



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Maria Machado de Abreu

**Efeito do tratamento antiobesidade com *Citrus aurantium* ou
sinefrina sobre o metabolismo dos hormônios tireoidianos de
camundongos adolescentes obesos no modelo de programação
por redução de ninhada**

Rio de Janeiro

2023

Maria Machado de Abreu

Efeito do tratamento antiobesidade com Citrus aurantium ou sinefrina sobre o metabolismo de hormônios tireoidianos de camundongos adolescentes obesos no modelo de programação por redução de ninhada

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A162 Abreu, Maria Machado.
 Efeito do tratamento antiobesidade com *Citrus aurantium* ou sinefrina na função tireoidiana de camundongos adolescentes obesos no modelo de programação por redução do tamanho da ninhada / Maria Machado Abreu. – 2023.
 80 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira
Coorientador: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Citrus. 2. Obesidade – Terapia – Teses. 3. Sinefrina – Uso terapêutico. 4. Hormônios tireóideos – Fisiologia. I. Oliveira, Elaine de. II. Silva, Patrícia Cristina Lisboa da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 615.83

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Maria Machado de Abreu

Efeito do tratamento antiobesidade com *Citrus aurantium* ou sinefrina sobre o metabolismo de hormônios tireoidianos camundongos adolescentes obesos no modelo de programação por redução do tamanho da ninhada

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em: 18 de outubro de 2023

Orientadora: Prof.^a Dra. Elaine de Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Fernanda Torres Quitete
Centro Universitário Serra dos Órgãos

Prof.^a Dra. Luana Lopes de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes- UERJ

Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes- UERJ

Rio de Janeiro

2023

Às minhas Marias, à de hoje e às de antes.

Maria Alice
Maria Machado
Maria Célia
Maria Eunice

AGRADECIMENTOS

Em primazia agradeço à Deus, razão de todas as coisas, socorro presente na hora da angústia, provedor e acima de tudo fiel. O Senhor me deu forças para superar todas as adversidades que surgiram em meu caminho e seu que seus sonhos para mim são bem maiores e melhores do que posso imaginar.

A minha filha, Maria Alice Machado de Abreu Vasconcelos, mesmo chegando de surpresa e no meio de tanta coisa acontecendo eu senti o seu amor desde o primeiro dia, você ilumina a minha vida e traz sentido para ela. Obrigada, “periquitinha”, você me salvou!!!

Ao meu esposo, Fellipe dos Santos Vasconcelos, por todo apoio e incentivo, por ser porto seguro quando preciso e me acolher em tempos difíceis. Obrigada por me fazer acreditar e por não me deixar afundar nas vezes me perdi. Obrigada pela nossa família, pelo pai que é e por todos os dias dividirmos a vida juntos!

A minha mãe, Silvia Denise Machado de Brito Abreu, por todo apoio financeiro e emocional, eu sei o quanto você trabalha para ver nosso futuro brilhar, tudo que tenho hoje é fruto da semente que você plantou anos atrás e que cuidou com tanto carinho. Eu quero ser uma mãe e avó incrível como você. Muito obrigada, eu tenho orgulho de ser sua filha!

Ao meu pai, Rogério Santos de Abreu, por todo apoio e por todos os ensinamentos sobre a vida, por me ensinar a me cuidar e me defender, por ser um avô incrível e amoroso.

A minha avó, Maria Machado de Brito, por tudo que sou, por me ajudar a chegar até aqui, por sempre acreditar em mim e me dizer que eu consigo. Como sinto sua falta, vizinha.

A minha irmã, Milena Machado de Abreu por todo carinho e bobagens, frases sem sentido, rindo e falando besteiras, por todo apoio de sempre, por ser uma Dinda incrível e amar a minha filha como se fosse sua!

A toda a minha família, de perto ou longe, que sempre me apoia e me impulsiona quando preciso!

Aos meus amigos de infância, por fazerem parte da minha vida há tantos anos reforçando que a amizade não se trata de conviver todos os dias, mas estar ali quando importa.

Em especial a Andressa Guimarães, que sempre se dispõe a estar comigo mesmo depois de todos esses anos e que tanto me ajudou no desenvolvimento do meu mestrado, obrigada pela paciência, pelo conhecimento compartilhado, pelas horas de PCR e bancada e pela nossa amizade.

A equipe do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento (LFND), por terem me recebido e me acolhido como parte da equipe, obrigada por toda ajuda, conversas e convivência.

As minhas orientadoras, Elaine de Oliveira e Patrícia Lisboa, por me oferecerem a chance de realizar um grande projeto e por sempre acreditarem no meu potencial. Elaine, obrigada por todo apoio durante minha gestação, período de licença e pós, também por nossa troca acadêmica e materna, isso fez e faz toda diferença.

Por fim, agradeço a todos aqueles que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para minha caminhada até aqui! Renúncias sempre são necessárias, mas ao final de cada etapa, o sucesso alcançado mostra o quanto vale a pena!

,

RESUMO

ABREU, Maria Machado. **Efeito do tratamento antiobesidade com *Citrus aurantium* ou sinefrina na função tireoidiana de camundongos adolescentes obesos no modelo de programação por redução do tamanho da ninhada.** 80 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A obesidade é uma doença complexa e crônica, atualmente reconhecida como uma epidemia global. Sua prevalência crescente é atribuída a fatores como mudanças no estilo de vida, influências genéticas e, há ainda uma importante contribuição de alterações epigenéticas precoces, como a superalimentação pós-natal, que predispõe indivíduos à obesidade e a distúrbios associados. A busca por tratamentos eficazes para a obesidade levou a um foco na fitoterapia, como exemplo o uso de *Citrus aurantium* L., pertencente ao gênero Citrus (Rutaceae). O extrato da casca do fruto imaturo contém aminas adrenérgicas, sendo a sinefrina o principal componente ativo, conhecido por suas propriedades adrenérgicas e lipolíticas. Descobertas recentes revelaram que o *Citrus aurantium* L. melhorou o perfil metabólico de camundongos programados para supernutrição, mas simultaneamente elevou as concentrações de hormônios tireoidianos. Neste estudo pioneiro, investigamos o impacto do tratamento com *Citrus aurantium* L. e/ou sinefrina no metabolismo tireoidiano e suas repercussões no coração em camundongos adolescentes obesos programados por superalimentação pós-natal precoce. Três dias após o nascimento, camundongos suíços machos foram divididos em dois grupos: um grupo superalimentado (SL) com uma ninhada reduzida para 3 filhotes para induzir superalimentação pós-natal e um grupo controle (NL) com uma ninhada de 9 filhotes. Aos 30 dias de idade, os camundongos SL e NL foram submetidos a um tratamento de 19 dias com *Citrus aurantium* L., padronizado em 6% de sinefrina (SL-C6%) ou 30% de sinefrina (SL-C30%), sinefrina isolada (SL-Syn) ou veículo (NL). Os resultados indicam uma correlação entre o efeito antiobesidade de *Citrus Aurantium* L. ou sinefrina e a função tireoidiana, manifestada pelo aumento nos níveis séricos de T3 (SL-CA6%, +84,03%; SL-CA30%, +105,19%, e SL-Syn +136,5%) e T4 (SL, +201,89%; SL-CA6%, +344,90%; SL-CA30%, +335,36%, e SL-Syn, +453,92%), juntamente com aprimoramento na funcionalidade do TAM, com aumento da expressão do receptor TRH α . Embora não tenha ocorrido redução no peso corporal, o tratamento efetivamente limitou o ganho de massa corporal e a adiposidade no período do tratamento (SL-CA6%, -21,49%; SL-CA30%, -21,58%, e SL-Syn, -21,67%). Embora não tenham sido observadas diferenças na frequência cardíaca dos animais tratados, a sinefrina isolada levou a um aumento notável (+156,07%) na expressão do gene α -MHC, associado a efeitos adversos no coração. Nos demais grupos tratados, o provável efeito sinérgico de outros componentes do *C. aurantium* L. pode ter mitigado o desenvolvimento desse efeito induzido pela sinefrina no coração.

Palavras-chave: obesidade; programação metabólica; superalimentação pós-natal; adolescência; hormônios tireoidianos; *Citrus aurantium*; sinefrina; coração.

ABSTRACT

ABREU, Maria Machado. *Effect of Anti-Obesity Treatment with Citrus aurantium or Synephrine on Thyroid Function in Obese Adolescent Mice in the Reduced Litter Size Programming Model*. 80 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Obesity is a complex and chronic disease, now recognized as a global epidemic. Its escalating prevalence is attributed to factors such as lifestyle changes, genetic influences, and notably, early-life epigenetic factors like postnatal overfeeding, which predisposes individuals to obesity and associated disorders. The pursuit of effective obesity treatments has led to a focus on herbal medicine, such as the use of *Citrus aurantium* L., belonging to the Citrus genus (Rutaceae). The extract from the immature fruit peel contains adrenergic amines, with synephrine being the primary active component known for its adrenergic and lipolytic properties. Recent findings revealed that *Citrus aurantium* L. improved the metabolic profile of mice programmed for overfeeding but concurrently elevated thyroid hormone concentrations. In this pioneering study, we investigated the impact of treatment with *Citrus aurantium* L. and/or synephrine on thyroid metabolism and its repercussions on the heart in obese adolescent mice programmed through early postnatal overfeeding. Three days after birth, male Swiss mice were divided into two groups: an overfed group (SL) with a litter reduced to 3 pups to induce postnatal overfeeding and a control group (NL) with a litter of 9 pups. At 30 days of age, SL and NL mice were subjected to a 19-day treatment with Citrus aurantium L., standardized at 6% synephrine (SL-C6%) or 30% synephrine (SL-C30%), isolated synephrine (SL-Syn), or vehicle (NL). The results indicate a correlation between the anti-obesity effect of Citrus Aurantium L. or synephrine and thyroid function, manifested through increased serum levels of T3 (SL-CA6%, +84.03%; SL-CA30%, +105.19%, and SL-Syn +136.5%) and T4 (SL, +201.89%; SL-CA6%, +344.90%; SL-CA30%, +335.36%, and SL-Syn, +453.92%), along with enhanced TAM functionality due to increased TRH α receptor expression. Although there was no reduction in body weight, the treatment effectively curtailed body mass gain and adiposity during the treatment period (SL-CA6%, -21.49%; SL-CA30%, -21.58%, and SL-Syn, -21.67%). While there were no discernible differences in the heart rate of treated animals, isolated synephrine led to a notable increase (+156.07%) in the expression of the α -MHC gene, associated with adverse effects on the heart. In the other treated groups, the likely synergistic effect of other components of *C. aurantium* L. may have mitigated the development of this synephrine-induced effect on the heart.

Keywords: obesity; metabolic programming; early postnatal overfeeding; adolescence; thyroid hormones; *Citrus aurantium*; synephrine; heart.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fatores associados ao surgimento e aumento da prevalência de obesidade.....	15
Figura 2 -	Diagrama esquemático representando as alterações da lactação à vida adulta induzidas pela superalimentação pós-natal precoce.....	21
Figura 3 -	Estrutura dos hormônios tireoidianos T3 e T4.....	23
Figura 4 -	Eixo Hipotálamo – Hipófise – Tireoide.....	24
Figura 5 -	Esquema geral da síntese e secreção dos HTs em uma célula folicular tireoidiana.....	27
Figura 6 -	Ilustração taxonômica de <i>Citrus aurantium</i>	31
Figura 7 -	Comparação da composição estrutural da p-sinefrina e efedrina.....	33
Figura 8 -	Desenho experimental.....	39
Figura 9 -	Evolução do ganho de massa corporal no período da lactação (até 21 dias) de animais controle e submetidos à superalimentação pós-natal precoce	46
Figura 10 -	Massa corporal e gordura corporal aos 30 dias de vida (pré-tratamento com <i>Citrus aurantium</i> ou sinefrina) por RMN.....	47
Figura 11 -	Massa corporal e gordura corporal aos 50 dias de vida (pós-tratamento) por RMN.....	48
Figura 12 -	Ganho de massa corporal acumulado durante o tratamento, de 30 até 50 dias de vida.....	48
Figura 13 -	Avaliação da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca durante o tratamento com <i>Citrus aurantium</i> e sinefrina.....	49
Figura 14 -	Dosagem de T3 total e T4 livre, aos 50 dias de vida, em animais controles e submetidos à superalimentação pós-natal precoce, tratados ou não com <i>Citrus aurantium L.</i> ou sinefrina.....	50
Figura 15 -	Avaliação da expressão de mRNA no fígado, aos 50 dias de vida, de animais controles e animais submetidos à supernutrição pós-natal precoce tratados ou não com <i>Citrus aurantium L.</i> ou sinefrina.....	51
Figura 16 -	Avaliação da expressão de mRNA no TAM, aos 50 dias de vida, de animais controles e animais submetidos à superalimentação pós-natal precoce tratados ou não com <i>Citrus aurantium L.</i> ou sinefrina.....	52
Figura 17 -	Avaliação da expressão de mRNA no Coração, aos 50 dias de vida, em animais controles e submetidos à superalimentação pós-natal precoce tratados ou não com <i>Citrus aurantium L.</i> ou sinefrina.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados sobre obesidade e sobrepeso mundiais e suas projeções futuras; -----	16
Tabela 2 -	Subdivisões dos grupos SL e NL após 21 dias de vida; -----	38
Tabela 3 -	Tratamentos administrados por via oral (gavagem) com suas respectivas doses; -----	38
Tabela 4 -	Ensaio de expressão gênica e referências das sequências de iniciadores específicos utilizados no PCR em tempo real; -----	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Proteína quinase ativada pelo AMP
ATP	Adenosina trifosfato
CID	Classificação Internacional de Doenças
COB	Comissão de Obesidade no Brasil
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DIT	Di-iodotirosina
DIO	Desiodade
DOHaD	Origens do desenvolvimento da saúde e doença (Developmental Origins of Health and Disease)
DUOX	Dual oxidase
FDA	Food and Drug Administration
GPDm	Glicerofosfato desidrogenase mitocondrial
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HTs	Hormônios tireoidianos
LHS	Lipase hormônio sensível
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IMC	Índice de Massa Corporal
mRNA	RNA mensageiro
MIT	Monoiodotirosina
MHC	Cadeia pesada de miosina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NIS	Simportador de iodeto e sódio
NL	Grupo controle
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDS	Pendrina
PIB	Produto interno bruto
SL	Grupo supernutrido
SL-CA6%	Grupo supernutrido tratado com <i>Citrus aurantium</i> L. a 6%
SL-CA30%	Grupo supernutrido tratado com <i>Citrus aurantium</i> L. a 30%

SL-Syn	Grupo supernutrido tratado com Sinefrina
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TG	Tireoglobulina
TPO	Tireoperoxidase
TR	Receptor de hormônio tireoidiano
TRH	hormônio liberador da tireotrofina
TSH	hormônio hipofisário estimulador da tireoide / Tireotrofina
UCP1	Proteína desacopladora 1
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	36
1.1	Objetivo geral	36
1.2	Objetivos específicos	36
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Modelo experimental	37
2.2	Obtenção do <i>Citrus aurantium</i> L. e da sinefrina isolada	40
2.3	Avaliação da massa corporal	40
2.4	Avaliação da composição corporal	40
2.5	Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca	41
2.6	Avaliação da expressão de RNAm	41
2.6.1	Extração de RNA total	41
2.6.2	Síntese do cDNA	42
2.6.3	Reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real)	43
2.7	Dosagem sérica dos hormônios tireoidianos	44
2.8	Análises estatísticas	45
3	RESULTADOS	46
3.1	Avaliação da massa corporal, composição de gordura corporal e ganho de peso	46
3.2	Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca	49
3.3	Dosagem sérica de hormônios tireoidianos	50
3.4	Expressão gênica no fígado	51
3.5	Expressão gênica no tecido adiposo marrom (TAM)	52
3.6	Expressão gênica no coração	53
4	DISCUSSÃO	54
	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA), Instituto de Biologia (UERJ)	77

ANEXO B - Certificado de análise Citrus Extrato Seco 6%, Florian	78
ANEXO C - Certificado de análise Citrus Extrato Seco 30%, Florian	80

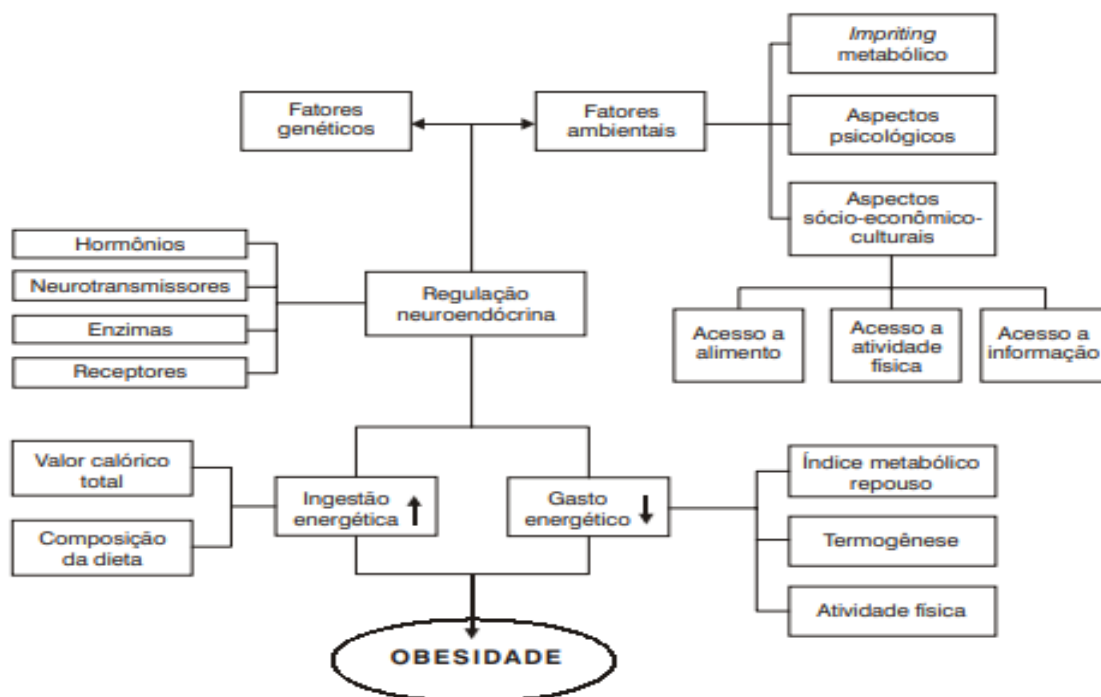
INTRODUÇÃO

Obesidade

Desde 1948, a obesidade foi adicionada à Classificação Internacional de Doenças (CID) pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo caracterizada como uma doença endócrino metabólica crônica, de origem multifatorial, na qual há acúmulo anormal ou excessivo de gordura, causando sérios prejuízos à saúde (WHO, 2023; JAMES, 2008; BRAY et al 2017).

Apesar de fatores genéticos desempenharem um papel significativo no desenvolvimento da obesidade (BRAY et al., 2017; SBP 2019), estes são responsáveis por apenas cerca de 2% a 5% dos casos de obesidade, enquanto fatores exógenos, como influências sociais e ambientais, representam entre 95% e 98% dos casos (ESCRIVÃO, 2002; CARVALHO, 2012; SANTOS et al., 2010). Essa evidência reforça a importância do ambiente obesogênico no desenvolvimento da obesidade. O sedentarismo e os hábitos alimentares inadequados são exemplos de fatores exógenos que causaram o aumento da prevalência da obesidade na população. Esses fatores podem incluir a disponibilidade excessiva de alimentos altamente calóricos, o acesso limitado a alimentos saudáveis, a falta de atividade física e a influência de comportamentos sociais que promovem uma alimentação não saudável, conforme demonstrado na figura 1 (URIBE-CERDA et al., 2018; SBP 2019; SANTOS et al., 2010)

Figura 1 – Fatores associados a obesidade



Fonte: Balaban & Silva, 2004.

A prevalência da obesidade tem aumentado significativamente nas últimas décadas, tornando-se um problema de saúde pública global. Segundo o Observatório Global da Obesidade, mais de 4 bilhões de pessoas podem ser afetadas até 2035, em comparação com mais de 2,6 bilhões em 2020. Isso significa que em 2020, 38% da população global, a partir de 5 anos, apresentava sobrepeso e 14% desta tinha obesidade, e as projeções do órgão para 2035 sugerem que 51% da população mundial acima de 5 anos estará com sobrepeso e que destes, 24% estarão obesos (Tabela1). Teremos então, quase $\frac{1}{4}$ da população mundial padecendo desta doença, deixando evidente a importância do seu estudo e controle (WOF, 2023).

Tabela 1 - Dados sobre obesidade e sobrepeso mundiais e suas projeções futuras.

	2020	2025	2030	2035
Sobrepeso ou obesidade (IMC $\geq$ 25kg/m ²) (milhões)	2.603	3.041	3.507	4.005
Obesidade (IMC $\geq$ 30kg/m ²) (milhões)	988	1.249	1.556	1.914
Proporção da população com sobrepeso ou obesidade	38%	42%	46%	51%
Proporção da população com obesidade	14%	17%	20%	24%

Fonte: Adaptado do Atlas de Obesidade Global 2023

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, por inquérito telefônico, realizado pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas, demonstrou que 57% dos brasileiros adultos estavam com sobrepeso e 23% estavam obesos em 2021. Na pesquisa anterior (2019), a prevalência de obesidade era menor, sendo de 20%, denotando um crescimento do índice durante a pandemia de COVID-19. Concluiu-se também que essa condição é mais prevalente em homens com até 54 anos de idade e menor escolaridade (VIGITEL, 2019/2021).

De acordo com dados do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) do Ministério da Saúde em 2022, o sobrepeso atingia 31% ou 6,72 milhões de brasileiros, a obesidade grau I afetava 20% da população, enquanto a obesidade grau II já atingia 7,7%, totalizando 1,6 milhões de pessoas. Um total de 863.083 brasileiros que participaram da tabulação do SISVAN possuíam obesidade grau III, ou seja, 4,07% da população. Esse número representa um crescimento de 29,6% no número de pessoas nesta condição em apenas 4 anos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Os gastos na saúde pública relacionados a obesidade são expressivos; segundo o Atlas Mundial da Obesidade de 2023, o sobrepeso e a obesidade custarão à economia global mais de US\$ 4 trilhões de renda potencial em 2035, ou seja, quase 3% do atual produto interno bruto (PIB) global (WOF, 2023). No Brasil, um estudo realizado em 2018 apontou que os gastos com a obesidade no país foram em torno de R\$ 669 milhões em hospitalizações e gastos ambulatoriais e R\$ 722 milhões em gastos com medicamentos, ou seja, um total de R\$ 1,39 bilhão (NILSON et.al, 2019).

