L. K., SCHMIELE M., RIGOLON T. C. B. Efeitos das antocianinas na saúde: uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, e6411427069, 2022

GONÇALVES R.D.; CESAR T.B. Consumo regular de suco de laranja vermelha em portadores de hepatite c crônica. (2013). Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, 2013. Disponível em https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88688/goncalves_dr_me_arafcf.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em 20 abr. 2020.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 415-445, 2011. ISSN 0732-0582.

GREENBERG, A.S.; OBIN, M.S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 2, p. 461-5, 2006.

GROSSO, G.; GALVANO, F.; MISTRETTA, A.; MARVENTANO, S.; et. al. Red Orange: Experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2013, p. 157240, 2013.

HARTATI F. K., WIDJANARLO S. B., WIDYANINGSIH T. D., RIFA M. Anti-inflammatory evaluation of black rice extract inhibits TNF- α , IFN- γ and cytokines produced by immunocompetent cells. **Food and Agricultural Immunology**. v.26, no.6, p. 1116-1125.

HUTTENLOCHER A., SANDBORG R.R., HORWITZ A.F. Adhesion in cell migration. **Curr Opin Cell Biol**. v 7(5), 697-706, Oct, 1995.

JUSTUS C.R.; LEFFER N.; RUIZ-ECHEVARRIA M.; YANG L. V. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. **J Vis Exp**. v.88:51046, 2014.

KARALIS, K.P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E.; KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, v. 276, n. 20, p. 5747-54, 2009.

KARLSEN A. et al. Anthocyanins Inhibit Nuclear Factor- κ B Activation in Monocytes and Reduce Plasma Concentrations of Pro-inflammatory Mediators in Healthy Adults. **J Nutr** 137:1951-1954,2007.

KIMOKOTI, R.W.; MILLEN, B. Nutrition for the Prevention of Chronic Diseases. **Med Clin North Am.**, v. 100, n. 6, p. 1185-1198, 2016.

KUBES P, PAYNE D, WOODMAN RC. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in post ischemic liver microcirculation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 283(1): G139-47, Jul 2002.

KUBES P. The complexities of leukocyte recruitment. **Semin Immunol**. V 14(2):65-72, Apr 2002.

LEE B.C., LEE J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta** 1842, p. 446-462, 2014.

LEE, J.Y.; SOHN, K.H.; RHEE, S.H.; HWANG, D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 16683-16689, 2001.

LEY K. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends Mol Med**. v 9:263–268, 2003.

LEY K, ALLIETTA M, BULLARD DC, MORGAN S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. **Circ Res**. v 83, p.287–294, 1998.

LI D.; WANG P.; LUO Y.; ZHAO M.; CHEN F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57:8, 1729-1741, 2017.

LI LU, LYALL G. K., MARTINEZ-BLAZQUEZ J. A. et al Blood Orange Juice Consumption Increases Flow-Mediated Dilatation in Adults with Overweight and Obesity: A Randomized Controlled Trial. **J Nutr**. 150:2287–2294, 2020.

LOPEZ-GARCIA, E.; SCHULZE, M.B.; MEIGS, J.B.; MANSON, J.E.; RIFAI, N.; STAMPFER, M.J.; *et al*. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 3, p. 562-6, mar. 2005.

MAJOLO F M; REIS B Z. **Alimentos Funcionais e Compostos Bioativos: Avanços científicos, perspectivas e desafios**. São Paulo: ILSI Brasil. v. 9, p. 13-23, 2018.

MARTÍN J, KUSKOSKI E. M., NAVAS M. J., ASUERO A. G. **Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments**. 2017. Disponível em <https://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/antioxidant-capacity-of-anthocyanin-pigments>. Acesso em 10/02/2019.

MARTIN, K.; APPEL, C. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 2, p. 1–12, 2010.

MOHAMAD S., THIEMERMANN C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. **Front Immunol**. 11:594150, 2021

MONG P.Y, PETRULIO C., KAUFMAN H. L., WANG Q. Activation of Rho Kinase by TNF- α Is Required for JNK Activation in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells. **J Immunol** v. 180 p. 550-558, 2008.

MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. “Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome”. **Mediators of Inflammation**, vol. 2010, Article ID 289645, 10 pages, 2010.