Sabe-se que o excesso de peso, leva ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), principalmente as doenças cardiovasculares, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias e osteoartrite, desordens do sono e doença do refluxo gastroesofágico (ANDOLFI & FISICHELLA, 2018; GOMEZ-CAMPOS, 2011, LILLYCROP & BURDGE, 2011). Cerca de 70% de todas as mortes no mundo são provenientes das DCNTs (cardiovasculares, respiratórias crônicas, cânceres e diabetes), com estimativa de 38 milhões de mortes anuais. Desses óbitos, quase 28 milhões são em países de baixa e média renda, e 16 milhões ocorrem prematuramente (menores de 70 anos de idade) (MALTA et al., 2017). Em 2019, as DCNTs foram responsáveis por 55% das 738.371 mortes de adultos no Brasil. Dessas, 173.207 ou 56,1%, ocorreram entre 30 e 69 anos de idade e, portanto, são consideradas prematuras e evitáveis (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2019).

Obesidade Infantil e na Adolescência

A obesidade infanto-juvenil é apontada pela OMS como um dos maiores desafios de saúde pública do século atual. Em 2016, cerca de 41 milhões de crianças tinham obesidade e este número vem crescendo de maneira acelerada (WHO, 2023). Segundo o Atlas Mundial da Obesidade 2023, a quantidade de crianças com obesidade no mundo pode mais que dobrar em relação a 2020, atingindo a marca de 208 milhões de meninos e 175 milhões de meninas até 2035. Além disso, a Comissão de Obesidade no Brasil (COB) apresenta o sobrepeso e a obesidade como agravos de importância epidemiológica, a partir de cinco anos de idade, em todas as regiões brasileiras e grupos de renda (SANTOS, 2011; LIRA et al., 2020).

Segundo o Censo Demográfico realizado em 2010 no Brasil, faziam parte da população em torno de 18 milhões de indivíduos com idades entre 10 e 14 anos, enquanto na faixa etária de 15 a 19 anos, esse número era de aproximadamente 17 milhões de jovens (IBGE, 2010).

Em uma visão global, tais projeções significam que aproximadamente 400 milhões de crianças lutarão contra a obesidade. Esses dados ressaltam a urgência

de enfrentar o desafio da obesidade infantil de forma abrangente e eficaz (WOF, 2023).

Em crianças obesas, a gordura abdominal apresenta correlação positiva para alterações metabólicas como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia e disfunção endotelial, comorbidades estas que normalmente são observadas em uma fase mais tardia da vida (SKINNER et al., 2015; KUMAR; KELLY, 2017; RUIZ et al., 2019).

A alimentação infantil desempenha um papel crucial no desenvolvimento e no risco de obesidade, sobretudo em estágios iniciais do desenvolvimento. Estudos têm demonstrado que o desmame precoce, caracterizado pela introdução de alimentos sólidos antes dos seis meses de idade, está associado a um maior risco de obesidade na infância e adolescência (SILVA et al., 2019; WOF, 2019). Além disso, uma alimentação com leite industrializado, em vez do aleitamento materno exclusivo, pode contribuir para o desequilíbrio energético e nutricional, promovendo o ganho excessivo de peso e o desenvolvimento da obesidade (ROLLAND-CACHERA et al., 2019).

Assim como o primeiro ano de vida, a adolescência também é uma fase de grande crescimento e consequente aumento das necessidades nutricionais (RUIZ et al., 2019). Além de representar uma fase de grande importância pela alta possibilidade de perpetuação do estado obeso na vida adulta e forte associação com outras condições crônicas conforme citado anteriormente. Estima-se que cerca de 90% das crianças com obesidade continuarão obesas na idade adulta (ROMANELLI et al., 2020; SBP 2019; NEVES et al., 2021).

Há evidências de que crianças e adolescentes obesos podem reverter esse quadro e não se tornarem adultos obesos, sugerindo que o controle do peso na adolescência e idade adulta jovem pode diminuir parcialmente o risco cardiometabólico e do desenvolvimento de DNCTs na idade adulta (RAITAKARI et al., 2003, JUONALA et al., 2011). Desta forma o controle da obesidade nesta fase é importante para mitigar efeitos associados a ela numa fase posterior da vida adulta.

Programação metabólica e superalimentação neonatal

A programação metabólica é um fenômeno que ocorre durante períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação, lactação e adolescência, no qual alterações hormonais, ambientais e nutricionais promovem ajustes morfofuncionais. Esse processo pode ter repercussões significativas na saúde ao longo da vida, aumentando a predisposição ao desenvolvimento de doenças (DE MOURA & PASSOS, 2005).

Sua origem remonta aos estudos pioneiros realizados pelo epidemiologista britânico David J.P. Barker na década de 1980, onde foi observado uma associação entre baixo peso ao nascer e um aumento do risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e obesidade em adultos (Barker et al., 1989; Barker, 1995). Essa observação levou à proposição da hipótese da "origem fetal das doenças do adulto", sugerindo que as condições durante a vida fetal podem influenciar o desenvolvimento de doenças na vida adulta e dando origem ao conceito conhecido como *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) (BARKER, 1995; HABBOU et al., 2012; SUZUKI, 2018).

A programação metabólica tem sido associada ao surgimento de DCNTs, como obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e dislipidemias. Essas condições de saúde têm se tornado cada vez mais prevalentes na população, representando um importante problema de saúde pública (WATERLAND E MICHELS, 2007; KING & SKINNER, 2020; LILLYCROP E BURDGE, 2011; YAN-LIN et al., 2023).

Segundo Dörner e Plagemann (1994), filhos de mulheres obesas possuem uma maior propensão a desenvolver obesidade e resistência à insulina ao longo da vida. Esse achado apoia a teoria da "programação do desenvolvimento", que sugere que condições adversas durante uma janela crítica de desenvolvimento podem levar a alterações fisiológicas permanentes, com impacto duradouro até a idade adulta (DÖRNER & PLAGEMANN, 1994).

Essas condições adversas resultam na modificação dos padrões de expressão gênica decorrentes de mecanismos epigenéticos em resposta a fatores ambientais, incluindo uma dieta inadequada durante a gestação e a primeira infância, levando a alterações relacionadas ao metabolismo. Com isso, há o aparecimento de respostas adaptativas, que são responsáveis pela pré-disposição a

condições clínicas adversas (GOYAL et al., 2019; SUZUKI, 2018; YAN-LIN et al., 2023).

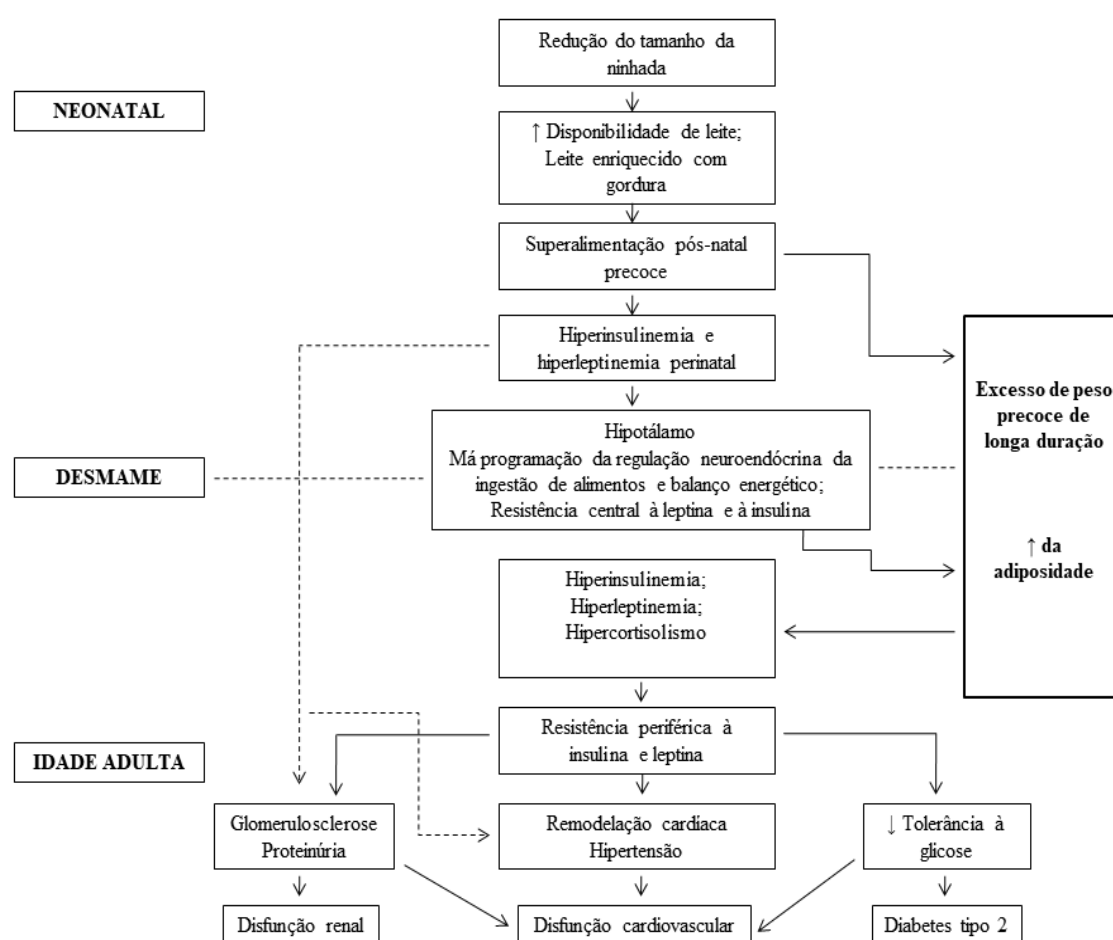
Essas alterações metabólicas e epigenéticas podem predispor o indivíduo a um maior risco de desenvolver obesidade, resistência à insulina e outras alterações metabólicas desde a infância até a vida adulta (YAN-LIN et al., 2023; YUNCONG et al., 2022; KING & SKINNER, 2020). Estudos longitudinais têm mostrado que crianças nascidas de mães obesas têm maior probabilidade de apresentar excesso de peso e complicações metabólicas ao longo da vida (CATALANO & SHANKAR, 2017; ARMITAGE et al., 2008; MARTIN-GRONERT & OZANNE, 2012). A exposição intrauterina a fatores obesogênicos, como a dieta materna desequilibrada e o ambiente inflamatório, pode desencadear respostas adaptativas no feto que persistem na vida adulta (CATALANO & SHANKAR, 2017; ZHU et al., 2019). Estudos atuais, têm associado a exposição intrauterina a fatores adversos com o desenvolvimento de outras doenças crônicas, como diabetes tipo 2, hipertensão, dislipidemia e doenças cardiovasculares (BARKER et al., 2010; ALMEIDA et al., 2017; PAREDES, CARMEN et al., 2022; JEJE et al., 2022; FALL & KUMARAN, 2019; ZHU et al., 2019).

Na literatura, está bem estabelecido que a superalimentação pós-natal precoce acarreta uma série de efeitos fisiopatológicos. Entre esses efeitos, incluem-se hiperfagia, hiperinsulinemia, diminuição da tolerância à glicose, hiperleptinemia, hipertrigliceridemia, alterações cardiovasculares e modificações no metabolismo do tecido adiposo, como o aumento da massa do tecido adiposo branco visceral e comprometimento da termogênese do tecido adiposo marrom (PASSOS et al., 2004; LILLYCROP & BURDGE, 2011; HABBOUT et al., 2012; PLAGEMANN et al., 2012; ORNELLAS et al., 2015; XIAO et al., 2007; BERNARDO et al., 2016; XAVIER et al., 2015; GLAVAS et al., 2010).

Alguns modelos em roedores investigam tais alterações nutricionais no começo da vida. O modelo de programação por redução da ninhada foi descrito por Plagemann e colaboradores, onde ocorre a redução do número de filhotes da ninhada no terceiro dia após o nascimento, diminuindo a competitividade entre os filhotes e aumentando a disponibilidade de leite. Ocorre também uma modificação na composição nutricional do leite materno tornando-o mais rico em triglicerídeos, conforme demonstrado por outros estudos (PLAGEMANN et al., 1992, 1999, 2010; PASSOS et al., 2004; CUNHA et al., 2009; HABBOUT et al., 2012; LISBOA et al.,

2015; MUÑOZ-VALVERDE et al., 2015; ORNELLAS et al. 2015;). Essa superalimentação neonatal leva a programação metabólica da prole, resultando em um fenótipo semelhante à síndrome metabólica desde a idade juvenil até a vida adulta como demonstrado no esquema da figura 2 (PLAGEMANN et al., 2012; HABBOUT et al., 2012). Adicionalmente, foi demonstrado que animais criados em ninhadas pequenas apresentam um ganho de peso corporal acelerado antes do desmame, o que está associado à modulação permanente da adiposidade e dos circuitos hipotalâmicos que controlam a ingestão alimentar e o balanço energético na idade adulta (PLAGEMANN et al., 1992).

Figura 2 - Diagrama esquemático representando as alterações da lactação à vida adulta induzidas pela superalimentação pós-natal precoce.



Legenda: aumento (↑); diminuição (↓)

Fonte: adaptado de HABBOUT et al., 2012.

Além da obesidade, esses animais apresentam diferentes disfunções hormonais, dentre elas, destaca-se a função tireoidiana; foi demonstrado que ao desmame (21 dias de idade), a prole supernutrida apresenta aumento nas concentrações séricas de hormônio tireoestimulante (TSH) e hormônios tireoidianos. Já aos 180 dias de vida, esses animais apresentam concentrações normais de TSH, mas redução nos níveis de T3 e T4. Esse hipertireoidismo neonatal (21 dias) pode atuar como um fator de modulação, promovendo o hipotireoidismo observado na idade adulta (RODRIGUES, et al., 2009; SOUZA, et al., 2022).

Em 2015, Lisboa e colaboradores, utilizando o modelo de superalimentação neonatal por redução do tamanho da ninhada em ratos, demonstraram que, aos 180 dias, o metabolismo e a ação dos hormônios tireoidianos estavam alterados no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, apresentando maior atividade da enzima desidase 2 (D2) no hipotálamo, menor desidase 1 (D1) na tireoide, sem modificar a D2 nesse tecido (LISBOA et al., 2015; SOUZA et al., 2022).

Foi observada também redução na termogênese promovida pelo tecido adiposo marrom (TAM), um alvo dos hormônios tireoidianos, a qual foi associada a níveis mais baixos de proteína desacopladora 1 (UCP1) e a expressão reduzida do receptor simpático beta 3-adrenérgico (XIAO et al., 2007; LISBOA et al., 2015).

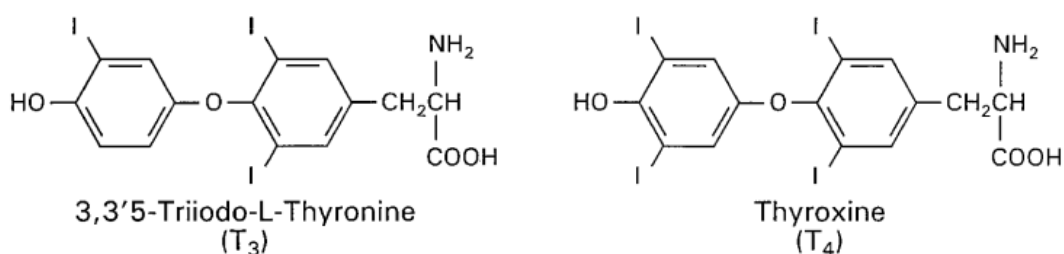
Função Tireoidiana

Hormônios Tireoidianos

Os hormônios tireoidianos (HTs), triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (Figura3), são produzidos pela glândula tireoide e desempenham um papel crucial na regulação funcional de diversos tecidos e órgãos do corpo humano, incluindo o coração, fígado, cérebro, músculos esqueléticos, pâncreas e tecido adiposo (VOLKE & KRAUSE, 2021; WALCZAK & SIEMINSKA, 2021). Ligando-se a receptores nucleares específicos e regulando a expressão de genes específicos, exercem controle sobre uma ampla gama de processos fisiológicos, como o equilíbrio energético, o apetite, a taxa metabólica basal, a termogênese, o metabolismo da glicose e o metabolismo lipídico. Assim, desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase, garantindo que as funções metabólicas sejam

reguladas e coordenadas (WALCZAK & SIEMINSKA, 2021; BRENT, 2012; FRANKLYN et al., 2012; CARVALHO & DUPUY, 2017). Além disso, os HTs desempenham um papel importante na função cardiovascular, influenciando a contratilidade cardíaca, a frequência cardíaca e a pressão arterial (LAZARUS et al., 2014; BRIENZA et al., 2013). Eles também são essenciais para o desenvolvimento e a função adequada do sistema nervoso central, sendo essencial para maturação neuronal, mielinização e a função cognitiva (BERNAL, 2007; FRANKLYN et al., 2012).

Figura 3 – Estrutura dos hormônios tireoidianos T3 e T4



Fonte: Adaptado de Yen, 2001.

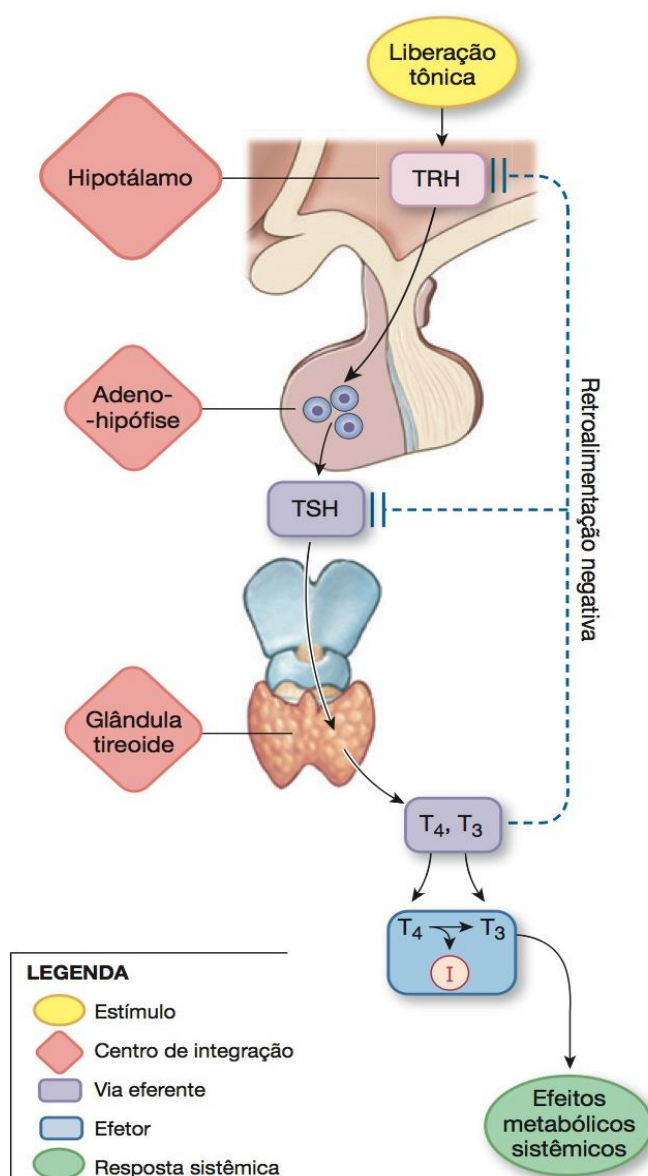
O processo de produção dos HTs no folículo da tireoide envolve a captação ativa de iodeto, o direcionamento e transporte do iodo para o interior do folículo, a oxidação do iodeto, a formação de iodotirosinas através da iodação de resíduos tirosil na molécula de tireoglobulina e o acoplamento oxidativo de duas iodotirosinas, resultando em iodotironinas que permanecem ligadas à tireoglobulina (AIRES, 2019; SILVERTHORN, 2017).

A biossíntese dos HTs é regulada por um processo de retro-alimentação homeostático envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide demonstrado na figura 4. O hormônio liberador da tireotrofina (TRH), é um peptídeo que é sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo. Após sua síntese, o TRH é transportado ao longo de axônios até alcançar a eminência mediana e, em seguida, a hipófise anterior, por meio do sistema porta-hipofisário. Nos tireotrofos hipofisários, que são uma subpopulação de células da hipófise responsivos ao TRH, este se liga aos seus receptores específicos estimulando a secreção de hormônio hipofisário estimulador

da tireoide (TSH), o qual age sobre a tireoide estimulando a síntese e secreção dos HTs (YEN, 2001; GRANNER, 2014; ORTIGA-CARVALHO, 2016; AIRES, 2019).

Tanto o TRH quanto o TSH são regulados pelos HTs. Um mecanismo importante para essa regulação negativa dos HTs sobre o TRH e o TSH é a conversão intracelular de T₄ em T₃ no hipotálamo e na hipófise por meio da ação da enzima desidrodase 2 (D2). Além disso, a somatostatina e a dopamina, hormônios produzidos pelo hipotálamo, também têm a capacidade de inibir a secreção de TSH (AIRES, 2019; ORTIGA-CARVALHO, 2016).

Figura 4 – Eixo Hipotálamo – Hipófise – Tireoide



Em resumo, hipotálamo secreta TRH, que estimula a hipófise a liberar o TSH, o qual atua diretamente sobre a tireoide, estimulando a síntese e secreção do T4 e T3. Os hormônios liberados pela tireoide, por sua vez, atuam sobre a hipófise e o hipotálamo através de um mecanismo de retroalimentação negativo, inibindo a liberação do TRH e do TSH (BRENT, 2012; LAZARUS et al., 2014; ORTIGA-CARVALHO, 2016; WALCZAK & SIEMINSKA, 2021; FRANKLYN et al., 2012).

Biossíntese e Mecanismo de ação

O processo de biossíntese dos HTs ocorre nas células foliculares da tireoide conforme esquematizado na figura 5. A tireoide realiza a concentração do iodeto inorgânico presente na circulação através de um processo ativo que requer energia. Esse processo de captação é mediado pela proteína NIS (simportador de iodeto e sódio), que se encontra tanto na superfície basal como na basolateral das células foliculares. A proteína NIS permite a entrada de iodeto extracelular contra um gradiente eletroquímico negativo. Uma vez dentro da célula folicular, o iodeto se difunde em direção ao topo da célula e alcança o lúmen folicular por meio de um canal de ânions chamado pendrina (PDS) (MULLUR et al., 2014; AIRES, 2019).

Em seguida, o iodeto é oxidado pela tireoperoxidase (TPO), uma enzima presente na membrana apical das células foliculares, com sua região catalítica voltada para o lúmen folicular. Esse processo é dependente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como doador de oxigênio. O H_2O_2 é produzido pela enzima dual oxidase (DUOX), também localizada na membrana apical, que possui atividade de NADPH oxidase (AIRES, 2019; GARCIA-SOLIS et al., 2018; CARVALHO & DUPUY, 2017; MULLUR, 2014).

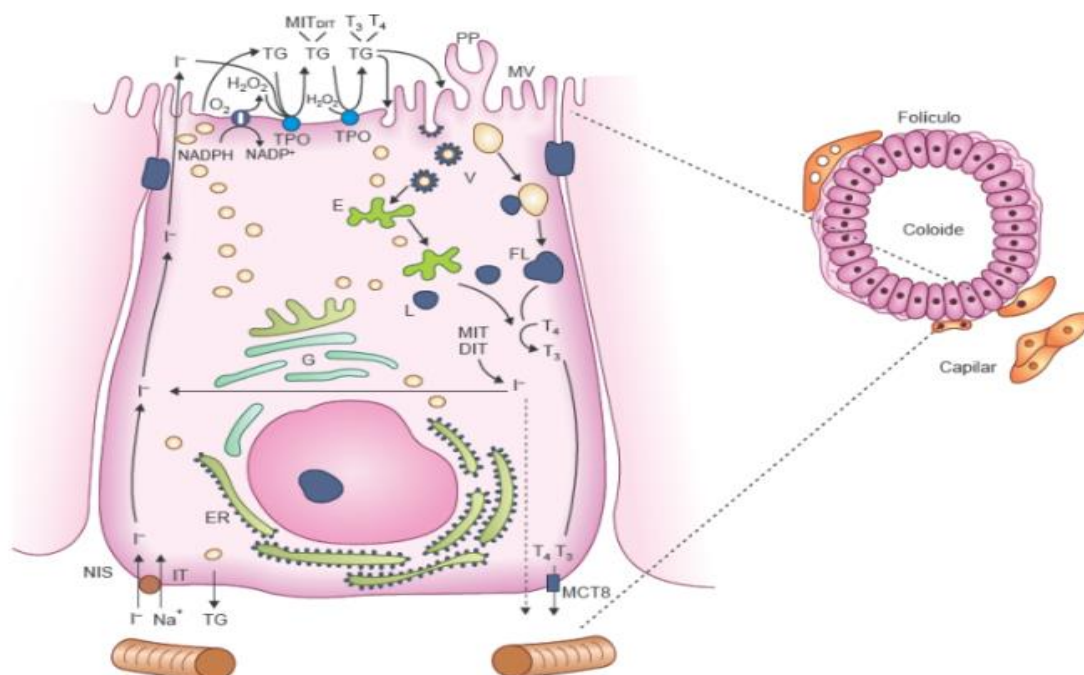
O iodo oxidado é, então, adicionado aos resíduos de tirosina na molécula de tireoglobulina (TG) através de uma reação catalisada pela TPO, etapa denominada organificação. A TG é uma molécula grande, com um peso molecular de 660 kDa, apresentando o aminoácido essencial para a síntese dos HTs, a tirosina. Na tireoide saudável, a maior parte da TG está presente como uma proteína solúvel no interior do coloide. Quando uma molécula de iodo se liga à tirosina, é gerada uma moniodotirosina (MIT); quando duas moléculas de iodo se ligam, temos a diiodotirosina (DIT) (AIRES, 2019; GARCIA-SOLIS et al., 2018; CARVALHO &

DUPUY, 2017; GRANNER, 2014). Ainda ligadas à tireoglobulina, algumas das iodotirosinas (MIT e DIT) se unem e geram as iodotironinas. A união de MIT com DIT resulta em dois tipos de iodotironinas: a tri-iodotironina (ou T3) e a tri-iodotironina reversa (ou T3 reversa ou rT3), que diferem em termos da posição da iodação, enquanto a união de duas DIT resulta na formação de tiroxina (T4, ou tetraiodotironina). O homodímero de TG contém 132 tirosinas, mas nem todas sofrem iodação e união. Apenas 1/3 é iodado, formando MIT, DIT, T3, T4 ou rT3. Apenas três ou quatro moléculas de tiroxina são produzidas por uma única tireoglobulina, e em condições normais a tireoide produz mais T4 do que T3 (AIRES, 2019; GARCIA-SOLIS et al., 2018; CARVALHO & DUPUY, 2017; GRANNER, 2014).

A TG deve ser hidrolisada para liberar T4 e T3 no interior da célula folicular. Para isso, há reabsorção do coloide para o interior da célula folicular através da formação de vesículas endocíticas que se fundem com os lisossomos, compondo endossomos ou fagossomos com função proteolítica, culminando na digestão da TG e desprendimento das moléculas de MIT, DIT, rT3, T3 e T4 (AIRES, 2019; SILVERTHORN, 2017).

T4 e T3 livres deixam a célula folicular através do transportador de membrana MCT8 (transcrito do gene SLC16A2), localizado na membrana plasmática do polo basal, próximo à rede capilar do estroma interfolicular. A glândula tireoide de um adulto normal libera cerca de 100 µg de T4/dia e 10 µg de T3/dia na circulação sanguínea (AIRES, 2019; SILVERTHORN, 2017).

Figura 5 - Esquema geral da síntese e secreção dos HTs em uma célula folicular tireoidiana.



Fonte: Aires, 2019.

O principal produto de secreção da glândula tiróide é o T₄, embora o T₃ seja a forma biologicamente ativa. O T₄ é considerado um pró-hormônio que precisa ser convertido em T₃, através da retirada do iodo na posição 5' do anel fenólico ou desiodação do anel externo. Esta conversão é catalisada pelas desiodases de iodotironinas do tipo 1 (D1) e 2 (D2) (GARCIA-SOLIS et al., 2018; BIANCO et al., 2002; GRANNER, 2014). A D1 é encontrada em tecidos periféricos, como fígado e rim, e é responsável pela conversão da maior parte do T₄ para T₃ para a circulação. A D2 é encontrada no cérebro, hipófise e TAM e converte principalmente T₄ para T₃ para uso intracelular (YEN, 2001; AIRES, 2019).

A inativação do HT também depende em grande parte de desiodação, entretanto, na inativação, o iodo da posição 5 do anel tirosil é removido, reação chamada de desiodação do anel interno. Desta forma, tanto o pró-hormônio (T₄) quanto o hormônio (T₃) são inativados, resultando em 3, 5', 3'- triiodotironina (rT₃) e 3, 3'- diiodotironina (T₂), respectivamente. Esta reação é catalisada pelo terceiro membro da família de desiodases, a desiodase do tipo 3 (D3) e em menor proporção pela D1 (BIANCO et al., 2002; GRANNER, 2014).

Os HTs atuam através de receptores nucleares (TRs), que são fatores de transcrição dependentes de ligantes codificados por dois genes diferentes em mamíferos, *TRα* e *TRβ*. A isoforma codificada pelo gene *TRα* é predominantemente expressa em tecidos como músculo esquelético, coração e TAM, enquanto a isoforma *TRβ* é predominante em tecidos como fígado, cérebro, rim, ventrículos cardíacos, hipófise e hipotálamo (SONG et al., 2011; BERNAL, 2007; BRTKO, 2021; MULLUR et al., 2014; TEDESCHI et al., 2021).

O T3 se liga aos elementos responsivos a hormônios tireoideanos (TREs) localizados nas regiões promotoras dos genes-alvo e atua como um fator de transcrição. Dessa forma, os HTs têm a capacidade de regular diretamente a atividade da maquinaria de transcrição do DNA para RNA mensageiro (mRNA). Essa ligação pode resultar na ativação ou repressão da transcrição dos genes-alvo, dependendo do gene e do contexto celular específico. Essa regulação precisa e complexa da expressão gênica pelos HTs desempenha um papel fundamental na modulação de vários processos fisiológicos, incluindo o metabolismo energético e o desenvolvimento adequado dos tecidos e órgãos (YEN, 2001; BRTKO, 2021; GRANNER, 2014; TEDESCHI et al., 2021; AIRES, 2019).

Hormônios Tireoidianos e Obesidade

A interação entre os HTs e obesidade é um campo de estudo complexo e ainda em investigação. Estudos têm demonstrado uma associação entre distúrbios da tireoide, como hipotireoidismo, e o desenvolvimento da obesidade (ASVOLD et al., 2009; REINEHR, 2010; GARCIA-SOLIS et al., 2018).

Os hormônios tireoidianos desempenham um papel crucial no metabolismo energético do organismo, regulando a taxa de metabolismo basal e a utilização de energia pelos tecidos (BIANCO et al., 2005; BRENTA et al., 2010; GARCIA-SOLIS et al., 2018). A deficiência dos hormônios tireoidianos, como no caso do hipotireoidismo, pode levar a uma diminuição do metabolismo basal, resultando em menor gasto energético e potencial acúmulo de peso (BIANCO et al., 2005; BRENTA et al., 2010; WALCZAK & SIEMINSKA, 2021).

O exemplo mais claro de gasto energético dependente do hormônio tireoidiano está relacionado à termogênese adaptativa. A termogênese adaptativa é caracterizada por um desacoplamento da fosforilação oxidativa no TAM, que é dependente do T3 gerado localmente. Em pequenos mamíferos, a estimulação simpática adrenérgica do TAM induz a ação da proteína desacopladora-1 (UCP-1). A UCP-1 é uma proteína que desacopla o gradiente de prótons mitocondrial da produção de ATP promovendo a geração de calor (YAU & YEN, 2020; SENTIS et al., 2021). Um elemento crítico nessa via é a D2, que aumenta a produção intracelular local de T3 a partir de T4, a tal ponto que a saturação do receptor do hormônio tireoidiano aumenta de 70% para quase 100% após a exposição ao frio (BIANCO, 2002; SENTIS et al., 2021).

No tecido adiposo branco (TAB), o T3 estimula a diferenciação dos adipócitos, a atividade da lipase hormônio sensível (LHS), a sensibilidade à insulina e o transporte de glicose; estimula ainda a termogênese, através da expressão de UCP1 e a expressão de fatores lipolíticos, como o receptor $\beta 3$ adrenérgico (YAU & YEN, 2020; SENTIS et al., 2021; OBREGÓN, 2014), e lipogênicos como a acetil coA carboxilase (ACC), ácido graxo sintase (FAS) e a glicose 6 fosfato desidrogenase (YEN et al., 2001; OBREGON, 2008), além da expressão gênica de PPAR γ , induzindo a adipogênese (OBREGÓN, 2014).

Além disso, os HTs também estão envolvidos na regulação do metabolismo dos macronutrientes, como carboidratos e lipídios. O T3 é conhecido por estimular a degradação de gorduras e inibir a síntese de colesterol, e pode afetar a captação e o metabolismo dos carboidratos (BIANCO et al., 2005; BRENTA et al., 2010; WALCZAK & SIEMINSKA, 2021).

O TR é essencial para a regulação da saúde metabólica, principalmente por meio da manutenção do metabolismo de lipídios e carboidratos, pressão arterial e massa muscular. As isoformas do receptor (α , $\beta 1$, $\beta 2$) desempenham papéis distintos na saúde metabólica. O TR α regula principalmente a termogênese, enquanto o TR β regula principalmente o metabolismo do colesterol e a lipogênese, e vários genes e enzimas essenciais para a proliferação de pré-adipócitos e diferenciação de adipócitos, diretamente ou via PPAR γ (OBREGÓN, 2014).

No metabolismo glicídico, atuam estimulando a rápida captação de glicose pelas células, aumento da glicólise, aumento da gliconeogênese, maior absorção de

glicose pelo trato gastrointestinal e aumento da secreção de insulina (MULLUR et al., 2014).

Alterações na função tireoidiana estão relacionadas a alterações no peso corporal, na fome/saciedade, no gasto energético e na sensibilidade à insulina. No hipertireoidismo, os pacientes geralmente apresentam perda de peso, apesar do aumento do apetite, e o excesso de HTs também pode levar à resistência à insulina. Por outro lado, no hipotireoidismo, os pacientes tendem a ganhar peso e podem desenvolver resistência à insulina (REINEHR, 2010; PEPPA et al., 2010). Além disso, no hipotireoidismo, há um aumento nos níveis séricos de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), apolipoproteína B e lipoproteínas, bem como um aumento nos níveis de triglicerídeos, alterações conhecidas como dislipidemia (TREISTER-GOLTZMAN, 2021; DUNTAS & BRENTA, 2012).

Estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação entre níveis alterados de HTs, como baixos níveis de T3 e elevados níveis de TSH, e o aumento do índice de massa corporal (IMC) e da gordura corporal (ASVOLD et al., 2009; KNUDSEN et al., 2005; WALCZAK & SIEMINSKA, 2021). Um estudo demonstrou que a função tireoidiana parece estar reversivelmente relacionada ao *status* de peso com aumento das concentrações de TSH e T3 livre na obesidade. Há dados que demonstram que as alterações dos HTs na obesidade sugerem um processo de adaptação. Uma vez que a rápida perda de peso está associada a uma diminuição de TSH e T3, como consequência há uma diminuição do gasto energético de repouso, o que pode contribuir para as dificuldades em se manter a perda de peso (REINEHR et al., 2008).

Citrus Aurantium

O *Citrus aurantium*, pertencente ao gênero *Citrus* (Rutaceae), é uma árvore frutífera de origem oriental com tamanho médio, que pode atingir de 5 a 10 metros de altura. Suas folhas são ovais, coriáceas e verde-escuras, com uma característica odorífera cítrica quando esmagadas. As flores são brancas, aromáticas e solitárias, geralmente florescem na primavera e são utilizadas popularmente como um sedativo leve. Os frutos do *Citrus aurantium* são globosos, com casca rugosa e cores alaranjadas quando maduros. Eles são geralmente amargos, daí o nome comum da

planta, laranja-amarga, laranja-azeda ou laranja-de-sevilha (Figura 6) (ARBO, 2008; FUGH-BERMAN & MYERS, 2004; DE OLIVEIRA, 2017; SUNTAR et al., 2018).

Figura 6 - Ilustração taxonômica de *Citrus aurantium*.



Fonte: Acervo Köeler's Medizinal Pflanzen

Uma análise química dos componentes do *Citrus aurantium* revela a presença de diversos compostos ativos. Os frutos contêm flavonoides, como hesperidina e neohesperidina, que são antioxidantes naturais. Além disso, são ricos em óleos essenciais, compostos principalmente como limoneno, linalol e geraniol, que conferem o aroma característico. As flores também contêm óleos essenciais, incluindo geraniol, linalol e nerol. A casca do fruto é rica em sinefrina, um alcaloide adrenérgico que tem despertado interesse na pesquisa científica (SUNTAR et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017).

As folhas, raízes, frutos, cascas e flores dessa espécie têm sido relatadas na medicina tradicional para o tratamento de tosse, bronquite, dor de ouvido, dor de estômago, vômito, hipotensão, disenteria, diarreia, dor abdominal e febre (SURYAWANSHI, 2011; KARTHIKEYAN, 2014; PERIYANAYAGAM et al., 2013). A planta também é amplamente utilizada na medicina popular como antiescorbútico,

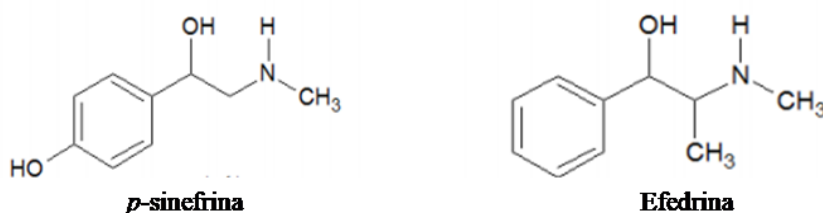
antiespasmódico, anti-hemorrágico, colagogo, cosmético, digestivo, febrífugo, hipnótico, sedativo, tônico e vermífugo (CARVALHO-FREITAS & COSTA, 2002; FUGH-BERMAN & MYERS, 2004; OLIVEIRA et al., 2017).

É notória a busca por soluções promissoras para auxiliar no controle da obesidade e de suas disfunções. Uma das alternativas eficazes seria a utilização de plantas medicinais ou de metabolitos secundários produzidos por elas, podendo gerar efeitos antiobesidade eficazes e com menos efeitos adversos. Nesse contexto, estudos têm destacado o potencial do *Citrus aurantium* como um fitoterápico que pode auxiliar na perda de peso (VERPEUT et al., 2013; HAAZ et al., 2006; PARK et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2017).

Pesquisas apontam que o extrato da casca do fruto imaturo de *Citrus aurantium* contém aminas adrenérgicas, como a sinefrina sendo o principal princípio ativo, a octopamina e a tiramina, que possuem efeito simpatomimético. Essas aminas atuam nos receptores adrenérgicos alfa e beta, estimulando a lipólise, aumentando a taxa metabólica basal e promovendo a oxidação de gordura através do incremento da termogênese (FUGH-BERMAN & MYERS, 2004; OLIVEIRA et al., 2017; SUNTAR et al., 2018; PARK et al., 2019).

A sinefrina, é um alcaloide que, isoladamente, vem sendo usado como um alternativo à efedrina, que ganhou popularidade no tratamento da obesidade e encontra-se presente na formulação de diversas preparações disponíveis comercialmente. Esse aumento no uso da sinefrina isolada se deu após a proibição do uso de efedrina em suplementos alimentares, em 2004. O órgão governamental americano *Food and Drug Administration* (FDA) proibiu o uso da efedrina devido à associação clínica com problemas cardíacos e o sistema nervoso central. Já a sinefrina, apesar de sua similaridade estrutural com a efedrina e seus supostos efeitos lipolíticos que ocorrem via adrenoreceptores β_3 , parece não causar tais efeitos adversos (FUGH-BERMAN et al., 2004; PEIXOTO et al., 2012; SUNTAR et al., 2018). (Figura 7)

Figura 7 - Comparação da estrutura química da p-sinefrina e efedrina.



Legenda: *para*- sinefrina (*p*-sinefrina).
 Fonte: adaptado de ARBO et al., 2008.

Em estudo anterior do nosso grupo utilizando o mesmo modelo de programação e o tratamento, os animais superalimentados tratados com *Citrus aurantium* contendo 6% de sinefrina apresentaram redução da massa de gordura total e visceral, apesar de não reverterem completamente o ganho de peso associado à superalimentação. Esse mesmo estudo também obteve como resultado uma diminuição do peso do TAM com reversão do branqueamento neste tecido somado ao aumento na expressão gênica de UCP1 e maior função mitocondrial, sem alterações na pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica ou frequência cardíaca. Também foi observado uma diminuição no peso do TAB, normalização da hipertrofia do adipócito e um aparente amarronamento do depósito subcutâneo de gordura (dados em análise). Além disso, houve normalização dos níveis de leptina, que, conhecidamente, também tem um efeito sobre a função tireoidiana (GUIMARÃES, 2020).

Fitoterápicos e função tireoidiana

Alguns produtos naturais utilizados para controle de peso corporal apresentam ação sobre a função tireoidiana já demonstrada. Em um estudo, com ratos adultos machos, tratados com extrato aquoso de canela (*Cinnamomum spp.*), foi demonstrado que o tratamento resulta em redução da concentração sérica de T3 e promove alterações importantes nos ventrículos cardíacos em associação com diminuição da sinalização local dos HTs. Além disso, o extrato de canela reduziu a

atividade hepática da enzima glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (GPDm), podendo afetar o metabolismo da glicose (GAIQUE et al., 2016).

A piperina derivada do *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), administrada via oral por 15 dias em camundongos machos adultos, reduziu a atividade da D1 hepática e os níveis séricos de T3 e T4 tanto em altas quanto baixas doses da substância. Estudos sugerem que a piperina tem um efeito supressor direto sobre a tireoide em doses mais altas, mas em doses mais baixas, inibe diretamente o metabolismo periférico dos HTs mediado pela D1 no fígado (PANDA & KAR, 2003a; 2003b; OLIVEIRA, 2019).

O resveratrol é um polifenol encontrado em alimentos como uvas, frutas vermelhas e amendoim, bem como no vinho tinto, e utilizado em suplementos para emagrecimento. Sua administração em ratos machos adultos por 14 dias reduziu a expressão da proteína NIS, reduzindo a captação de iodo pela tireoide, sem efeitos significativos no crescimento da tireoide ou nas concentrações de TSH e HTs (GIULIANI et al., 2014). Em outro estudo, o tratamento de ratos machos adultos com resveratrol por 60 dias promoveu aumento da massa tireoidiana e maiores níveis séricos de TSH, sem alterar a concentração sérica de HTs, e as análises histológicas mostraram aumento do número de folículos, com menores concentrações de tireoglobulina no coloide (GIULIANI et al., 2017). Esses dados sugerem que o resveratrol provoca um efeito inibidor da função tireoidiana direto e um leve efeito bociogênico quando administrado por um longo período.

A síntese normal do HT requer iodeto e, nesse sentido, a alga marinha rica em iodo, *Fucus vesiculosus*, vem sendo utilizada na medicina alternativa para emagrecimento e como fonte de iodo. Estudos demonstram que o extrato da alga tem ação sobre a função tireoidiana e um destes estudos demonstrou aumento do nível sérico de T3, redução de T4 e TSH, além de alterações histológicas na glândula que sugerem hiperatividade (HAMEED et al., 2014).