MOREIRA, A.P.; TEXEIRA, T.F.; FERREIRA, A.B.; PELUZIO, M.C.; ALFENAS, R.C. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 801-9, sep. 2012.

MORENO J.L.P., CARPINTERO S.G., DELGADO F.G., LUCENA R.J., DELGADO C.V., DIAZ F.A. *et al.* Endotoxemia is modulated by quantity and quality of dietary fat in older adults. **Experimental Gerontology**. v.109, p. 11-125, August 2018.

MOSMANN T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J Immunol Methods**, v 65, n.1-2, p.55-63, Dec 16 1983. ISSN 1078-0998 (Print) 1078-0998.

NIJVELDT R.J., NOOD E., HOORN D.E.C., BOELEN P.G., NORREN K., LEEUWEN P.A.M. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr** v.74, p.418–25, 2001.

NISHIMURA S. *et al.* CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine**. v.15, n.8, Aug, 2019.

O'KEEFE, J.H.; GHEEWALA, N.M.; O'KEEFE, J.O. Dietary strategies for improving post- prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 3, p. 249-55, jan. 2008.

PANCHAL K. S., JOHN O. D., MATHAI M. L., BROWN L. Anthocyanins in Chronic Diseases: The Power of Purple. **Nutrients**. v. 21, p. 14, 2022.
<https://doi.org/10.3390/nu14102161>

PIGEYRE M., YAZDI F. T., KAUR Y., MEYRE D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. **Clinical Science**. v.130, p. 943–986, 2016.

QIN Y, XIA M, MA J, HAO Y T, LIU J, MOU H Y, CAO L, LING W H. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. **Am J Clin Nutr** v. 90, p. 485–92, 2009.

QUINTANILHA, Bruna Jardim. Efeito de uma refeição hiperlipídica no período pós-prandial sobre a expressão de microRNA em mulheres saudáveis. 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em:
<https://doi.org/10.11606/D.6.2018.tde-16042018-175847>. Acesso em: 12 dez. 2022.

RAFTOPOULOU M., HALL A., Cell migration: Rho GTPases lead the way. **Developmental Biology** v 265, p. 23– 32, 2004.

RAHMAN S., MATHEW S., NAIR P. *et al.* Health benefits of cyanidin-3-glucoside as a potent modulator of Nrf2-mediated oxidative stress. **Inflammopharmacology**, 2021
<https://doi.org/10.1007/s10787-021-00799-7>

RIEGER A. M., NELSON K. L., KONOWALCHUK J. D., BARREDA D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. **J Vis Exp**. 2011 Apr 24;(50):2597. doi: 10.3791/2597.

RISO P., VISIOLI F., GARDANA C. et al. Effects of Blood Orange Juice Intake on Antioxidant Bioavailability and on Different Markers Related to Oxidative Stress. **J. Agric. Food Chem.** 53, 941-947, 2005.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantã.** v.20, p.315-28, 1947

SANTANA A. A., TOBARUELA E. C., SANTOS K. G. et al. ‘Pera’ Orange and ‘Moro’ Blood Orange Juice Improves Oxidative Stress and Inflammatory Response Biomarkers and Modulates the Gut Microbiota of Individuals with Insulin Resistance and Different Obesity Classes. **Obesities.** v. 2, 389–412. <https://doi.org/10.3390/obesities2040033>, 2022.

SENGER D., PERRUZZI C., STREIT M. et al. The alpha(1) beta(1) and alpha(2) beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. **Am J Pathol.** 160(1):195-204, 2002

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

SCHURMANN G.M., BISHOP A.E., FACER P., VECCHIO M., LEE J.C., RAMPTON D.S., et al. Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory bowel disease. **Gut.** Mar; 36(3):411-8, 1995.

SHAN Z., YANPING LI, BADEN M. Y. et al. Association Between Healthy Eating Patterns and Risk of Cardiovascular Disease. **JAMA Intern Med.** 2020;180(8):1090-1100. doi:10.1001/jamainternmed.2020.2176

SLAVIN, J.L.; LLOYD, B. Health benefits of fruits and vegetables. **Adv Nutr.**, v. 3, p. 506-516, 2012.

STRINGHETA P.C., VOLP A.C.P., OLIVEIRA T.T. Corantes naturais: usos e aplicações como compostos bioativos. In: COSTA, N.M.B, ROSA C.O.B., editoras. **Alimentos Funcionais. Componentes bioativos e efeitos fisiológicos.** Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.p.243-264.

SU CHING-CHUAN, WANG CHAU-JONG, HUANG KAI-HSUN et al. Anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyx attenuate *in vitro* and *in vivo* melanoma cancer metastasis. **Journal of Functional Foods.** v. 48, p. 614-631, 2018.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n.1, p. 33-9, 2010.

TAN C., KONG Y., TONG Y. et al. Anti-apoptotic effects of high hydrostatic pressure treated cyanidin 3 glucoside and blueberry pectin complexes on lipopolysaccharide-induced inflammation in Caco-2 cells. **Journal of Functional Foods.** v.86, p. 1-12, 2021.

TAN S.Y., WENINGER W. Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. **Curr Opin Immunol.** Feb; 44:34-42, 2017

TAN J., LI Y., HOU DE-XING, WU S. The Effects and Mechanisms of Cyanidin-3-Glucoside and Its Phenolic Metabolites in Maintaining Intestinal Integrity. **Antioxidants**. 8, 479, 2019.

TAVERNITE V., FRANCASSETTI D., DEL BO C. et al. Immunomodulatory effect of a wild blueberry anthocyanin-rich extract in human Caco-2 intestinal cells. **J Agric Food Chem**. Aug 20;62(33):8346-51, 2014.

TONG L., TERGAONKAR V. Rho protein GTPases and their interactions with NF κ B: crossroads of inflammation and matrix biology. **Biosci. Rep.** / 34 / art:e00115 / doi 10.1042/BSR20140021, 2014

TRIPOLI, E.; GUARDIA, M.L.; GIAMMANCO, S.; *et al.* Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. **Food Chem.**, v. 104, p. 466-79, 2007.

TSAKIROGLOU P., WEBER J., ASHWORTH S., DEL BO C., ZACAS D. K. Phenolic and anthocyanin fractions from wild blueberries (*V. angustifolium*) differentially modulate endothelial cell migration partially through RHAA and RAC1. **J Cell Biochem**. Jan, p. 1-11, 2019.

UNAMUNO X. et al. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. **Eur J Clin Invest**. v. 48, n. 9, p. e12997, 2018.

USA. 2015 –2020 Dietary Guidelines for Americans — How to Build a Healthy Eating Pattern.

WAGNER S., FLOOD T.A., O'REILLY P., SABOURIN L.A. Association of the Ste20-like kinase (SLK) with the microtubule. Role in Rac1-mediated regulation of actin dynamics during cell adhesion and spreading. **J Biol Chem**. Oct 4;277(40):37685-92, 2000.

WALLACE T C, SLAVIN M, FRANKENFELD C L. Systematic Review of Anthocyanins and Markers of Cardiovascular Disease. **Nutrients** 2016, 8 (32):1-13.

WHO – World Health Organization - Physical status: the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO expert committee. **WHO Technical Report Series**, Geneva, 1995.

WHO – World Health Organization – Noncommunicable diseases country profiles, 2018.

WOMACK J. et al. Obesity and immune cell counts in women. **Metabolism Clinical and Experimental**. 56:998-1004, 2007.

WU Z.; ZHANG Z.; LEI Z.; LEI P.; CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**. 48:24-31, 2019.

YILDIZ E.; GULDAS M.; ELLERGEZEN P.; ACAR A.G.; GURBUZ O. Obesity-associated Pathways of Anthocyanins. **Food Sci. Technol**, Campinas, 41 (Suppl.1): 1-13, June, 2021.

ZAMORA-ROS R.; et al. Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **Br J Nutr.** Oct;106(7):1090-9, 2011.

ZANONI I.; GRANUCCI F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. **Frontiers in Cell and Infection Microbiology.** v.3, July, 2013.

ZEYDA, M.; STULNIG, T.M. Obesity, inflammation, and insulin resistance - A mini-review. **Gerontology,** v. 55, n. 4, p. 379-86, 2009.