Salsão ou aipo (*Apium graveolens*) é uma erva da família das *Apiaceae* e uma boa fonte de vitamina C, riboflavina, vitamina B6, ácido pantotênico, beta-caroteno e manganês. Além disso, apresenta atividades antiinflamatórias e antioxidantes e vem sendo usado por seus efeitos anti-hipertensivos, diuréticos, antifúngicos, antiobesidade, anticonvulsivantes, anticancerígenos e hepatoprotetores (MONICA & DIANA, 2021). Relatos de casos demonstram que o consumo do extrato de aipo em pó para perda de peso levou a um quadro de hipertireoidismo, que é

reversível após a interrupção do seu uso (MALJAEI et al., 2019; ROUHI-BOROUJENI et al., 2016). Outro estudo realizado em ratos Wistar machos mostrou que o tratamento com extrato de aipo diminui os níveis séricos de T3 e T4 e aumenta o TSH (KOOTI et al., 2014).

Outro estudo aponta efeitos do uso de três plantas sobre a função tireoidiana, a *Bacopa monnieri*, *Aegle marmelos* e *Aloe vera*. Foi evidenciado que a *Bacopa monnieri* apresentou efeito estimulador a nível glandular, estimulando a síntese/secreção de T4. Enquanto a *Aegle marmelos* e a *Aloe vera* apresentaram efeitos inibitórios e reduziram os níveis séricos de T3 e T4, tendo *Aegle m.* maior potencial inibitório podendo ser comparada ao efeito do medicamento Propiltiouracil (KAR et al., 2002).

Sendo assim, a utilização de fitoterápicos pode gerar alterações significativas na função tireoidiana. Nosso grupo demonstrou, recentemente que o tratamento com *Citrus aurantium* promove um aumento significativo nos níveis de HTs circulantes, se fazendo necessário entender melhor os impactos do uso do Citrus sobre a função tireoidiana e seu impacto sobre o coração.

1. OBJETIVO

1.1. Objetivo geral

Avaliar o metabolismo tireoidiano em camundongos adolescentes obesos, programados pela redução do tamanho da ninhada, tratados com *Citrus Aurantium L* ou sinefrina.

1.2. Objetivos específicos

Avaliar em camundongos adolescentes obesos, programados pela redução do tamanho da ninhada, o efeito do *C. aurantium* e da sinefrina sobre:

- a) Massa corporal;
- b) Composição corporal;
- c) Pressão arterial e frequência cardíaca;
- d) Concentrações séricas de T3 e T4;
- e) Expressão do receptor TR β no fígado;
- f) Expressão do receptor TR α no TAM e coração;
- g) Expressão da desiodase tipo 2 e do receptor β 3 adrenérgico no TAM e coração;
- h) Expressão da desiodase tipo 1 no fígado;
- i) Expressão da GPDm hepática;
- j) Expressão das cadeias pesadas de miosina α e β no coração;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Modelo experimental

O desenho experimental foi submetido à Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais da UERJ (CEUA) com o registro CEUA/014/2023 (Anexo A). Camundongos suíços do sexo masculino e fêmeas nulíparas, com 3 meses de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento, foram acasalados na proporção de 2 fêmeas para 1 macho. As fêmeas prenhes foram alojadas individualmente em gaiolas, seguindo o ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente controlada de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Elas receberam água e ração comercial padrão *ad libitum*. Após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para conter 9 filhotes por lactante (Figura 8).

Três dias após o nascimento, os camundongos foram divididos em 2 grupos, sendo eles: o grupo superalimentado (SL), o qual foi submetido a redução do tamanho da ninhada para 3 filhotes/mãe afim de induzir a programação por superalimentação pós-natal precoce; e o grupo controle (NL) que permaneceu com 9 filhotes/mãe até o desmame (PND21).

No 21º dia de vida (desmame), as proles do grupo SL foram subdivididas em grupos com oito camundongos cada, conforme detalhado abaixo e resumido na Tabela 2. O grupo NL se manteve apenas um e foi tratado com veículo (água) (NL).

- Grupo SL subdividiu-se em:

- a) Grupo superalimentado tratado com veículo (água) (SL);
- b) Grupo superalimentado tratado com *C. aurantium* padronizado em 6% de sinefrina (SL-CA6%);
- c) Grupo superalimentado tratado com *C. aurantium* padronizado em 30% de sinefrina (SL-CA30%);
- d) Grupo superalimentado tratado com sinefrina isolada (SL-Syn).

Tabela 2 - Subdivisões dos grupos SL e NL após 21 dias de vida

Nome do grupo	Sigla do grupo
Superalimentado tratado com veículo (água destilada)	SL
Superalimentado tratado com <i>C. aurantium</i> padronizado em 6% de sinefrina	SL-CA6%
Superalimentado tratado com <i>C. aurantium</i> padronizado em 30% de sinefrina	SL-CA30%
Superalimentado tratado com sinefrina isolada	SL-Syn
Controle tratado com veículo (água destilada)	NL

Fonte: A autora, 2023.

Para o desenvolvimento do modelo, utilizamos apenas camundongos suíços do sexo masculino para todos os grupos. O tratamento ocorreu do 30 ° até 49 ° dia de vida, contabilizando 19 dias de tratamento. Os animais receberam as doses de *C. aurantium* e Sinefrina descritas na Tabela 3 por meio de gavagem intragástrica. Esse modelo traz a oportunidade de estudo da fase crítica da adolescência pois promove uma obesidade precoce e que persiste até a idade adulta.

Tabela 3 - Tratamentos administrados por via oral (gavagem) com suas respectivas doses

Tratamento	Dose
<i>C. aurantium</i> padronizado em 6% de sinefrina	25 mg/ kg de peso/dia
<i>C. aurantium</i> padronizado em 30% de sinefrina	5 mg/kg de peso/dia
Sinefrina isolada	1,5 mg/kg de peso/dia

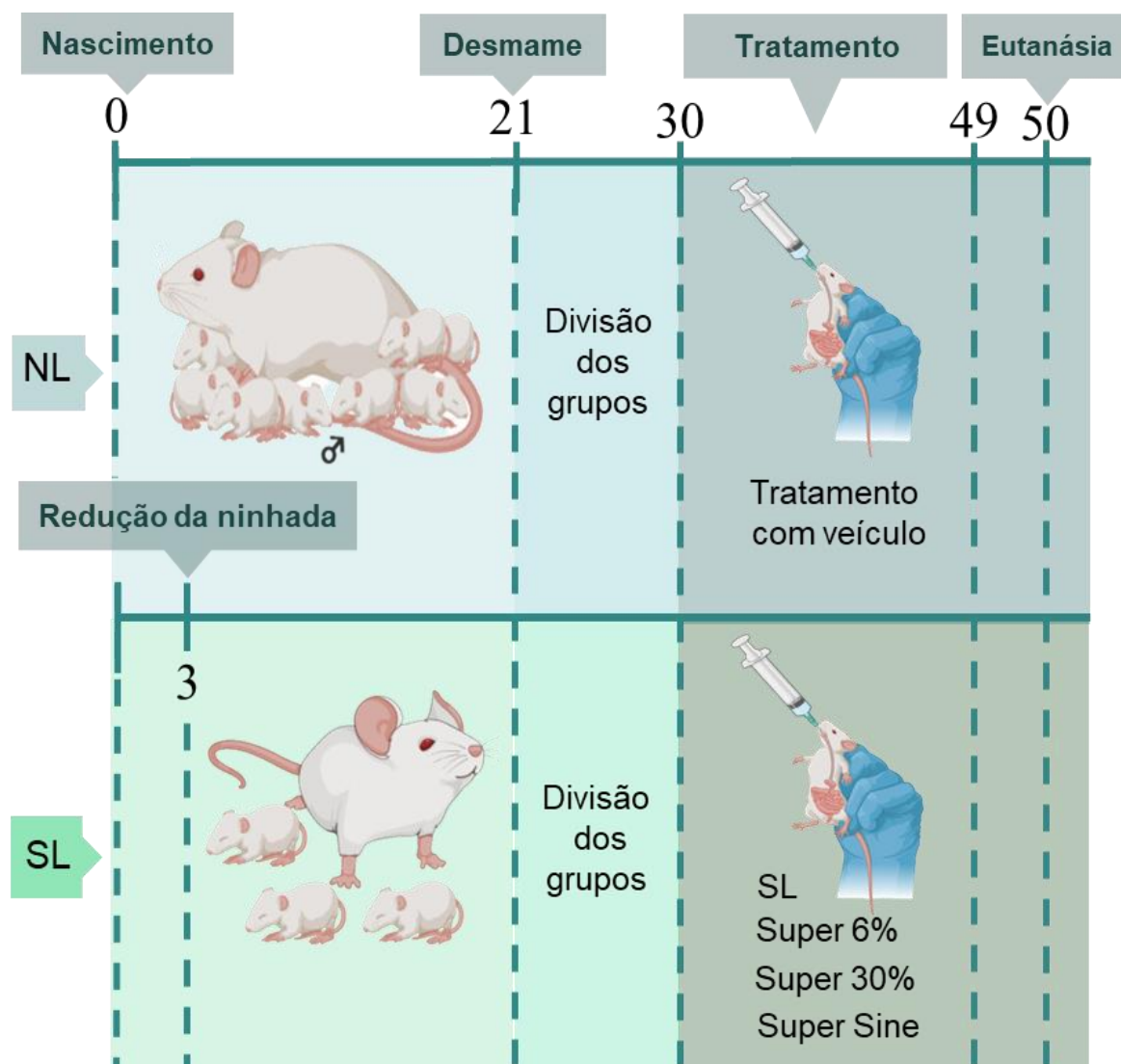
Legenda: miligrama (mg); quilograma (kg).

Fonte: A autora, 2023

Com o objetivo de estabelecer a dose de 1,5 mg/kg de peso/dia de sinefrina em ambos os tratamentos, os grupos *Citrus aurantium* L. padronizado em sinefrina (6% e 30%) tiveram suas doses do extrato ajustadas. Com isso, apesar do tratamento ter sido realizado com doses diferentes de extrato de *Citrus aurantium* L.,

ambos apresentam a mesma quantidade de sinefrina (1,5 mg/kg de peso/dia), que é o princípio ativo de interesse no presente estudo.

Figura 8 – Desenho experimental



Legenda: animais machos (♂); grupo superalimentado (SL); grupo superalimentado tratado com *C. aurantium* padronizado em 6% de sinefrina (SL-CA6%); grupo superalimentado tratado com *C. aurantium* padronizado em 30% de sinefrina (SL-CA30%); grupo superalimentado tratado com sinefrina isolada (SL-Syn); grupo controle (NL).

Fonte: A autora, 2023

As doses utilizadas de *C. aurantium* e sinefrina utilizadas no tratamento foram embasadas nas descrições de Deshmukh et al. (2017), que estabeleceram uma relação entre a dose em seres humanos e a dose em ratos. Segundo o estudo, 100 mg/dia de sinefrina em um indivíduo humano com peso corporal de 70 kg equivale a

aproximadamente 9 mg de sinefrina/kg de peso/dia em ratos. Portanto, a dose equivalente para humanos do extrato de *C. aurantium*, padronizado em 50% de sinefrina, é de 18 mg/kg de peso/dia para ratos, servindo como base para o cálculo das doses utilizadas no presente estudo.

Aos 50 dias de vida, após jejum de 6h (07:00-12:00h), os animais foram anestesiados com avertin (2,2,2 – Tribromoethanol, 2-methyl-2-butanol – 0,02ml/g de peso) e eutanasiados por punção cardíaca. O soro e tecidos foram coletados, pesados em balança digital (Adventurer-Ohaus) e armazenados em freezer -80°C e/ou -20°C para análises posteriores.

2.2. Obtenção do *Citrus aurantium* L. e da sinefrina isolada

O extrato seco de *C. aurantium* padronizado em 6% de sinefrina e *C. aurantium* padronizado em 30% de sinefrina foram adquiridos da Farmácia de Manipulação Caminhoá com procedência da China, lote e número 206171201 e HK18050201, respectivamente. Os certificados de análise dos extratos encontram-se em anexo (Anexo B e Anexo C). A sinefrina isolada foi adquirida da marca Sigma Aldrich com lote 99889861 e referência do produto PHL89386 – 100mg.

2.3. Avaliação da massa corporal

Durante o período da lactação (até os 21 dias de vida), os animais foram pesados diariamente. Após o desmame, os animais foram pesados a cada 3 dias em mini balança digital (Professional digital tablescale MOD 1200).

2.4. Avaliação da composição corporal

Para análise da composição corporal utilizamos o método de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com corpo inteiro (Minispec LF90 TD-NMR, Bruker, Rheinstetten, Alemanha) no período pré-tratamento (antes dos 30 dias de vida) e pós-tratamento (após os 49 dias de vida) para avaliação da massa adiposa total. Os animais não anestesiados foram colocados em um cilindro de plástico transparente e mantidos imóveis devido a inserção de um êmbolo bem apertado no cilindro. Logo

após, o cilindro com o animal foi inserido na câmara da RMN, permanecendo durante o exame por aproximadamente 2 minutos. Os dados foram expressos em gramas (g) de massa adiposa.

2.5. Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

Durante o tratamento, avaliamos a pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca por método não invasivo (Tail-cuff plethysmograph-LE5001 Panlab, Barcelona, Spain). Os animais foram aclimatados por 2 dias. Ao final do período de aclimação, os animais foram submetidos novamente ao procedimento. As medições desses 3 dias foram registradas e calculadas suas médias.

2.6. Avaliação da expressão de RNAm

Para avaliação da expressão de RNAm foram realizadas as etapas de extração de RNA total, síntese do DNA complementar (cDNA) e reação de polimerização em cadeia em tempo real (RT-PCR) descritas a seguir.

2.6.1. Extração de RNA total

Para a extração de RNA foi utilizado o kit RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). Sendo utilizado o protocolo e os reagentes fornecidos pelo kit. Inicialmente, as amostras com aproximadamente 30 mg foram homogeneizadas com 300 µl de Tampão RLT utilizando microesferas (beads) e o equipamento disruptor de células e tecidos L-BEADER. Após a homogeneização, foram adicionados 590 µl de água livre de RNase, em seguida, foram adicionados 10 µl de solução de proteinase K e misturados bem por pipetagem, depois os homogenatos foram incubados a 55°C por 10 min e centrifugados a 15–25°C por 3 min a 10.000 rcf. Após isso, foi pipetado 800 µl do sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga de 2 ml e adicionado 0,5 volumes, 400 µl de etanol (96–100%) ao lisado limpo e misturado bem por pipetagem. Posteriormente, foi transferido 700 µl da amostra para uma coluna giratória RNeasy Mini colocada em um tubo de coleta de 2 ml e foi centrifugada a 15–25°C por 15 s a ≥ 8000 rcf, depois o fluxo foi descartado, em seguida, essa etapa

foi repetida utilizando o resto da amostra e novamente fluxo foi descartado. Após isso, foi adicionado 350 µl de Buffer RW1 à coluna de rotação RNeasyMini e centrifugada a 15–25°C por 30 s a ≥ 8000 rcf para lavar a membrana, depois o fluxo foi descartado. Então, foi misturado 10 µl de solução estoque de DNase com 70 µl de tampão Buffer RDD e foi adicionado à membrana RNeasy e incubado por 15 min a 20–30°C. Posteriormente, foi adicionado 350 µl de Buffer RW1 à coluna de rotação RNeasy Mini e centrifugado por 15 s a ≥ 8000 rcf a 15–25°C, depois o fluxo foi descartado. Posteriormente, foi adicionado 500 µl de Buffer RPE à coluna de rotação RNeasy Mini e centrifugado a 15–25°C por 15 s a ≥ 8000 rcf para lavar a membrana, depois o fluxo foi descartado novamente. Então, foi adicionado 500 µl de Buffer RPE à coluna de rotação RNeasy Mini e centrifugado a 15–25°C por 2 min a ≥ 8000 xg para lavar a membrana, depois o fluxo foi descartado e a coluna de rotação RNeasy Mini foi centrifugado novamente a 15–25°C por 1 min a ≥ 8000 rcf. Após a centrifugação, foi colocado a coluna RNeasy Mini spin em um novo tubo de coleta de 2 ml e adicionado 40 µl de água livre de RNase diretamente à membrana da coluna RNeasy Mini, e depois, foi centrifugado por 2 min a ≥ 8000 rcf a 15–25°C.

Para a análise da integridade do RNA extraído, todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 2% (contendo 1,5 µl de Gel RedBiotium), permitindo a visualização das subunidades 28 S e 18 S do RNA em luz ultravioleta (U.V).

A quantificação de RNA extraído das amostras foi realizado com auxílio espectrofotômetro (NonoVue Plus) que forneceu as razões de absorbâncias 260/280 nm, que indicam contaminação por ácidos nucleicos e proteínas, e as absorbâncias de 260/230 nm, que indicam contaminação por sais e solventes. As amostras de RNA foram consideradas puras (livres de contaminação) quando a razão da absorbância de 260/280 nm e 260/230 nm estavam entre 1,8-2,2. Todas as amostras de RNA extraídas foram armazenadas a -80°C.

2.6.2. Síntese do cDNA

Para obtenção do cDNA foi realizado o cálculo total da reação: 20 µl (5,8 µl de mix + 14,2 µl de amostra diluída). Assim, foi adicionado a quantidade calculada de amostra necessária para ter concentração de 3 µl de RNA por amostra de tecido e de água calculada para dar 14,2 µl total em cada tubo. Depois foi realizado o

preparo do mix (Kit Transcriptase Reversa High Capacity – Thermo Fisher Scientific) 10X RT buffer - 2 µl; 25X dNTP mix (100mM) – 0,8 µl; 10X RT Random Primers - 2 µl; MultiScribe Reverse Transcriptase – 1 µl, gerando um total de 5,8 µl para cada tubo. Posteriormente os tubos foram centrifugados por 15 s a ≥ 8000 rcf a 15–25°C. Após isso, foi utilizado o kit de transcrição reversa (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific), contendo sondas para preparação de 2 mix distintos, sendo aplicado 5 µl do Mix 1(Buffer 10x + DNTP 25x + Random + Nuclease-Free Water) no controle negativo sem amostra (C-) e no controle negativo sem enzima (RT-) e 5 µl do Mix 2 (Transcriptase + Nuclease-Free Water) apenas no C-. As amostras foram incubadas no termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well ThermalCycler), de acordo com a especificação do protocolo do fabricante (Thermo Fisher). Posteriormente, as amostras, C- e RT- foram armazenados a -80°C.

2.6.3. Reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real)

Para a etapa de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real) foi utilizado TaqMan Thermo Fisher Scientific. Segue abaixo, a tabela 4 que apresenta os genes com as referências das sequências específicas, incluindo o gene GAPDH, utilizado como controle interno.

Tabela 4 - Ensaio de expressão gênica e referências das sequências de iniciadores específicos utilizados no PCR em tempo real

Proteína	Símbolo do Gene	Ensaio de expressão gênica TaqMan®	Referência da Sequência	Tecido analisado
β3-AR	<i>Adrb-3</i>	Mm02601819_g1	NM_013462.3	Fígado
GAPDH	<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	NM_001289726.1	Fígado, Coração
36B4	<i>Rplp0</i>	Mm00725448_s1	NM_007475.5	TAM
THRβ	<i>Thrb</i>	Mm00437044_m1	NM_001113417.1	Fígado e TAM
THRα	<i>Thra</i>	Mm00579691_m1	NM_178060.3	Coração
GPDM	<i>Gpd2</i>	Mm00439082_m1	NM_001145820.1	Fígado

DIO 1	<i>Dio1</i>	Mm00839358_m1	NM_007860.3	Fígado
DIO 2	<i>Dio2</i>	Mm00515664_m1	NM_010050.2	TAM
MHC β	<i>Myh7b</i>	Mm01249941_m1	NM_001085378.2	Coração
MHC α	<i>Myh6a</i>	Mm00440359_m1	NM_001164171.1	Coração

Legenda: Receptor beta 3 adrenérgico ($\beta 3$ -AR); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH); proteína ribossômica (36B4); receptor de hormônio tireoidiano beta (THR β); receptor de hormônio tireoidiano alfa (THR α); glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (GPDm); desidase tipo I (DIO 1); desidase tipo 2 (DIO 2); cadeia pesada de miosina beta (MHC β); cadeia pesada de miosina alfa (MHC α).

Primeiramente, a análise foi realizada de acordo com o protocolo do equipamento de PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System). O volume 6 μ l do Mix (Master Mix Taqman Fast - 3 μ l + RNase free water - 2,75 μ l + Primer - 0,25 μ l) foi adicionado à placa de reação juntamente com 4 μ l de cada amostra de cDNA (em triplicata), totalizando 10 μ l em cada poço da placa. O C- e o RT- obtido na etapa anterior, também foram utilizados nessa etapa.

O PCR em tempo real é uma técnica baseada na reação em cadeia da polimerase com um sistema de fluorescência capaz de detectar a reação de amplificação do gene de interesse. Inicialmente ocorre uma desnaturação inicial de 95°C por 20 minutos. Depois disso, as reações ocorreram em 40 ciclos: 95° C por 3 minutos e 60° C por 30 minuto. Os genes foram analisados pelo método CT Comparativo (método 2 - $\Delta\Delta CT$).

2.7. Dosagem sérica dos hormônios tireoidianos

A dosagem circulante de leptina foi realizada no soro dos animais obtidos após centrifugação do sangue. O soro obtido foi armazenado em freezer -20° C e realizado a dosagem por kit de Elisa (EMD Millipore Corporation). A leitura ocorreu no equipamento de leitura de placas (PerkinElmer EnVision Wallac- 2104 Multilabel Reader), seguindo as informações do fabricante. A sensibilidade deste ensaio é de 0,05 ng/mL e a variação de intra-ensaio é de 1,48 %.

2.8. Análises estatísticas

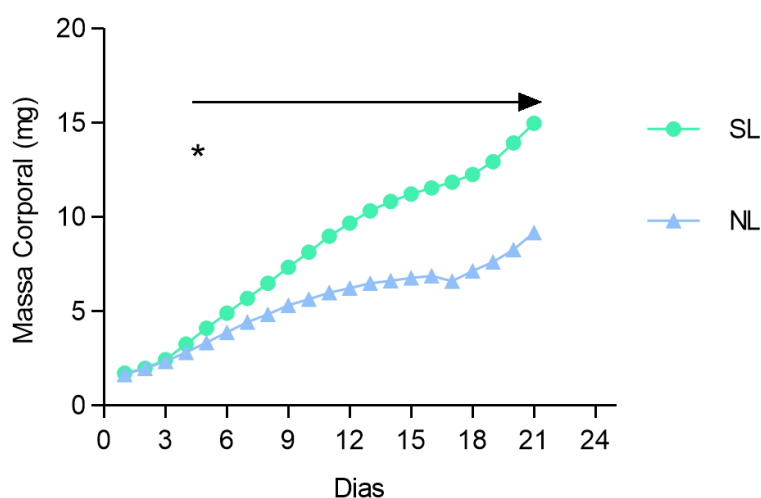
Os dados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 8 e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a análise estatística dos resultados pré-tratamento com *C. aurantium* e sinefrina (evolução da massa corporal no período da lactação e composição corporal por RMN aos 30 dias de vida) foi utilizado somente o teste *t de Student* não pareado. Para as demais análises, foi realizada também a análise de variância univariada (*One-way ANOVA*) seguida de Teste Tukey's múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da massa corporal, composição de gordura corporal e ganho de peso

Foi observado que a prole submetida à superalimentação pós-natal pela redução da ninhada durante o período da lactação (grupo SL) apresentou maior massa corporal desde o quarto dia de vida, sendo que esta diferença permaneceu até o desmame (Figura 9).

Figura 9 - Evolução do ganho de massa corporal no período da lactação (até 21 dias) de animais controle e submetidos à superalimentação pós-natal precoce.

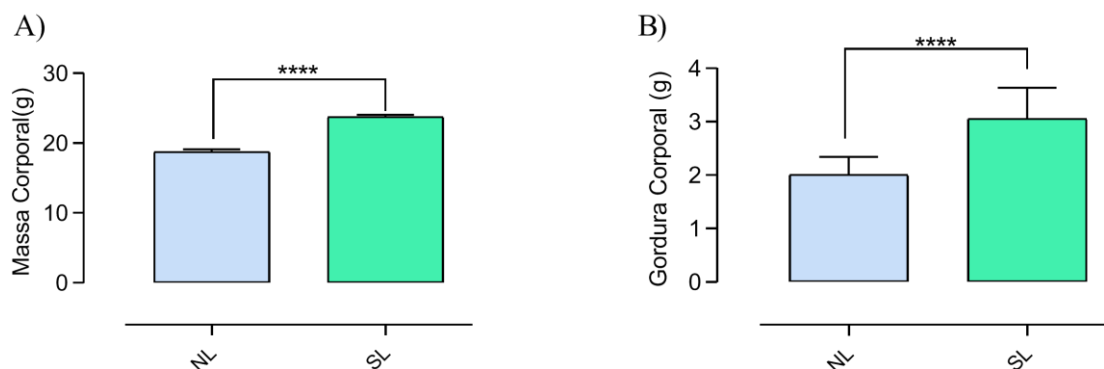


Legenda: Evolução do ganho de massa corporal durante o período de lactação (21 dias) de animais controles (NL) e animais submetido à superalimentação (SL). Valores expressos como $\pm$ EPM (n=70-54 animais/grupo). * $p < 0,05$ Vs NL.

Aos 30 dias de vida, ao avaliar a composição corporal dos animais por RMN, foi observado que o grupo SL apresentou maior massa corporal (+23,64%; $p < 0,05$, Figura 10A) e gordura corporal (+51,81%; $p < 0,05$, Figura 10B), confirmando que a

redução da ninhada programou a prole para maior adiposidade na infância e adolescência.

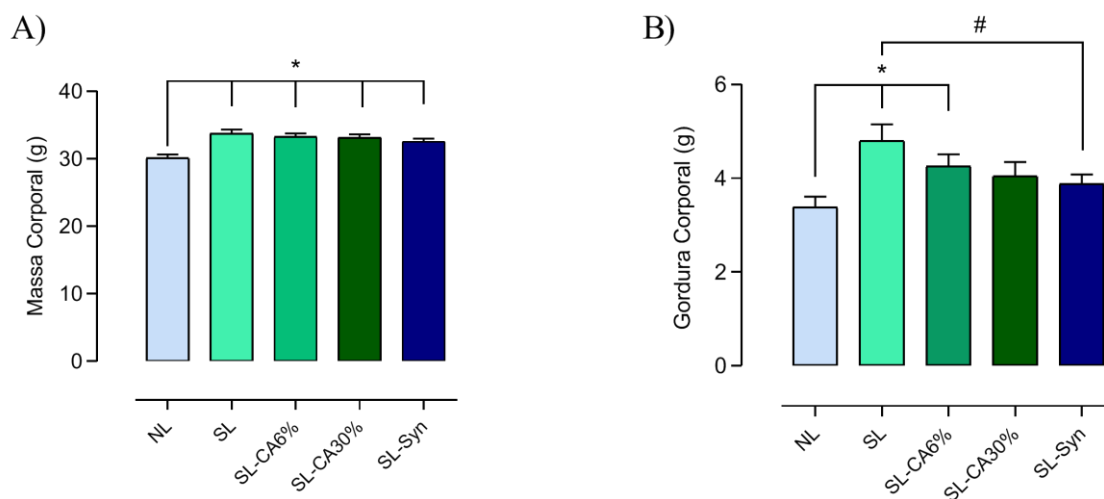
Figura 10 – Massa corporal e gordura corporal aos 30 dias de vida (pré-tratamento com *Citrus aurantium* ou sinefrina) por RMN



Legenda: Massa corporal (A) e gordura corporal (B) por ressonância magnética nuclear aos 30 dias de vida (pré-tratamento) de animais controles e superalimentados. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=7-11 animais/grupo). * $p < 0,05$ Vs NL

Aos 50 dias de vida, no período pós-tratamento, ao avaliar a composição corporal, foi constatado que todos os grupos supernutridos (SL, SL-CA6%, SL-CA30% e SL-Syn) apresentaram maior massa corporal em relação ao grupo NL (+11,94%, +10,45%, +9,85% e +8,06%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 11A). Além disso, foi verificado que os grupos supernutrido (SL) e supernutrido tratado com *Citrus aurantium* padronizado em 6% de sinefrina (SL-C6%) apresentaram maior gordura corporal (+ 25,63% e +41,88%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 11B). Ao comparar o grupo SL com o grupo supernutrido tratado com sinefrina isolada, foi observado menor gordura corporal no grupo SL-Syn (-19,20%; $p < 0,05$, Figura 11B).

Figura 11 – Massa corporal e gordura corporal aos 50 dias de vida (pós-tratamento) por RMN

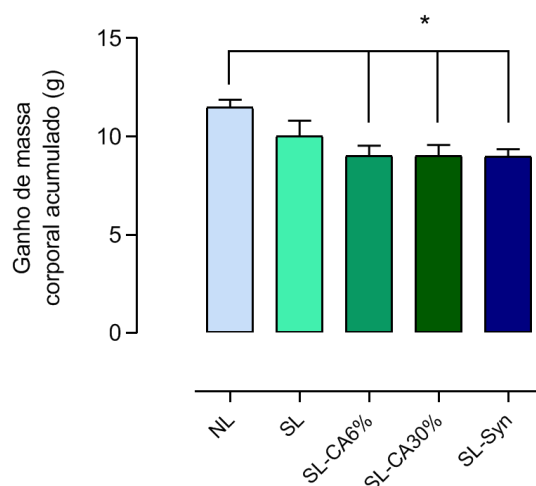


Legenda: Massa corporal (A) e gordura corporal (B) por ressonância magnética nuclear aos 50 dias de vida (pós-tratamento) de animais controles e superalimentados submetidos ou não ao tratamento com *Citrus aurantium* e sinefrina. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=7-11 animais/grupo).

*p<0,05 Vs NL; # p<0,05 Vs SL.

Os animais, de todos os grupos supernutridos, quando tratados tanto com o *Citrus aurantium* L. quanto com a sinefrina (SL-CA6%, SL-CA30% e SL-Syn), apresentaram menor ganho de massa corporal acumulado dos 30 aos 50 dias de vida (-21,49%, -21,58% e -21,67%, respectivamente; p< 0,05, Figura 12).

Figura 12 – Ganho de massa corporal acumulado durante o tratamento, de 30 até 50 dias de vida

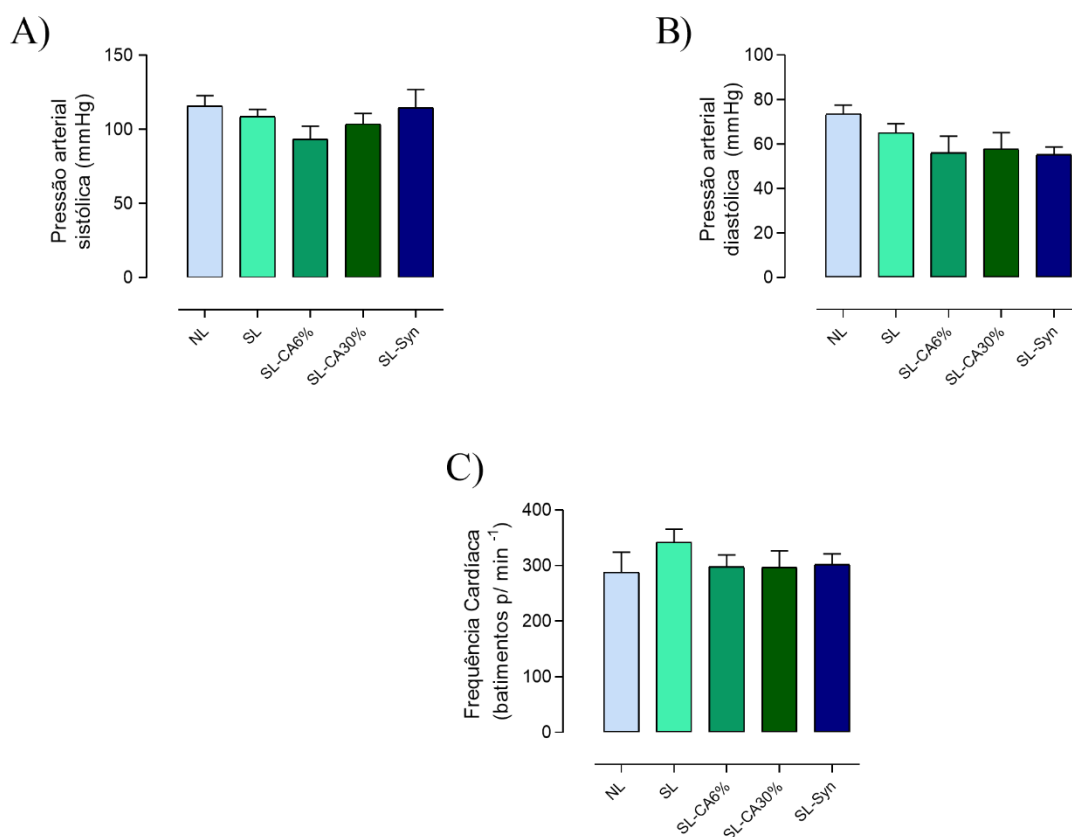


Legenda: Ganho de massa corporal de 30 a 50 dias de animais controles (NL) e animais submetidos à superalimentação (SL) submetidos ou não ao tratamento com *Citrus aurantium* e sinefrina. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=7-11 animais/grupo). *p<0,05 Vs NL.

3.2 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

Não foi apresentada diferença quanto à pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca em todos os grupos estudados (Figura 13)

Figura 13 – Avaliação da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca durante o tratamento com *Citrus aurantium* e sinefrina

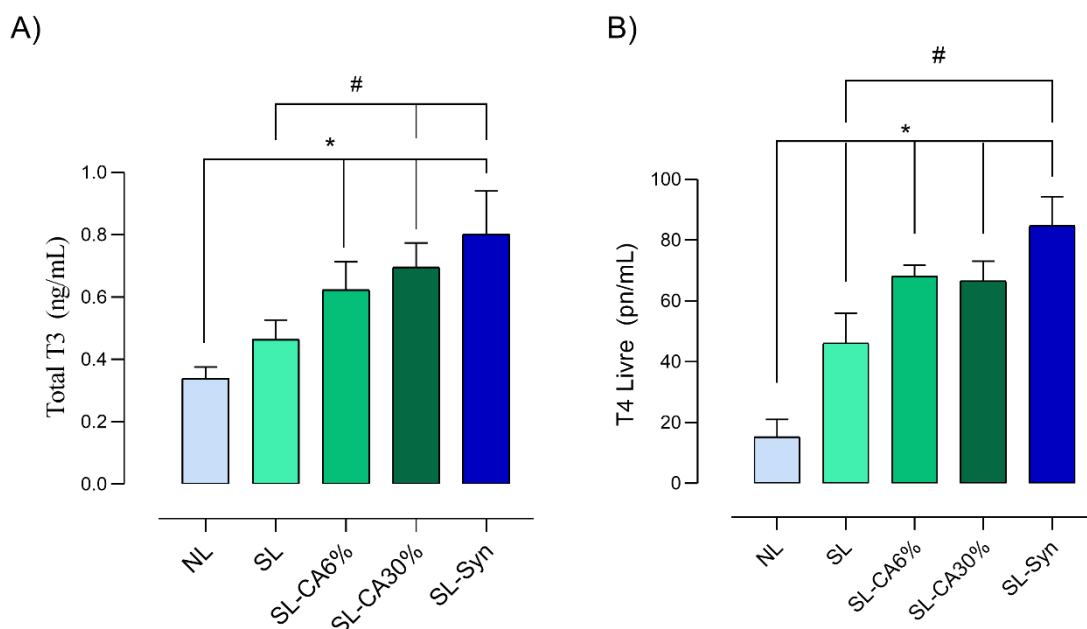


Legenda: Pressão sistólica (A), pressão diastólica (B) e frequência cardíaca (C) durante o tratamento de animais controles e supernutridos submetidos ou não ao tratamento com *C. aurantium* e sinefrina. Valores expressos como média $\pm$ EPM (n=5-8 animais/grupo).

3.3 Dosagem sérica de hormônios tireoidianos

Os animais dos grupos supernutridos tratados com o *Citrus aurantium L.* ou sinefrina (SL-CA6%, SL-CA30% e SL-Syn), apresentaram maior concentração sérica de T3 total em relação ao grupo controle (NL) (+84,03%, +105,19%, e +136,5%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 14A). Todos os grupos de animais supernutridos apresentaram maior concentração sérica de T4 livre em comparação ao grupo controle (+201,89%, +344,90%, +335,36% e +453,92%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 14B). Quando em relação ao grupo supernutrido (SL), os grupos tratados com o *Citrus aurantium L.* padronizado em 30% de sinefrina (SL-CA30%) e com sinefrina isolada (SL-Syn) apresentaram também maior concentração sérica de T3 total (+73%, e +50,1%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 14A); e apenas o tratado com sinefrina isolada apresentou maior concentração sérica de T4 livre +83,48%; $p < 0,05$, Figura 14B).

Figura 14 - Dosagem de T3 total e T4 livre, aos 50 dias de vida, em animais controles e submetidos à superalimentação pós-natal precoce, tratados ou não com *Citrus aurantium L.* ou sinefrina.

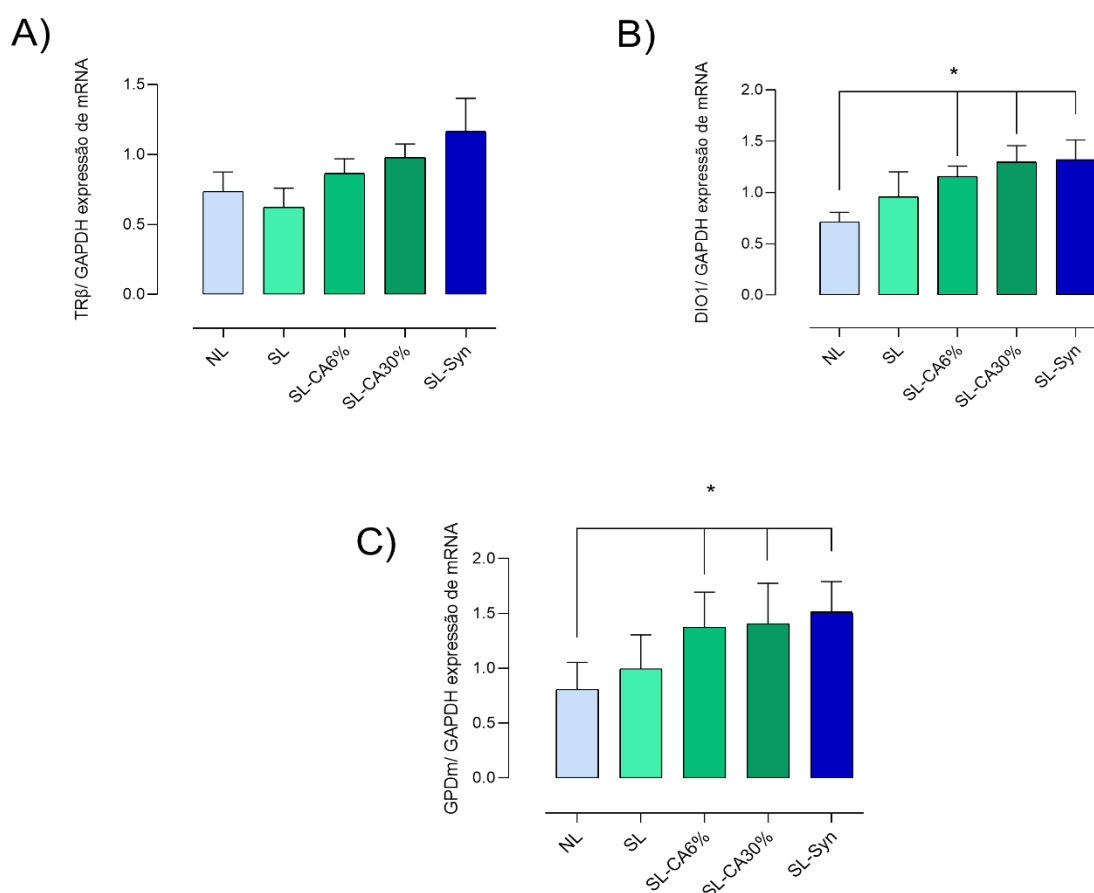


Legenda: Dosagem sérica de T3 total (A) e T4 livre (B) em animais controles (NL) e animais submetidos à supernutrição (SL) submetidos ou não ao tratamento com *Citrus aurantium* e sinefrina. Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n=8-10$ animais/grupo). * $p < 0,05$ Vs NL; # $p < 0,05$ Vs SL.

3.4 Expressão gênica no fígado

Ao analisar o fígado dos animais, foi observado que não houve diferença na expressão de mRNA para o THR β (Figura 15A). Os grupos supernutridos tratados com o *Citrus aurantium* L. ou sinefrina (SL-CA6%, SL-CA30% e SL-Syn) apresentaram maior expressão de mRNA da Dio1 (+62,59%, +82,53%, e +85,48%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 15B) e GPDm (+70,75%, +74,23%, e +87,90%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 15C) quando comparados ao grupo NL.

Figura 15- Avaliação da expressão de mRNA no fígado, aos 50 dias de vida, de animais controles e animais submetidos à superalimentação pós-natal precoce tratados ou não com *Citrus aurantium* L. ou sinefrina.



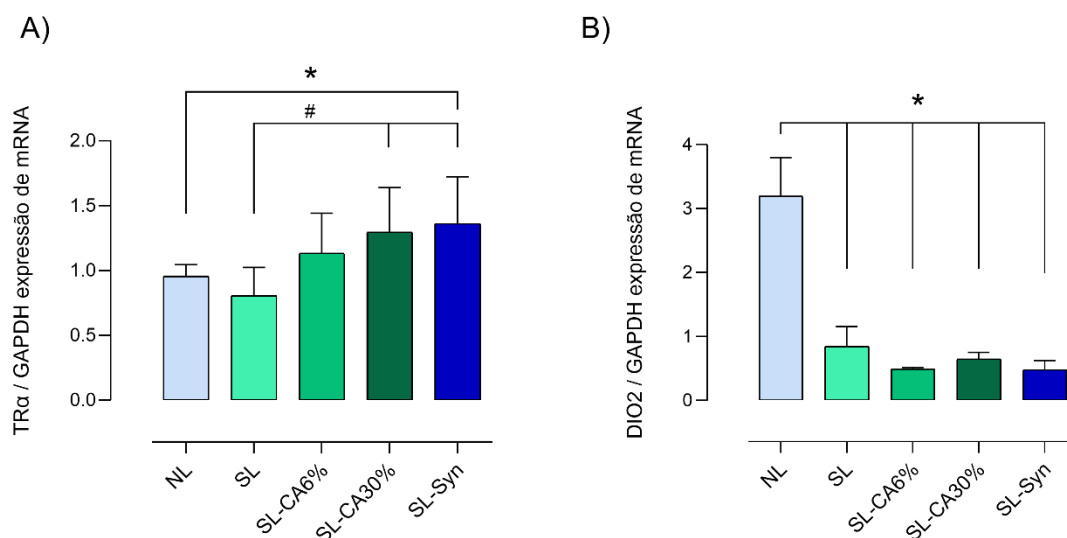
Legenda: Expressão de mRNA em animais controles (NL) e animais submetidos à superalimentação (SL) submetidos ou não ao tratamento com *Citrus aurantium* e sinefrina. THR β (A); DIO1 (B); GPDm (C). Valores expressos como média $\pm$ EPM ($n = 6-8$ animais/grupo). (B)* $p < 0,05$ Vs. NL

3.5 Expressão gênica no tecido adiposo marrom (TAM)

Ao avaliar o TAM, foi observado que o grupo supernutrido tratado com Sinefrina apresenta maior expressão de mRNA do $THR\alpha$ em relação ao grupo controle (NL) (+42,50%; $p < 0,05$, Figura 16A). O grupo supernutrido tratado com *Citrus aurantium* L. padronizado em 30% de sinefrina (SL-CA30%) e o grupo tratado com sinefrina (SL-Syn) apresentaram maior expressão de mRNA do $THR\alpha$ em relação ao grupo supernutrido (SL) no TAM (+61,16% e +69,36%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 16A).