ZHAO, Y.; HE, X.; SHI, X.; HUANG, C.; LIU, J.; ZHOU, S.; HENG, C.K. Association between serum amyloid A and obesity: a meta-analysis and systematic review. **Inflammation Research,** v. 59, n. 5, p. 323-34, mai. 2010.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: Efeito da ingestão do suco de laranja Moro sobre a migração de leucócitos em mulheres com sobrepeso. Participação da cianidina 3 glicosídeo como potencial modulador do perfil inflamatório e da migração celular

INTRODUÇÃO

Estudos científicos sugerem que o excesso de gordura corporal pode ocasionar um estado crônico inflamatório, podendo alterar o perfil lipídico e a concentração sanguínea de alguns marcadores inflamatórios. Sabe-se hoje, que a inflamação é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes e das doenças cardiovasculares. A proposta deste estudo é avaliar se o suco de laranja Moro tem a capacidade de atenuar a resposta inflamatória gerada pelo excesso de gordura corporal.

COMO É O ESTUDO?

O participante do estudo consumirá, no período de 4 semanas, 500 mL por dia de suco de laranja Moro. A quantidade total de garrafas do suco a serem consumidas durante todo o período de intervenção será fornecida aos participantes pelos pesquisadores após a assinatura deste termo. A entrega em domicílio será totalmente custeada pela pesquisa. Durante o estudo, haverá três coletas de sangue sendo a primeira antes da intervenção e as demais após 2 e 4 semanas do consumo do suco de laranja Moro. O volume de sangue coletado em cada momento será de 30 mL, o qual será utilizado para avaliar a concentração de glicose, insulina, perfil lipídico, leptina, adiponectina, lipopolissacarídeos (LPS) e seus ligantes LBP e sCD14, biomarcadores inflamatórios e estresse oxidativo, bem como avaliar, de microRNAs e proteínas envolvidos na inflamação oriundos do plasma e de leucócitos. No primeiro e último dia do protocolo do estudo, o participante deverá responder um questionário de frequência alimentar elaborado pelos pesquisadores, bem como, permitir a aferição do peso, circunferência da cintura e pressão arterial.

OUTRAS INFORMAÇÕES

O participante não terá nenhum custo por participar da pesquisa.

O único risco durante a participação deste estudo é a dor da picada da agulha para coleta do sangue. Esta picada será realizada uma única vez em cada momento. Caso o senhor

tenha algum problema em decorrência da coleta do sangue, os enfermeiros e técnicos do Centro de Saúde Escola Geraldo de Paula de Souza estarão à disposição para ajudá-lo no que for preciso. Sua participação é totalmente voluntária, podendo desistir e retirar seu consentimento a qualquer momento durante o decorrer da pesquisa.

Seus dados são secretos e sigilosos de acordo com as normas brasileiras. Os resultados desta pesquisa poderão ser publicados em revistas científicas, mas a sua identidade será preservada.

A qualquer momento o participante poderá esclarecer dúvidas por meio dos seguintes contatos:

- Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero – Investigador Principal: fone (11-3061-7850).
- Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock – Investigador Associado: fone (11-3091-3639).
- Luciene Assaf de Matos - aluna de doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP: fone (11-3091-3639)
- Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP (11-30617779) que fica na Av. Dr. Arnaldo, 715 - São Paulo - SP - Brasil - CEP - 01246-904. O Horário de funcionamento do Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da USP é das 8 h às 12 h.

O Comitê de Ética em Pesquisa é um comitê interdisciplinar, constituído por profissionais de ambos os sexos, além de pelo menos um representante da comunidade. Este comitê tem como objetivo proteger o bem-estar de indivíduos que participam de pesquisas científicas, bem como orientar e regulamentar pesquisas e atividades práticas que envolvam intervenções com seres humanos, de modo a garantir e resguardar a integridade e os direitos dos sujeitos da pesquisa.

COMO PARTICIPAR?

A participação neste estudo é inteiramente voluntária. Para isso o participante deve assinar esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, bem como o responsável por este estudo. As assinaturas devem ser realizadas em duas cópias. Uma fica com o participante e a outra fica com o responsável pela pesquisa.

Declaro que li o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo e aceito participar voluntariamente desse estudo. Ainda, declaro que recebi todos os esclarecimentos necessários para compreender o estudo e tive tempo suficiente para decidir minha participação no estudo.