Todos os grupos supernutridos (SL, SL-CA6%, SL-CA30% e SL-Syn), apresentaram menor expressão de mRNA da $Dio2$ no TAM quando comparados ao grupo controle NL (-73,52%, -84,52%, -79,65% e -84,90%, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 16B) (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação da expressão de mRNA no TAM, aos 50 dias de vida, de animais controles e animais submetidos à superalimentação pós-natal precoce tratados ou não com *Citrus aurantium* L. ou sinefrina.



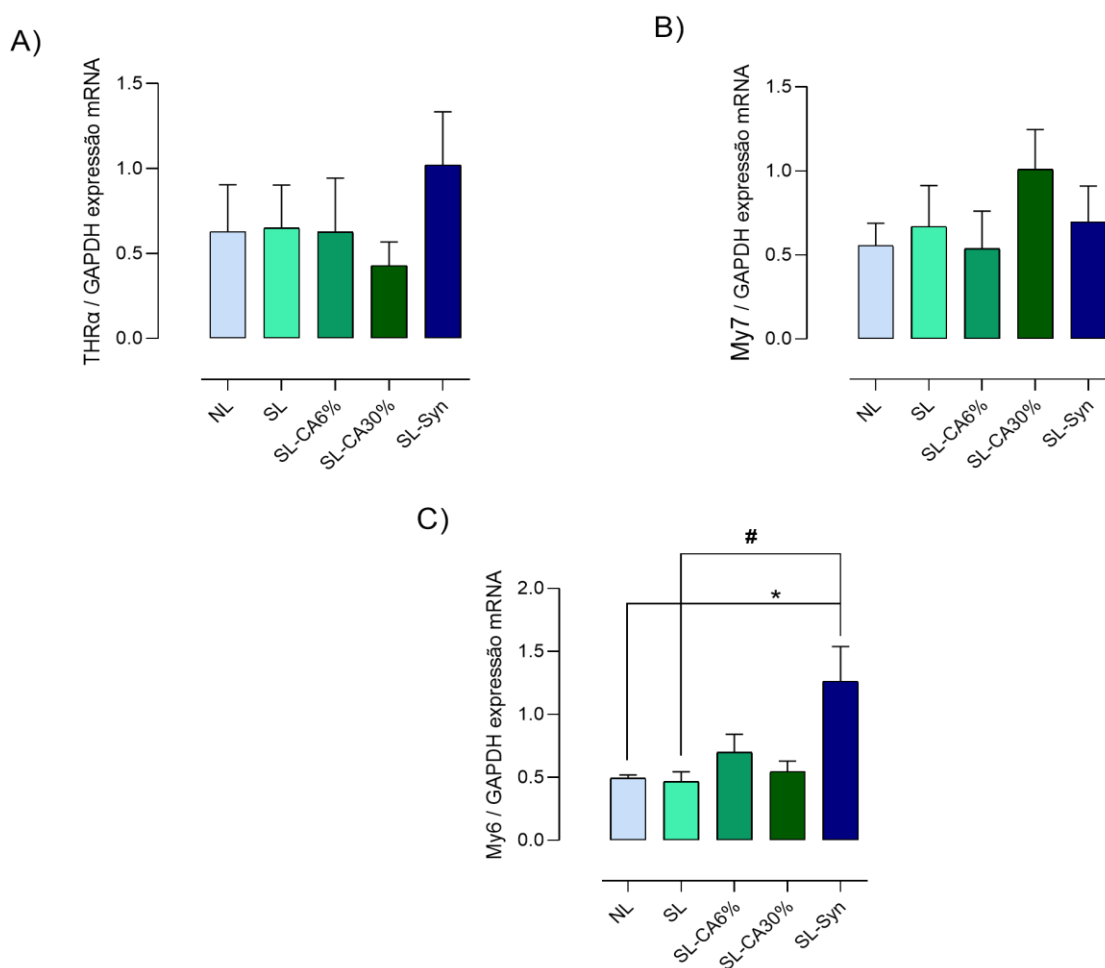
Legenda: Expressão de mRNA em animais controles (NL) e animais submetidos à superalimentação (SL) submetidos ou não ao tratamento com *Citrus aurantium* e sinefrina. $THR\alpha$ (A); $DIO2$ (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM (n= 6-8 animais/grupo). * $p < 0,05$ Vs. NL, # $p < 0,05$ Vs SL.

3.6 Expressão gênica no coração

Não foi observada diferença na expressão de mRNA de $\text{THR}\alpha$ e My7 no coração em todos os grupos analisados (Figura 17A e 17B, respectivamente).

O grupo supernutrido tratado com sinefrina (SL-Syn) apresentou aumento de expressão de mRNA de My6 em relação ao grupo controle (NL) (+156,07%; $p < 0,05$, Figura 17C) e ao grupo supernutrido (SL) (+170,95%; $p < 0,05$, Figura 17C).

Figura 17 - Avaliação da expressão de mRNA no coração, aos 50 dias de vida, em animais controles e submetidos à superalimentação pós-natal precoce tratados ou não com *Citrus aurantium L.* ou sinefrina.



Legenda: Expressão de mRNA em animais controles (NL) e animais submetidos à superalimentação (SL) submetidos ou não ao tratamento com *Citrus aurantium* e sinefrina. $\text{THR}\alpha$ (A); My7 (B); My6 (C). Valores expressos como média $\pm$ EPM (n= 6-8 animais/grupo). $p < 0,05$ Vs. NL; # $p < 0,05$ Vs. SL.

4 DISCUSSÃO

O *Citrus aurantium* L. é conhecido por seu possível potencial terapêutico no controle do peso corporal. No cenário atual, há uma escassez de evidências conclusivas relacionadas à segurança do uso tanto do extrato de laranja amarga quanto do seu princípio ativo com ação termogênica, a sinefrina, que passou a ser utilizada como uma alternativa a efedrina, proibida desde 2004, por causar distúrbios cardiovasculares (KONCZ et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2017). O presente estudo buscou compreender melhor a influência do tratamento com esses compostos sobre o metabolismo dos hormônios tireoidianos e coração em uma fase crítica do desenvolvimento, mas ainda pouco estudada, a adolescência, onde a inserção de um tratamento pode ser eficaz no mecanismo de desprogramação e reversão do quadro de obesidade na idade adulta.

A programação pela supernutrição neonatal pela redução de ninhada promoveu um aumento na massa corporal nos animais desde o quarto dia de vida até a adolescência, o que era esperado uma vez que já foi bem descrito na literatura anteriormente (HABBOU et al., 2012, CONCEIÇÃO et al., 2013). Aos 30 dias de vida, correspondente ao primeiro dia do tratamento com *Citrus aurantium* L. ou sinefrina, os animais do grupo SL também apresentaram maior massa de gordura corporal em relação aos animais controle.

Já no final do tratamento com *Citrus aurantium* L. ou sinefrina, aos 50 dias de vida, não foi observada diferença quanto a massa corporal entre os grupos supernutridos tratados e não tratado. Apesar de não sido verificado efeito dos tratamentos com *C. aurantium* ou sinefrina isolada, ao avaliar a gordura corporal, foi observada uma redução da adiposidade no grupo SL tratado com sinefrina em comparação com o grupo supernutrido não tratado. Assim, apesar de não alterar o peso corporal, a sinefrina foi capaz de reduzir o conteúdo total de gordura corporal. Em um estudo anterior do nosso grupo, também foi verificado uma redução do tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico do grupo SL tratado com *C. aurantium* ou sinefrina em relação ao grupo superalimentado sem tratamento (GUIMARÃES, 2020).

Os animais supernutridos tratados com *C. aurantium* ou sinefrina apresentaram um menor ganho de massa corporal acumulado do início até o final dos tratamentos (30 a 50 dias de vida). Assim, apesar não terem reduzido a massa

corporal, os tratamentos foram capazes de reduzir o ganho de massa corporal nesse período.

A supernutrição neonatal programou maiores níveis plasmáticos de T4 livre nos animais aos 50 dias de idade. O tratamento com *Citrus aurantium* L. e sinefrina aumentou ainda mais os níveis de T4 plasmático, sobretudo no grupo sinefrina, além de terem levado a um aumento significativo nas concentrações de T3 livre. O aumento dos níveis de HTs nos grupos supernutridos tratados com *Citrus aurantium* L. ou sinefrina pode estar relacionado com o efeito emagrecedor dos tratamentos, uma vez que, conhecidamente, os hormônios tireoidianos aumentam o metabolismo energético, sobretudo estimulando a termogênese (RIBEIRO et al 2001; ALVAREZ-CRESPO et al 2016; MARTINEZ-SANCHEZ et al 2017; PETITO et al 2023).

Os HTs podem também aumentar a sinalização β adrenérgica de forma tecido específica, através do aumento do acúmulo de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) em resposta à ativação β adrenérgica e/ou da regulação de proteínas, como a UCP1, também envolvida nessa via de sinalização (ALVAREZ-CRESPO et al 2016; (SILVA & BIANCO, 2008). Os HTs induzem o aumento do número de receptores β_3 adrenérgicos no coração, TAM e TAB (SILVA & BIANCO, 2008). Sendo assim, se faz importante entender a relação entre os tratamentos utilizados no presente estudo, o aumento dos HTs observado e o possível impacto sobre o coração.

A estimulação adrenérgica promove a expressão gênica de enzimas envolvidas na síntese de hormônios tireoidianos, via proteína quinase A (PKA) e AMPC, como a tireoperoxidase (VAISMAN et al., 2004; VONO-TONIOLO & KOPP, 2004). Sendo a sinefrina um agonista β_3 adrenérgico, poderia estar levando a um aumento na produção dos HTs. Rodrigues et al. (2009), utilizando o mesmo modelo de supernutrição por redução de ninhada, observaram aumento nos níveis séricos de T3 e T4 aos 21 dias, porém o oposto foi observado aos 180 dias, quando foi observado um hipotireoidismo com diminuição de T3 total e T4 livre, sem alteração de TSH. Esses resultados, somados aos achados aqui apresentados, sugerem que a função tireoidiana se altera com a idade e que o tratamento pode ter um potencial em prevenir o desenvolvimento do hipotireoidismo aos 180 dias de vida.

Acredita-se que a enzima D1 seja a principal fonte de T3 para a circulação e responsável pela manutenção do seu “pool” plasmático. Zavacki et al. (2005) demonstraram que a D1 é um marcador sensível do estado tireoidiano periférico,

estando aumentada quando os níveis de HTs se encontram também elevados. De fato, foi observado um aumento na expressão gênica de *Dio1* no fígado dos animais SL tratados com *Citrus aurantium* L. ou sinefrina, que também apresentam aumento nos níveis de HTs.

A expressão do RNAm da α GPDm hepática é positivamente regulada por HTs, sendo considerada um importante marcador de sua ação hepática (MRACEK et al., 2005; LISBOA, et al., 2008). Nesse sentido, foi observado um aumento na expressão da α GPDm no fígado dos animais SL tratados com *C. aurantium* ou sinefrina, que também apresentam concentrações elevadas de HTs.

Adicionalmente, este estudo avaliou a expressão gênica dos receptores dos HTs no TAM, coração e fígado. No entanto, somente no TAM foi observada uma alteração, onde o receptor TR α apresentou-se aumentado nos grupos supernutridos tratados com sinefrina e com *C. aurantium* padronizado em sinefrina a 30% quando comparado ao não tratado. O TAM tem como principal função dissipar energia na forma de calor (BIANCO et al., 2013; SPIEGELMAN, 2016). Um dos principais efeitos biológicos dos HTs é a aceleração do metabolismo energético e do turnover de ATP, com resultante transformação e consumo de energia e a produção de calor, sendo assim desempenham um papel fundamental na termogênese obrigatória e adaptativa (SILVA, 1995). Os HTs atuam na termogênese dos adipócitos marrons, aumentando a ação estimuladora da norepinefrina, bem como estimulando o aumento mediado por AMPc da expressão do gene UCP1 (PEPITO et al., 2023). Em um estudo anterior, os animais tratados com *Citrus aurantium* ou sinefrina apresentaram maior expressão de UCP1 (GUIMARÃES, 2020) o que, se somado ao aumento nos níveis de HTs e maior expressão de TR α no TAM, aqui apresentados, sugerem uma clara interação entre o efeito antiobesidade do *Citrus aurantium* ou sinefrina e o status tireoidiano.

Alterações na expressão gênica de DIO2 ou na sua atividade enzimática contribuem para a manutenção homeostática do T3, tanto na circulação quanto em tecidos específicos (GEREBEN et al, 2008; YEN, 2001). No presente estudo, foi observada uma menor expressão de DIO2 no TAM. De fato, sabe-se que a D2 é negativamente regulada pelos HTs (DENG et al., 2023). Por outro lado, estudos demonstraram que a ativação adrenérgica causada pelo frio aumenta DIO2 e, por consequência, a concentração intracelular de T3 no TAM (SILVA, 1985; DE JESUS et al., 2001; BIANCO et al., 1987; CARVALHO et al., 1991; YEN, 2001; BIANCO et

al., 2013; YAU et al., 2019). Os animais SL apresentaram maior concentração de HTs séricos e menor expressão de DIO2 no tratamento com um agonista adrenérgico. É importante considerar que este estudo observou um recorte após 19 dias de tratamento, quando diferentes eventos podem ter ocorrido durante todo o tempo de tratamento e, talvez, o que foi detectado é uma expressão de DIO2 diminuída pela regulação negativa exercida pelos altos níveis de HTs.

Devido à capacidade da sinefrina, principal composto ativo do extrato de *Citrus aurantium L.*, em se ligar a receptores adrenérgicos e sua similaridade molecular com a efedrina, há uma preocupação sobre os efeitos adversos de *Citrus aurantium L.* e da sinefrina no sistema cardiovascular (HANSEN et al., 2013). Em um estudo, observou-se que eventos adversos cardíacos, tais como hipertensão, taquiarritmia, angina variante, parada cardíaca, prolongamento do intervalo QT, fibrilação ventricular, infarto do miocárdio e morte súbita, têm sido frequentemente associados como os efeitos adversos mais prevalentes resultantes do consumo de sinefrina (KONCZ et al., 2022). Sendo assim, neste estudo, foram avaliados parâmetros cardiovasculares durante o tratamento e foi demonstrado que tanto o *Citrus aurantium L.* quanto a sinefrina não alteraram pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e frequência cardíaca. O maior diferencial no presente estudo foi ter utilizado uma dose de sinefrina muito menor (1,5mg/kg de peso corporal) que as doses descritas na maioria dos estudos já realizados, nos quais as doses variam a partir de 2,5 mg/kg chegando a 300mg/kg. (HANSEN, et al. 2013; STOHS, 2017; CHOU; HO; PAN, 2018; CALAPAI, et al.1999; ARBO, et al. 2009)

Ao avaliarem os efeitos cardiovasculares do extrato de laranja amarga e da sinefrina associados a cafeína, Hansen e colaboradores verificaram pequeno aumento na frequência cardíaca nos grupos que receberam a adição de cafeína. O grupo que recebeu apenas sinefrina apresentou efeitos clinicamente insignificantes na pressão arterial, mesmo com a dose mais alta (50 mg/kg de sinefrina). Esses resultados sugerem que a sinefrina, por si só, pode ter um impacto limitado na pressão arterial (HANSEN et al., 2013).

Uma revisão sistemática recente de estudos em humanos adultos, apontou com base em meta-análise que a sinefrina não aumentou significativamente a frequência cardíaca, a pressão arterial sistólica nem a diastólica de forma aguda, mas aumentou significativamente a longo prazo (KONCZ et al., 2022). As diferenças entre resultados encontrados em animais e humanos ocorre pelo fato da dose de 50

mg/kg de sinefrina ser aproximadamente 13 vezes mais potente em roedores em relação a mesma dose em humanos (STOHS, 2017). Além disso, a afinidade da sinefrina pelo receptor adrenérgico em roedores é de até 10 vezes maior que em humanos, o que pode facilmente explicar somente pequenos efeitos cardiovasculares observados em roedores (HANSEN et al., 2013, VERPEUT; WALTERS; BELLO, 2013; STOHS et al 2012), demonstrando assim uma característica espécie-específica da sinefrina.

O sistema cardiovascular é um sistema sensível a alterações na concentração dos HTs, gerando aumento do débito cardíaco, reduzindo a resistência vascular sistêmica, aumentando o volume sanguíneo, alterando a força de contração e a frequência cardíaca. O T3 induz mudanças na expressão de genes específicos envolvidos nos eventos contráteis, seu aumento reflete em diminuição do tempo de relaxamento diastólico, enquanto o oposto ocorre no hipotireoidismo (YEN, 2001; KAHALY E DILLMANN, 2005). Cada molécula de miosina é composta por duas cadeias pesadas (MHC) e quatro cadeias leves (MLC). Essas cadeias pesadas apresentam duas isoformas, a cadeia pesada de miosina rápida (α -MHC), com maior gasto energético e maior velocidade de encurtamento de fibra, e a cadeia pesada lenta (β -MHC), isoforma com menor gasto energético e de característica lenta (RAFALSKI et al., 2007). A transcrição gênica das cadeias pesadas de miosina, α -MHC e β -MHC, são dependentes de T3. Em animais, a transcrição da α -MHC é ativada pelo T3 enquanto há bloqueio na transcrição da β -MHC. No coração de ratos hipertireoidismo, a miosina predominante é a α -MHC, o que leva a uma rápida movimentação da cabeça globular da miosina ao longo dos filamentos finos e acelera a contração cardíaca (LOMPRE et al., 1984; MORKIN, 2000). No presente estudo, onde os animais também são hipertireoideos, foi observado que a α -MHC se mostra aumentada no grupo tratado com sinefrina isolada tanto em relação ao grupo controle quanto ao grupo supernutrido não tratado, podendo levar a taquicardia ou até desencadear uma sobrecarga funcional no coração.

Em resumo, os resultados aqui apresentados apontam que existe uma relação entre o efeito antiobesidade de *Citrus Aurantium L.* ou sinefrina com a função tireoidiana promovendo aumento nos níveis séricos dos HTs e melhorando a funcionalidade do TAM. Apesar de não haver redução de peso corporal, o tratamento foi capaz de reduzir o ganho de massa corporal e adiposidade. Embora não tenha sido encontrado diferenças na frequência cardíaca dos animais tratados,

a sinefrina isolada gerou aumento da expressão do gene α -MHC, que está relacionado aos efeitos negativos no coração. Nos demais grupos tratados, provavelmente o efeito sinérgico dos outros componentes do *C. aurantium* L. pode ter protegido do desenvolvimento desse efeito da sinefrina no coração.

Tais resultados evidenciam a possibilidade do uso terapêutico de *Citrus Aurantium* L. para melhorar o perfil metabólico no obeso, porém o uso da sinefrina de forma isolada poderia trazer efeitos colaterais sérios sobre a função tireoidiana e cardíaca.

CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro que se propõe a estudar os efeitos do *Citrus aurantium* L. e do seu principal composto ativo, a sinefrina, sobre os hormônios tireoidianos denotando o possível envolvimento do *C. aurantium* L. e da sinefrina na ação termogênica. Foi verificado que, embora tenha sido encontrado um aumento nos hormônios tireoidianos em todos os grupos tratados, somente o grupo que recebeu sinefrina isolada apresentou alteração na expressão da cadeia pesada de miosina α . Esses achados abrem possibilidades para possível elaboração de estratégias terapêuticas no tratamento da obesidade no período da adolescência, embora os impactos sobre a função tireoidiana e cardíaca devam ser levados em consideração.

REFERÊNCIAS

- AIRES, M. Fisiologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019, 1376 p.
- AHIMA, R. S., D. PRABAKARAN, C. MANTZOROS, D. QU, B. LOWELL, E. MARATOS-FLIER AND J. S. FLIER (1996). "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting." Nature **382**(6588): 250-252.
- ALMEIDA, M. M., C. P. DIAS-ROCHA, A. S. SOUZA, M. F. MUROS, L. S. MENDONÇA, C. C. PAZOS-MOURA AND I. H. TREVENZOLI (2017). "Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring." Br J Nutr **118**(10): 788-803.
- ALVAREZ-CRESPO, M., R. I. CSIKASZ, N. MARTINEZ-SANCHEZ, C. DIEGUEZ, B. CANNON, J. NEDERGAARD AND M. LOPEZ (2016). "Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance." Mol Metab **5**(4): 271-282.
- ANDOLFI, C. AND P. M. FISICHELLA (2018). "Epidemiology of Obesity and Associated Comorbidities." J Laparoendosc Adv Surg Tech A **28**(8): 919-924.
- ARBO, M. D., E. R. LARENTIS, V. M. LINCK, A. L. ABOY, A. L. PIMENTEL, A. T. HENRIQUES, E. DALLEGRAVE, S. C. GARCIA, M. B. LEAL AND R. P. LIMBERGER (2008). "Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of Citrus species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of Citrus aurantium extract and p-synephrine." Food Chem Toxicol **46**(8): 2770-2775.
- ARMITAGE, J. A., L. POSTON AND P. D. TAYLOR (2008). "Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity." Front Horm Res **36**: 73-84.
- ASVOLD, B. O., T. BJORO AND L. J. VATTEN (2009). "Association of serum TSH with high body mass differs between smokers and never-smokers." J Clin Endocrinol Metab **94**(12): 5023-5027.
- AUST, L., K. HARTMANN, A. WEBER, R. NOACK AND J. PROLL (1986). "The influence of early postnatal overnutrition on peripheral thyroxine metabolism in rats." Exp Clin Endocrinol **87**(3): 299-305.
- BALABAN, G. AND G. A. SILVA (2004). "[Protective effect of breastfeeding against childhood obesity]." J Pediatr (Rio J) **80**(1): 7-16.
- BARKER, D. J. (2004). "The developmental origins of chronic adult disease." Acta Paediatr Suppl **93**(446): 26-33.
- BARKER, D. J. (2007). "The origins of the developmental origins theory." J Intern Med **261**(5): 412-417.

BARKER, D. J. AND C. OSMOND (1986). "Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales." Lancet **1**(8489): 1077-1081.

BARKER, D. J., C. OSMOND, T. J. FORSEN, E. KAJANTIE AND J. G. ERIKSSON (2005). "Trajectories of growth among children who have coronary events as adults." N Engl J Med **353**(17): 1802-1809.