Nome Completo do Participante:

Assinatura do Participante:

Data: ____ / ____ / ____

Investigador:

Assinatura do Investigador:

Data: ____ / ____ / ____



RESEARCH PAPER

Blood orange juice intake modulates plasma and PBMC microRNA expression in overweight and insulin-resistant women: impact on MAPK and NFκB signaling pathways

Vinicius Cooper Capetini^{a,b}, Bruna J. Quintanilha^{a,b}, Dalila Cunha de Oliveira^c,
Alessandra Harumi Nishioka^{d,b}, Luciene Assaf de Matos^c, Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira^e,
Frederico Moraes Ferreira^f, Geni Rodrigues Sampaio^a, Neuza Mariko Aymoto Hassimotto^{d,b},
Franco Maria Lajolo^{d,b}, Ricardo Ambrósio Fock^c, Marcelo Macedo Rogero^{a,b,g}

^a Department of Nutrition, School of Public Health, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Food Research Center (FoRC), CEPID-FAPESP (Research Innovation and Dissemination Centers São Paulo Research Foundation), São Paulo, Brazil

^c Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Department of Food Science and Experimental Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^e Morphology Department, Institute of Biological Sciences of the Federal University of Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^f LIM50, Division of Pathology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

Received 20 January 2022; received in revised form 28 July 2022; accepted 12 October 2022.

Abstract

Blood orange consumption presents potential health benefits and may modulate epigenetic mechanisms such as microRNAs (miRNAs) expression. MiRNAs are non-coding RNAs responsible for post-transcriptional gene regulation, and these molecules can also be used as biomarkers in body fluids. This study was designed to investigate the effect of chronic blood orange juice (BOJ) intake on the inflammatory response and miRNA expression profile in plasma and blood cells in overweight women. The study cohort was comprised of twenty women aged 18–40 years old, diagnosed as overweight, who consumed 500 mL/d of BOJ for four weeks. Clinical data were collected at baseline and after 4 weeks of juice consumption, e.g., anthropometric and hemodynamic parameters, food intake, blood cell count, and metabolic and inflammatory biomarkers. BOJ samples were analyzed and characterized. Additionally, plasma and blood cells were also collected for miRNA expression profiling and evaluation of the expression of genes and proteins in the MAPK and NFκB signaling pathways. BOJ intake increased the expression of miR-144-3p in plasma and the expression of miR-424-5p, miR-144-3p, and miR-130b-3p in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Conversely, the beverage intake decreased the expression of let-7f-5p and miR-126-3p in PBMC. Computational analyses identified different targets of the dysregulated miRNA on inflammatory pathways. Furthermore, BOJ intake increased vitamin C consumption and the pJNK/JNK ratio and decreased the expression of *IL6* mRNA and NFκB protein. These results demonstrate that BOJ regulates the expression of genes involved in the inflammatory process and decreases NFκB-protein expression in PBMC.

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: microRNA; blood orange; inflammation; overweight; flavonoids.

1. Introduction

Overweight affects more than 1.9 billion adults worldwide [1]. It is estimated that 2.8 million people die each year from conditions that stem from overweight and obesity, including non-communicable diseases (NCD), such as cardiovascular diseases (CVD) and type 2 diabetes (T2D) [2]. A dietary pattern high in ultra-processed foods, saturated fatty acids (SFA), and refined carbohydrates, such as those found in the Western diet, is mainly re-

sponsible for triggering excess weight and its related comorbidities [3–5].

Hypercaloric diets are related to gut microbiota dysbiosis and the increase of gut permeability to lipopolysaccharides (LPS), large inflammatory molecules found in the outer membrane of Gram-negative bacteria [6,7]. Through its interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4), LPS can activate mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor kappa B (NFκB) signaling pathways, which increase the expression of the inflammatory cytokines and impairs insulin signaling [8–10]. Conversely, SFA can also induce TLR4-independent activation of MAPK and NFκB pathways components by endoplasmic reticulum stress and accumulation of reactive oxygen species (ROS) [8,11–13]. In addition, adipocyte hy-

* Corresponding author at: Marcelo Macedo Rogero, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

E-mail address: mmrogero@usp.br (M.M. Rogero).