BARKER, D. J., P. D. GLUCKMAN, K. M. GODFREY, J. E. HARDING, J. A. OWENS AND J. S. ROBINSON (1993). "Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life." Lancet **341**(8850): 938-941.

BARROS, A. C. S.; XAVIER, E. M.; REIS, I. S.; CARVALHO, P. R. B.; OLIVEIRA, R. S.; PACHECO, F.K. & QUEISSADA, D. Farmacêutico bioquímico: uma abordagem voltada para o TSH e doenças da tireoide. Revista Saúde e Desenvolvimento Humano, 6 (1), **67-74**. (2018). <https://doi.org/10.18316/sdh.v6i1.4186>

BERNAL, J. (2007). "Thyroid hormone receptors in brain development and function." Nat Clin Pract Endocrinol Metab **3**(3): 249-259.

BIANCO, A. C. AND E. A. MCANINCH (2013). "The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis." Lancet Diabetes Endocrinol **1**(3): 250-258.

BIANCO, A. C. AND J. E. SILVA (1987). "Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques." Endocrinology **120**(1): 55-62.

BIANCO, A. C., A. L. MAIA, W. S. DA SILVA AND M. A. CHRISTOFFOLETE (2005). "Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure." Biosci Rep **25**(3-4): 191-208.

BIANCO, A. C., D. SALVATORE, B. GERESEN, M. J. BERRY AND P. R. LARSEN (2002). "Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases." Endocr Rev **23**(1): 38-89.

BOYLAND, E. J., S. NOLAN, B. KELLY, C. TUDUR-SMITH, A. JONES, J. C. HALFORD AND E. ROBINSON (2016). "Advertising as a cue to consume: a systematic review and meta-analysis of the effects of acute exposure to unhealthy food and nonalcoholic beverage advertising on intake in children and adults." Am J Clin Nutr **103**(2): 519-533.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas e Agravos não Transmissíveis no Brasil, 2021-2030.118p Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021.ISBN 978-65-5993-109-5 (2021).

BRAY, G. A., K. K. KIM, J. P. H. WILDING AND F. WORLD OBESITY (2017). "Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation." Obes Rev **18**(7): 715-723.

BRENT, G. A. (2012). "Mechanisms of thyroid hormone action." J Clin Invest **122**(9): 3035-3043.

BRENTA, G. (2010). "Diabetes and thyroid disorders." The British Journal of Diabetes & Vascular Disease **10**(4): 172-177.

BRENTA, G., S. DANZI AND I. KLEIN (2007). "Potential therapeutic applications of thyroid hormone analogs." Nat Clin Pract Endocrinol Metab **3**(9): 632-640.

BRIENZA, C., A. GRANDONE, G. DI SALVO, A. M. CORONA, A. DI SESSA, C. PASCOTTO, R. CALABRO, R. TORALDO, L. PERRONE AND E. M. DEL GIUDICE (2013). "Subclinical hypothyroidism and myocardial function in obese children." Nutr Metab Cardiovasc Dis **23**(9): 898-902.

BRTKO, J. (2021). "Thyroid hormone and thyroid hormone nuclear receptors: History and present state of art." Endocr Regul **55**(2): 103-119.

CALAPAI, G., F. FIRENZUOLI, A. SAITTA, F. SQUADRITO, M. R. ARLOTTA, G. COSTANTINO AND G. INFERRERA (1999). "Antiobesity and cardiovascular toxic effects of Citrus aurantium extracts in the rat: a preliminary report." Fitoterapia **70**(6): 586-592.

CARVALHO, D. P. AND C. DUPUY (2017). "Thyroid hormone biosynthesis and release." Mol Cell Endocrinol **458**: 6-15.

CARVALHO, E. A. A., SIMÃO, M.T.J., FONSECA, M.C., DE ANDRADE, R.G., FERREIRA, M.S.G., SILVA, A.F., DE SOUZA, I.P.P., FERNANDES, B.S. Obesidade: aspectos epidemiológicos e prevenção. Revista Médica de Minas Gerais. 23, 1, **72-80**, 2012.

CARVALHO, E.A.D.A. Obesity: Epidemiological Aspects and Prevention. Revista Médica de Minas Gerais, vol. 23, n.º 1, 2013, pp. 74–82., <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20130012>.

CARVALHO, S. D., E. T. KIMURA, A. C. BIANCO AND J. E. SILVA (1991). "Central role of brown adipose tissue thyroxine 5'-deiodinase on thyroid hormone-dependent thermogenic response to cold." Endocrinology **128**(4): 2149-2159.

CARVALHO-FREITAS, M. I. AND M. COSTA (2002). "Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from Citrus aurantium L." Biol Pharm Bull **25**(12): 1629-1633.

CATALANO, P. M. AND K. SHANKAR (2017). "Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child." BMJ **356**: j1.

CHANG, T. H., Y. C. CHEN, W. Y. CHEN, C. Y. CHEN, W. Y. HSU, Y. CHOU AND Y. H. CHANG (2021). "Weight Gain Associated with COVID-19 Lockdown in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis." Nutrients **13**(10).

COHEN, P.; B. M. SPIEGELMAN. Cell biology of fat storage. Mol Biol Cell. 27, 16, 2523-2527, 2016.

CONCEICAO EP, FRANCO JG, OLIVEIRA E, RESENDE AC, AMARAL TA, PEIXOTO-SILVA N. (2013) Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition-role of insulin resistance. J Nutr Biochem. **24** (1):81-7. 2013.

COSTA, C. D. S., I. F. SATTAMINI, E. M. STEELE, M. L. D. C. LOUZADA, R. M. CLARO AND C. A. MONTEIRO (2021). "Consumption of ultra-processed foods and its association with sociodemographic factors in the adult population of the 27 Brazilian state capitals (2019)." Revista de Saúde Pública **55**.

da SILVA, J. P., E. M. C. SANTOS AND M. D. M. V. PETRIBÚ (2023). "Obesidade e fatores comportamentais em crianças de idade escolar: uma revisão integrativa." Brazilian Journal of Development **9**(05): 14474-14492.

DE JESUS, L. A., S. D. CARVALHO, M. O. RIBEIRO, M. SCHNEIDER, S. W. KIM, J. W. HARNEY, P. R. LARSEN AND A. C. BIANCO (2001). "The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue." J Clin Invest **108**(9): 1379-1385.

DEMETRIO, F., J. PINTO EDE AND A. M. ASSIS (2012). "[Factors associated with early breastfeeding cessation: a birth cohort study in two municipalities in the Reconcavo region, Bahia State, Brazil]." Cad Saude Publica **28**(4): 641-650.

DENG, Y., Y. HAN, S. GAO, W. DONG AND Y. YU (2023). "The Physiological Functions and Polymorphisms of Type II Deiodinase." Endocrinol Metab (Seoul) **38**(2): 190-202.

DOHAN, O., A. DE LA VIEJA, V. PARODER, C. RIEDEL, M. ARTANI, M. REED, C. S. GINTER AND N. CARRASCO (2003). "The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance." Endocr Rev **24**(1): 48-77.

DORNER, G. AND A. PLAGEMANN (1994). "Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life." Horm Metab Res **26**(5): 213-221.

DUNTAS, L. H. AND G. BRENTA (2012). "The effect of thyroid disorders on lipid levels and metabolism." Med Clin North Am **96**(2): 269-281.

DUPONT, C., D. R. ARMANT AND C. A. BRENNER (2009). "Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective." Semin Reprod Med **27**(5): 351-357.

EKELUND, U., J. TARP, J. STEENE-JOHANNESSEN, B. H. HANSEN, B. JEFFERIS, M. W. FAGERLAND, P. WHINCUP, K. M. DIAZ, S. P. HOOKER, A. CHERNOFSKY, M. G. LARSON, N. SPARTANO, R. S. VASAN, I. M. DOHRN, M.

HAGSTROMER, C. EDWARDSON, T. YATES, E. SHIROMA, S. A. ANDERSSSEN AND I. M. LEE (2019). "Dose-response associations between accelerometry measured physical activity and sedentary time and all cause mortality: systematic review and harmonised meta-analysis." BMJ **366**: l4570.

ELLSWORTH, L., E. HARMAN, V. PADMANABHAN AND B. GREGG (2018). "Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity." Reproduction **156**(2): R23-R42.

ENES, C. C. AND B. SLATER (2010). "[Obesity in adolescence and its main determinants]." Rev Bras Epidemiol **13**(1): 163-171.

ESCRIVÃO, M. A., OLIVEIRA, F.L.C., TADDEI, J.A., LOPEZ, F.A. Obesidade exógena na infância e na adolescência. Jornal de pediatria. 76, 305-310, 2000. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia

FALL, C. H. D. AND K. KUMARAN (2019). "Metabolic programming in early life in humans." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **374**(1770): 20180123.

FALL, C. H., C. OSMOND, D. J. BARKER, P. M. CLARK, C. N. HALES, Y. STIRLING AND T. W. MEADE (1995). "Fetal and infant growth and cardiovascular risk factors in women." BMJ **310**(6977): 428-432.

FERREIRA, C. S., D. A. SILVA, C. A. GONTIJO AND A. E. M. RINALDI (2019). "Consumption of Minimally Processed and Ultra-Processed Foods among Students from Public and Private Schools." Rev Paul Pediatr **37**(2): 173-180.

FISBERG, M., P. MAXIMINO, J. KAIN AND I. KOVALSKYS (2016). "Obesogenic environment - intervention opportunities." J Pediatr (Rio J) **92**(3 Suppl 1): S30-39.

FRANKLYN, J. A. AND K. BOELAERT (2012). "Thyrotoxicosis." Lancet **379**(9821): 1155-1166.

FUGH-BERMAN, A. AND A. MYERS (2004). "Citrus aurantium, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research." Exp Biol Med (Maywood) **229**(8): 698-704.

GAIQUE, T. G., B. P. LOPES, L. L. SOUZA, G. S. PAULA, C. C. PAZOS-MOURA AND K. J. OLIVEIRA (2016). "Cinnamon intake reduces serum T3 level and modulates tissue-specific expression of thyroid hormone receptor and target genes in rats." J Sci Food Agric **96**(8): 2889-2895.

GARCIA-SOLIS, P., O. P. GARCIA, G. HERNANDEZ-PUGA, A. A. SANCHEZ-TUSIE, C. E. SAENZ-LUNA, H. L. HERNANDEZ-MONTIEL AND S. J. SOLIS (2018). "Thyroid hormones and obesity: a known but poorly understood relationship." Endokrynol Pol **69**(3): 292-303.

GEREBEN, B., A. M. ZAVACKI, S. RIBICH, B. W. KIM, S. A. HUANG, W. S. SIMONIDES, A. ZEOLD AND A. C. BIANCO (2008). "Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling." Endocr Rev **29**(7): 898-938.

GIULIANI, C., I. BUCCI, S. DI SANTO, C. ROSSI, A. GRASSADONIA, M. MARIOTTI, M. PIANTELLI, F. MONACO AND G. NAPOLITANO (2014). "Resveratrol inhibits sodium/iodide symporter gene expression and function in rat thyroid cells." PLoS One **9**(9): e107936.

GIULIANI, C., M. IEZZI, L. CIOLLI, A. HYSI, I. BUCCI, S. DI SANTO, C. ROSSI, M. ZUCHELLI AND G. NAPOLITANO (2017). "Resveratrol has anti-thyroid effects both in vitro and in vivo." Food Chem Toxicol **107**(Pt A): 237-247.

GLAVAS, M. M., M. A. KIRIGITI, X. Q. XIAO, P. J. ENRIORI, S. K. FISHER, A. E. EVANS, B. E. GRAYSON, M. A. COWLEY, M. S. SMITH AND K. L. GROVE (2010). "Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet." Endocrinology **151**(4): 1598-1610.

GOYAL, D., S. W. LIMESAND AND R. GOYAL (2019). "Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease." J Endocrinol **242**(1): T105-T119.

GUIMARÃES, A. Estudo do efeito anti-obesogênico do Citrus aurantium L. e da Sinefrina em camundongos machos adolescentes submetidos à superalimentação pós-natal precoce. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Clínica e Experimental. Rio de Janeiro, p. 91. 2020. CDU 616-056.52

HAAZ, S., K. R. FONTAINE, G. CUTTER, N. LIMDI, S. PERUMEAN-CHANEY AND D. B. ALLISON (2006). "Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update." Obes Rev **7**(1): 79-88.

HABBOU, A., S. DELEMASURE, F. GOIRAND, J. C. GUILLAND, F. CHABOD, M. SEDIKI, L. ROCHETTE AND C. VERGELY (2012). "Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood." Biochimie **94**(1): 117-124.

HALES, C. N. AND D. J. BARKER (2001). "The thrifty phenotype hypothesis." Br Med Bull **60**: 5-20.

HANSEN, D. K., N. I. GEORGE, G. E. WHITE, A. ABDEL-RAHMAN, L. S. PELLICORE AND D. FABRICANT (2013). "Cardiovascular toxicity of Citrus aurantium in exercised rats." Cardiovasc Toxicol **13**(3): 208-219.

HORTA, B.L.; BAHL, R.; MARTÍNÉS, J.C.; VICTORA, C.G. & WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic review and meta-analyses. World Health Organization. (2007). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43623>

JAMES, W. P. (2008). "The epidemiology of obesity: the size of the problem." J Intern Med **263**(4): 336-352.

JEJE, S. O., M. ADENAWOOLA AND C. ABOSEDE (2022). "Gestational Nutrition as a Predisposing Factor to Obesity Onset in Offspring: Role for Involvement of Epigenetic Mechanism." Niger J Physiol Sci **37**(1): 1-7.

JUONALA, M., C. G. MAGNUSSEN, G. S. BERENSON, A. VENN, T. L. BURNS, M. A. SABIN, S. R. SRINIVASAN, S. R. DANIELS, P. H. DAVIS, W. CHEN, C. SUN, M. CHEUNG, J. S. VIKARI, T. DWYER AND O. T. RAITAKARI (2011). "Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors." N Engl J Med **365**(20): 1876-1885.

KAHALY, G. J. AND W. H. DILLMANN (2005). "Thyroid hormone action in the heart." Endocr Rev **26**(5): 704-728.

KAR, A., S. PANDA AND S. BHARTI (2002). "Relative efficacy of three medicinal plant extracts in the alteration of thyroid hormone concentrations in male mice." J Ethnopharmacol **81**(2): 281-285.

KARTHIKEYAN, V. (2014). "Citrus aurantium (Bitter Orange): A Review of its Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology." International Journal Of Drug Discovery And Herbal Research (Ijddhr) **4**: 766-772.

KING, S. E. AND M. K. SKINNER (2020). "Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity Susceptibility." Trends Endocrinol Metab **31**(7): 478-494.

KNUDSEN, N., P. LAURBERG, L. B. RASMUSSEN, I. BULOW, H. PERRILD, L. OVESEN AND T. JORGENSEN (2005). "Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population." J Clin Endocrinol Metab **90**(7): 4019-4024.

KONCZ, D., B. TOTH, M. A. BAHAR, O. ROZA AND D. CSUPOR (2022). "The Safety and Efficacy of Citrus aurantium (Bitter Orange) Extracts and p-Synephrine: A Systematic Review and Meta-Analysis." Nutrients **14**(19).

KOOTI, W., A. AHANGARPOOR, M. GHASEMIBOROON, S. SADEGHNEZHADI, Z. ABBASI, Z. SHANAKI, Z. HASANZADEH-NOOHI AND M. ASADI-SAMANI (2014). "Effect of Apium Graveolens Leaf Extract on Serum Level of Thyroid Hormones in Male Rat." Journal of Babol University of Medical Sciences **16**: 44-50.

KUMAR, S. AND A. S. KELLY (2017). "Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment." Mayo Clin Proc **92**(2): 251-265.

LAVADO-AUTRIC, R., R. M. CALVO, R. M. DE MENA, G. M. DE ESCOBAR AND M. J. OBREGON (2013). "Deiodinase activities in thyroids and tissues of iodine-deficient female rats." Endocrinology **154**(1): 529-536.

LAZARUS, J., R. S. BROWN, C. DAUMERIE, A. HUBALEWSKA-DYDEJCZYK, R. NEGRO AND B. VAIDYA (2014). "2014 European thyroid association guidelines for the management of subclinical hypothyroidism in pregnancy and in children." Eur Thyroid J **3**(2): 76-94.

LEGRADI, G., C. H. EMERSON, R. S. AHIMA, J. S. FLIER AND R. M. LECHAN (1997). "Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing

hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus." Endocrinology **138**(6): 2569-2576.

LILLYCROP, K. A. AND G. C. BURDGE (2011). "Epigenetic changes in early life and future risk of obesity." Int J Obes (Lond) **35**(1): 72-83.

LIRA, A., D. SOUZA AND V. CINTRA (2020). "Determinantes da obesidade infantil: um problema de saúde pública." Temas em Saúde **20**: 77-94.

LISBOA, P. C., A. T. FAGUNDES, A. T. DENOLATO, E. OLIVEIRA, I. T. BONOMO, S. B. ALVES, F. H. CURTY, M. C. PASSOS AND E. G. MOURA (2008). "Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats." Exp Biol Med (Maywood) **233**(1): 57-63.

LISBOA, P. C., E. P. CONCEICAO, E. DE OLIVEIRA AND E. G. MOURA (2015). "Postnatal overnutrition programs the thyroid hormone metabolism and function in adulthood." J Endocrinol **226**(3): 219-226.

LOMPRE, A. M., B. NADAL-GINARD AND V. MAHDAVI (1984). "Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated." J Biol Chem **259**(10): 6437-6446.

MALJAEI, M. B., S. P. MOOSAVIAN, O. MIRMOSAYYEB, M. H. ROUHANI, I. NAMJOO AND A. BAHREINI (2019). "Effect of Celery Extract on Thyroid Function; Is Herbal Therapy Safe in Obesity?" Int J Prev Med **10**: 55.

MARTINEZ-SANCHEZ, N., J. M. MORENO-NAVARRETE, C. CONTRERAS, E. RIAL-PENSADO, J. FERNO, R. NOGUEIRAS, C. DIEGUEZ, J. M. FERNANDEZ-REAL AND M. LOPEZ (2017). "Thyroid hormones induce browning of white fat." J Endocrinol **232**(2): 351-362.

MARTIN-GRONERT, M. S. AND S. E. OZANNE (2012). "Mechanisms underlying the developmental origins of disease." Rev Endocr Metab Disord **13**(2): 85-92.

MARZULLO, P., A. MINOCCI, M. A. TAGLIAFERRI, G. GUZZALONI, A. DI BLASIO, C. DE MEDICI, G. AIMARETTI AND A. LIUZZI (2010). "Investigations of thyroid hormones and antibodies in obesity: leptin levels are associated with thyroid autoimmunity independent of bioanthropometric, hormonal, and weight-related determinants." J Clin Endocrinol Metab **95**(8): 3965-3972.

MERCADER, J., E. WANECQ, J. CHEN AND C. CARPENE (2011). "Isopropylorsynephrine is a stronger lipolytic agent in human adipocytes than synephrine and other amines present in Citrus aurantium." J Physiol Biochem **67**(3): 443-452.

MONICA, S. AND DIANA (2021). "Medicinal properties of celery seeds (*Apium graveolens* L.)." Advances in Bioresearch **12**: 252-257.

MORKIN, E. (2000). "Control of cardiac myosin heavy chain gene expression." Microsc Res Tech **50**(6): 522-531.

MOURA, E. G. AND C. C. MOURA (2004). "[Regulation of thyrotropin synthesis and secretion]." Arq Bras Endocrinol Metabol **48**(1): 40-52.

MRACEK, T., P. JESINA, P. KRIVAKOVA, R. BOLEHOVSKA, Z. CERVINKOVA, Z. DRAHOTA AND J. HOUSTEK (2005). "Time-course of hormonal induction of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase biogenesis in rat liver." Biochim Biophys Acta **1726**(2): 217-223.

MULLUR, R., Y. Y. LIU AND G. A. BRENT (2014). "Thyroid hormone regulation of metabolism." Physiol Rev **94**(2): 355-382.

MUNOZ-VALVERDE, D., P. RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, P. Y. GUTIERREZ-ARZAPALO, A. L. LOPEZ DE PABLO, M. CARMEN GONZALEZ, R. LOPEZ-GIMENEZ, B. SOMOZA AND S. M. ARRIBAS (2015). "Effect of fetal undernutrition and postnatal overfeeding on rat adipose tissue and organ growth at early stages of postnatal development." Physiol Res **64**(4): 547-559.

NEVES, S. C., L. M. RODRIGUES, P. BENTO AND M. C. S. MINAYO (2021). "Risk factors involved in adolescent obesity: an integrative review." Cien Saude Colet **26**(suppl 3): 4871-4884.

NG, M., T. FLEMING, M. ROBINSON, B. THOMSON, N. GRAETZ, C. MARGONO, E. C. MULLANY, S. BIRYUKOV, C. ABBAFATI, S. F. ABERA, J. P. ABRAHAM, N. M. ABU-RMEILEH, T. ACHOKI, F. S. ALBUHAIRAN, Z. A. ALEMU, R. ALFONSO, M. K. ALI, R. ALI, N. A. GUZMAN, W. AMMAR, P. ANWARI, A. BANERJEE, S. BARQUERA, S. BASU, D. A. BENNETT, Z. BHUTTA, J. BLORE, N. CABRAL, I. C. NONATO, J. C. CHANG, R. CHOWDHURY, K. J. COURVILLE, M. H. CRIQUI, D. K. CUNDIFF, K. C. DABHADKAR, L. DANDONA, A. DAVIS, A. DAYAMA, S. D. DHARMARATNE, E. L. DING, A. M. DURRANI, A. ESTEGHAMATI, F. FARZADFAR, D. F. FAY, V. L. FEIGIN, A. FLAXMAN, M. H. FOROUZANFAR, A. GOTO, M. A. GREEN, R. GUPTA, N. HAFEZI-NEJAD, G. J. HANKEY, H. C. HAREWOOD, R. HAVMOELLER, S. HAY, L. HERNANDEZ, A. HUSSEINI, B. T. IDRISOV, N. IKEDA, F. ISLAMI, E. JAHANGIR, S. K. JASSAL, S. H. JEE, M. JEFFREYS, J. B. JONAS, E. K. KABAGAMBE, S. E. KHALIFA, A. P. KENGNE, Y. S. KHADER, Y. H. KHANG, D. KIM, R. W. KIMOKOTI, J. M. KINGE, Y. KOKUBO, S. KOSEN, G. KWAN, T. LAI, M. LEINSALU, Y. LI, X. LIANG, S. LIU, G. LOGROSCINO, P. A. LOTUFO, Y. LU, J. MA, N. K. MAINOO, G. A. MENSAH, T. R. MERRIMAN, A. H. MOKDAD, J. MOSCHANDREAS, M. NAGHAVI, A. NAHEED, D. NAND, K. M. NARAYAN, E. L. NELSON, M. L. NEUHOUSER, M. I. NISAR, T. OHKUBO, S. O. OTI, A. PEDROZA, D. PRABHAKARAN, N. ROY, U. SAMPSON, H. SEO, S. G. SEPANLOU, K. SHIBUYA, R. SHIRI, I. SHIUE, G. M. SINGH, J. A. SINGH, V. SKIRBEKK, N. J. STAPELBERG, L. STURUA, B. L. SYKES, M. TOBIAS, B. X. TRAN, L. TRASANDE, H. TOYOSHIMA, S. VAN DE VIJVER, T. J. VASANKARI, J. L. VEERMAN, G. VELASQUEZ-MELENDEZ, V. V. VLASSOV, S. E. VOLLSET, T. VOS, C. WANG, X. WANG, E. WEIDERPASS, A. WERDECKER, J. L. WRIGHT, Y. C. YANG, H. YATSUYA, J. YOON, S. J. YOON, Y. ZHAO, M. ZHOU, S. ZHU, A. D. LOPEZ, C. J. MURRAY AND E. GAKIDOU (2014). "Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." Lancet **384**(9945): 766-781.

- NILSON, E. A. F., R. ANDRADE, D. A. DE BRITO AND M. L. DE OLIVEIRA (2020). "[Costs attributable to obesity, hypertension, and diabetes in the Unified Health System, Brazil, 2018]Costos atribuibles a la obesidad, la hipertension y la diabetes en el Sistema Unico de Salud de Brasil, 2018]." Rev Panam Salud Publica **44**: e32.
- NUNES, M. T. (2003). "Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica." Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia **47**.
- OBREGON, M. J. (2014). "Adipose tissues and thyroid hormones." Front Physiol **5**: 479.
- OLIVEIRA, I. C. D. AND P. B. D. M. H. CORDEIRO (2017). "Os Fitoterápicos como Coadjuvantes no Tratamento da Obesidade." Cadernos UniFOA **8**(1 (Esp.)): 97-104.
- OLIVEIRA, K. J., M. I. CHIAMOLERA, G. GIANNOCO, C. C. PAZOS-MOURA AND T. M. ORTIGA-CARVALHO (2018). "Thyroid Function Disruptors: from nature to chemicals." J Mol Endocrinol.
- OLIVEIRA, TWN et al. Laranja Amarga (Citrus aurantium) no tratamento da obesidade. RSC online, 6 (1): p 114 - 126. doi: 10.35572/rsc.v6i2.171, 2017;
- ORNELLAS, F., V. SOUZA-MELLO, C. A. MANDARIM-DE-LACERDA AND M. B. AGUILA (2015). "Programming of obesity and comorbidities in the progeny: lessons from a model of diet-induced obese parents." PLoS One **10**(4): e0124737.
- ORTIGA-CARVALHO, T. M., M. I. CHIAMOLERA, C. C. PAZOS-MOURA AND F. E. Wondisford Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. Comprehensive Physiology: 1387-1428.
- PANDA, S. AND A. KAR (2003). "Piperine lowers the serum concentrations of thyroid hormones, glucose and hepatic 5'D activity in adult male mice." Horm Metab Res **35**(9): 523-526.
- PANDA, S. AND A. KAR (2008). "Water and Ethanol Extracts of Piper nigrum in Regulating Thyroid Function and Lipid Peroxidation in Mice." Pharmaceutical Biology **41**: 479-482.
- PARAGLIOLA, R. M., A. CORSELLO, P. CONCOLINO, F. IANNI, G. PAPI, A. PONTECORVI AND S. M. CORSELLO (2020). "Iodothyronine deiodinases and reduced sensitivity to thyroid hormones." Front Biosci (Landmark Ed) **25**(2): 201-228.
- PAREDES, C., R. C. HSU, A. TONG AND J. R. JOHNSON (2021). "Obesity and Pregnancy." Neoreviews **22**(2): e78-e87.
- PARK, J., H. L. KIM, Y. JUNG, K. S. AHN, H. J. KWAK AND J. Y. UM (2019). "Bitter Orange (Citrus aurantium Linne) Improves Obesity by Regulating Adipogenesis and Thermogenesis through AMPK Activation." Nutrients **11**(9).
- PEARCE, E. N. (2012). "Thyroid hormone and obesity." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **19**(5): 408-413.

PEIXOTO, J. S., J. F. COMAR, C. T. MOREIRA, A. A. SOARES, A. L. DE OLIVEIRA, A. BRACHT AND R. M. PERALTA (2012). "Effects of Citrus aurantium (bitter orange) fruit extracts and p-synephrine on metabolic fluxes in the rat liver." Molecules **17**(5): 5854-5869.

PETITO, G., F. CIOFFI, N. MAGNACCA, P. DE LANGE, R. SENESE AND A. LANNI (2023). "Adipose Tissue Remodeling in Obesity: An Overview of the Actions of Thyroid Hormones and Their Derivatives." Pharmaceuticals (Basel) **16**(4).

PLAGEMANN, A., I. HEIDRICH, F. GOTZ, W. ROHDE AND G. DORNER (1992). "Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding." Exp Clin Endocrinol **99**(3): 154-158.

PLAGEMANN, A., T. HARDER, K. FRANKE AND R. KOHLHOFF (2002). "Long-term impact of neonatal breast-feeding on body weight and glucose tolerance in children of diabetic mothers." Diabetes Care **25**(1): 16-22.

PLAGEMANN, A., T. HARDER, K. SCHELLONG, S. SCHULZ AND J. H. STUPIN (2012). "Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **26**(5): 641-653.

PULGARON, E. R. (2013). "Childhood obesity: a review of increased risk for physical and psychological comorbidities." Clin Ther **35**(1): A18-32.

RAFALSKI, K., A. ABDOURAHMAN AND J. G. EDWARDS (2007). "Early adaptations to training: upregulation of alpha-myosin heavy chain gene expression." Med Sci Sports Exerc **39**(1): 75-82.

RAITAKARI, O. T., M. JUONALA, M. KAHONEN, L. TAITTONEN, T. LAITINEN, N. MAKI-TORKKO, M. J. JARVISALO, M. UHARI, E. JOKINEN, T. RONNEMAA, H. K. AKERBLOM AND J. S. VIIKARI (2003). "Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study." JAMA **290**(17): 2277-2283.

REINEHR, T. (2010). "Obesity and thyroid function." Mol Cell Endocrinol **316**(2): 165-171.

RIBEIRO, M. O., S. D. CARVALHO, J. J. SCHULTZ, G. CHIELLINI, T. S. SCANLAN, A. C. BIANCO AND G. A. BRENT (2001). "Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific." J Clin Invest **108**(1): 97-105.

RITTER, M. J., I. AMANO AND A. N. HOLLENBERG (2020). "Thyroid Hormone Signaling and the Liver." Hepatology **72**(2).

RODRIGUES, A. L., E. G. DE MOURA, M. C. PASSOS, S. C. DUTRA AND P. C. LISBOA (2009). "Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats." J Physiol **587**(Pt 11): 2647-2661.

RODRIGUEZ-AYLLON, M., C. CADENAS-SANCHEZ, F. ESTEVEZ-LOPEZ, N. E. MUNOZ, J. MORA-GONZALEZ, J. H. MIGUELES, P. MOLINA-GARCIA, H. HENRIKSSON, A. MENA-MOLINA, V. MARTINEZ-VIZCAINO, A. CATENA, M. LOF, K. I. ERICKSON, D. R. LUBANS, F. B. ORTEGA AND I. ESTEBAN-CORNEJO (2019). "Role of Physical Activity and Sedentary Behavior in the Mental Health of Preschoolers, Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis." Sports Med **49**(9): 1383-1410.

ROLLAND-CACHERA, M. F. AND K. F. MICHAELSEN (2019). "Protein intake in young children and later health: importance of the time window for programming adiposity." Am J Clin Nutr **110**(5): 1263-1264.

ROMANELLI, R., N. CECCHI, M. G. CARBONE, M. DINARDO, G. GAUDINO, E. MIRAGLIA DEL GIUDICE AND G. R. UMANO (2020). "Pediatric obesity: prevention is better than care." Ital J Pediatr **46**(1): 103.

ROSSATO, L. G., V. M. COSTA, R. P. LIMBERGER, L. BASTOS MDE AND F. REMIAO (2011). "Synephrine: from trace concentrations to massive consumption in weight-loss." Food Chem Toxicol **49**(1): 8-16.

ROUHI-BOROUJENI, H., M. HOSSEINI, M. GHARIPOUR AND H. ROUHI-BOROUJENI (2016). "Is herbal therapy safe in obesity? A case of *Apium graveolens* (Celery) induced hyperthyroidism." ARYA Atheroscler **12**(5): 248-249.

RUF, J. AND P. CARAYON (2006). "Structural and functional aspects of thyroid peroxidase." Arch Biochem Biophys **445**(2): 269-277.

RUIZ, L. D., M. L. ZUELCH, S. M. DIMITRATOS AND R. E. SCHERR (2019). "Adolescent Obesity: Diet Quality, Psychosocial Health, and Cardiometabolic Risk Factors." Nutrients **12**(1).

SAHOO, K., B. SAHOO, A. K. CHOUDHURY, N. Y. SOFI, R. KUMAR AND A. S. BHADORIA (2015). "Childhood obesity: causes and consequences." J Family Med Prim Care **4**(2): 187-192.

SANTOS, L. R. D. C. AND E. P. RABINOVICH (2011). "Situações familiares na obesidade exógena infantil do filho único." Saúde e Sociedade **20**.

SENTIS, S. C., R. OELKRUG AND J. MITTAG (2021). "Thyroid hormones in the regulation of brown adipose tissue thermogenesis." Endocr Connect **10**(2): R106-R115.

SHI, Y., H. ZHANG, S. HUANG, L. YIN, F. WANG, P. LUO AND H. HUANG (2022). "Epigenetic regulation in cardiovascular disease: mechanisms and advances in clinical trials." Signal Transduct Target Ther **7**(1): 200.

SILVA, D. D. D., M. V. M. D. LIMA, P. T. MUNIZ, M. N. D. HOLANDA, O. F. CÂMARA, A. MONTEIRO AND R. WAJNSZTEJN (2019). "Prevalence and factors associated with obesity in children under five years old in Rio Branco - Acre." Journal of Human Growth and Development **29**: 263-273.

SILVA, J. E. (1995). "Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance." Thyroid **5**(6): 481-492.

SILVA, J. E. AND P. R. LARSEN (1985). "Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats." J Clin Invest **76**(6): 2296-2305.

SILVA, J. E. AND S. D. BIANCO (2008). "Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications." Thyroid **18**(2): 157-165.

SKINNER, A. C., E. M. PERRIN, L. A. MOSS AND J. A. SKELTON (2015). "Cardiometabolic Risks and Severity of Obesity in Children and Young Adults." N Engl J Med **373**(14): 1307-1317.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA – Departamento de Nutrologia
Obesidade na infância e adolescência – Manual de Orientação. 3ª Ed. São Paulo: SBP. (2019). Vários colaboradores. ISBN: 978-85-88520-32-5

SONG, Y., X. YAO AND H. YING (2011). "Thyroid hormone action in metabolic regulation." Protein Cell **2**(5): 358-368.

SOUZA, L. L., E. G. MOURA AND P. C. LISBOA (2022). "Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring." Nutrients **14**(10).

STOHS, S. J. (2017). "Safety, Efficacy, and Mechanistic Studies Regarding Citrus aurantium (Bitter Orange) Extract and p-Synephrine." Phytother Res **31**(10): 1463-1474.

STOHS, S. J., H. G. PREUSS AND M. SHARA (2012). "A review of the human clinical studies involving Citrus aurantium (bitter orange) extract and its primary protoalkaloid p-synephrine." Int J Med Sci **9**(7): 527-538.

SUNTAR, I., H. KHAN, S. PATEL, R. CELANO AND L. RASTRELLI (2018). "An Overview on Citrus aurantium L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent." Oxid Med Cell Longev **2018**: 7864269.

SURYAWANSHI, J. (2011). An overview of Citrus aurantium used in treatment of various diseases, publisher location: Nairobi

SUZUKI, K. (2018). "The developing world of DOHaD." J Dev Orig Health Dis **9**(3): 266-269.

TEDESCHI, L., C. VASSALLE, G. IERVASI AND L. SABATINO (2021). "Main Factors Involved in Thyroid Hormone Action." Molecules **26**(23).

TREISTER-GOLTZMAN, Y., S. YARZA AND R. PELEG (2021). "Lipid profile in mild subclinical hypothyroidism: systematic review and meta-analysis." Minerva Endocrinol (Torino) **46**(4): 428-440.

- URIBE-CERDA, S., E. MORSELLI AND C. PEREZ-LEIGHTON (2018). "Updates on the neurobiology of food reward and their relation to the obesogenic environment." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **25**(5): 292-297.
- VAISMAN, M., D. ROSENTHAL AND D. P. CARVALHO (2004). "[Enzymes involved in thyroid iodide organification]." Arq Bras Endocrinol Metabol **48**(1): 9-15.
- VENDRUSCOLO, G., S. RATES AND L. MENTZ (2005). "Chemical and pharmacologic data on medicinal plants used by the community of the Ponta Grossa neighborhood, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil." Revista Brasileira de Farmacognosia **15**: 361-372.
- VERPEUT, J. L., A. L. WALTERS AND N. T. BELLO (2013). "Citrus aurantium and Rhodiola rosea in combination reduce visceral white adipose tissue and increase hypothalamic norepinephrine in a rat model of diet-induced obesity." Nutr Res **33**(6): 503-512.
- VOLKE, L. AND K. KRAUSE (2021). "Effect of Thyroid Hormones on Adipose Tissue Flexibility." Eur Thyroid J **10**(1): 1-9.
- VONO-TONIOLO, J. AND P. KOPP (2004). "Thyroglobulin gene mutations and other genetic defects associated with congenital hypothyroidism." Arq Bras Endocrinol Metabol **48**(1): 70-82.
- WALCZAK, K. AND L. SIEMINSKA (2021). "Obesity and Thyroid Axis." Int J Environ Res Public Health **18**(18).
- WATERLAND, R. A. AND K. B. MICHELS (2007). "Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis." Annu Rev Nutr **27**: 363-388.
- WIKSTRÖM, L., C. JOHANSSON, C. SALTÓ, C. BARLOW, A. CAMPOS BARROS, F. BAAS, D. FORREST, P. THORÉN AND B. VENNSTRÖM (1998). "Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1." Embo j **17**(2): 455-461.
- WORLD OBESITY FEDERATION (2019). Atlas of Childhood Obesity. World Obesity Federation, 2019. Disponível em: < https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/woffiles/11996_Childhood_Obesity_Atlas_Report_ART_V2.pdf>.
- WORLD OBESITY FEDERATION. (2021). Obesity is a disease. Available at: www.worldobesityday.org/assets/downloads/Obesity_Is_a_Disease.pdf
- WORLD OBESITY FEDERATION. (2023). World Atlas of Obesity. Available at: <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2023>
- WU, Y. L., Z. J. LIN, C. C. LI, X. LIN, S. K. SHAN, B. GUO, M. H. ZHENG, F. LI, L. Q. YUAN AND Z. H. LI (2023). "Epigenetic regulation in metabolic diseases: mechanisms and advances in clinical study." Signal Transduct Target Ther **8**(1): 98.

XIAO, X. Q., S. M. WILLIAMS, B. E. GRAYSON, M. M. GLAVAS, M. A. COWLEY, M. S. SMITH AND K. L. GROVE (2007). "Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis." Endocrinology **148**(9): 4150-4159.

YAU, W. W. AND P. M. YEN (2020). "Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone." Int J Mol Sci **21**(8).

YAU, W. W., B. K. SINGH, R. LESMANA, J. ZHOU, R. A. SINHA, K. A. WONG, Y. WU, B. H. BAY, S. SUGII, L. SUN AND P. M. YEN (2019). "Thyroid hormone (T(3)) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy." Autophagy **15**(1): 131-150.

YEN, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." Physiol Rev **81**(3): 1097-1142.

YEN, P. M., S. ANDO, X. FENG, Y. LIU, P. MARUVADA AND X. XIA (2006). "Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels." Mol Cell Endocrinol **246**(1-2): 121-127.

ZAVACKI, A. M., H. YING, M. A. CHRISTOFFOLETE, G. AERTS, E. SO, J. W. HARNEY, S. Y. CHENG, P. R. LARSEN AND A. C. BIANCO (2005). "Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse." Endocrinology **146**(3): 1568-1575.

ZHU, Z., F. CAO AND X. LI (2019). "Epigenetic Programming and Fetal Metabolic Programming." Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 764.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA), Instituto de Biologia (UERJ)

Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO ANTI-OBESOGÊNICO DO CITRUS AURANTIUM L. E DA SINEFRINA EM CAMUNDONGOS PROGRAMADOS POR SUPERALIMENTAÇÃO NEONATAL.” registrado com o nº 014/2023, sob a responsabilidade de **Elaine de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) / IBRAG / UERJ, em reunião de 08/02/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/02/2027
Espécie / linhagem / raça	swiss
Nº de animais	45
Peso / Idade	45g/2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 08 de fevereiro de 2023.

Dr. Claudio C. Filgueiras
Professor Associado
Matr. 33080-3
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Dra. Yael A. Villaça
Professora Associada
Matr. 35066-0
Vice Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ

<http://www.biologiauerj.com.br/comite-de-etica>
ceua.ibrag@yahoo.com.br

ANEXO B – Certificado de análise Citrus Extrato Seco 6%, Florian


Florien

3 kg
(3 x 1 kg)

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Citrus Aurantium Ext Seco 6%	Data de Análise:	20-04-2018
Lote Interno:	18D11-B024-031933	Lote Fabricante:	206171201
Data de Fabricação:	14-12-2017	Data de Validade:	13-12-2019
Origem:	China	Procedência:	China
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fraclonamento:	031933

DCB:	-	DCI:	-
CAS:	72968-50-4	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		
Observações 1:	Solvente extraç Água e etanol		
Observações 2:	Parte Utilizada:	Fruta	Nome Científico: Citrus aurantium L.

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Pó fino marrom, com odor característico	Conforme		Fabricante
Identificação *	HPLC - o tempo de retenção da amostra está de acordo com o do padrão	Conforme		Fabricante
Perda por Dessecação *	<= 6,0 (Peso constante/105 °C)	3,13	%	Fabricante
Resíduo por ignição *	<= 10,0	4,07	%	Fabricante
Metais Pesados *	<= 10	< 10	ppm	Fabricante
Arsênio (ICP-OES) *	<= 1	Não detectado	ppm	Fabricante
Solvente Residual (CG) *	Etanol <= 5000	192,80	ppm	Fabricante
Teor (HPLC) *	Sinefrina >= 6,0	8,7	%	Fabricante
Testes Microbiológicos				
Contagem total de bactérias *	<= 1000	< 10	UFC/g	Fabricante
Fungos e leveduras *	<= 100	< 10	UFC/g	Fabricante
Escherichia coli *	Negativo	Negativo		Fabricante
Salmonella *	Negativo	Negativo		Fabricante
Teste Adicional				
Densidade Aparente *	Informativo (com compactação)	0,63	g/mL	MGFB - V

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)

Reprovado ()



Florien

2

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Citrus Aurantium Ext Seco 6%	Data de Análise:	20-04-2018
Lote Interno:	18D11-B024-031933	Lote Fabricante:	206171201
Data de Fabricação:	14-12-2017	Data de Validade:	13-12-2019
Origem:	China	Procedência:	China
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fraçãoamento:	031933
DCB:	-	DCI:	-
CAS:	72968-50-4	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		
Observações 1:	Solvente extração: Água e etanol		
Observações 2:	Parte Utilizada:	Fruta	Nome Científico: Citrus aurantium L.

Responsável Técnico Substituto
Olivia Neiva Mesquita Mendes
CRF - GO Nº 5227

Responsável Técnico
João Paulo Sartin Mendes
CRF - GO Nº 7355

Responsável Técnico
Karina Maria da Silva
CRF - SP Nº 66.627

Fim do Documento

ANEXO C – Certificado de análise Citrus Extrato Seco 30%, Florian



1008

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Citrus Extrato Seco 30%	Data de Análise:	04-07-2018
Lote Interno:	18G01-B049-034954	Lote Fabricante:	HK18050201
Data de Fabricação:	02-05-2018	Data de Validade:	01-05-2021
Origem:	China	Procedência:	China
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fraclonamento:	034954

DCB:	-	DCI:	-
CAS:	-	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		
Observações 1:	Sol. Extração Água		
Observações 2:	Parte Utilizada:	Fruta	Nome Científico: Citrus Aurantium L.

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Aparência e cor	Pó fino marrom	Conforme		Fabricante
Odor e sabor	Característico	Conforme		Fabricante
Granulometria	95% passa malha 80	Conforme		Fabricante
Perda por Dessecação	<= 5,0	1,85	%	Fabricante
Cinzas	<= 5,0	2,52	%	Fabricante
Total Metais Pesados	<= 10	Conforme	ppm	Fabricante
Arsênio	<= 1	Conforme	ppm	Fabricante
Chumbo	<= 2	Conforme	ppm	Fabricante
Cádmio	<= 0,1	Conforme	ppm	Fabricante
Mercurio	<= 0,3	Conforme	ppm	Fabricante
Teor	Synephrine >= 30	30,36	%	Fabricante
Testes Microbiológicos				
Contagem total de bactérias	<= 10000	Conforme	UFC/g	Fabricante
Fungos e leveduras	<= 1000	Conforme	UFC/g	Fabricante
Escherichia coli	Negativo em 10g	Conforme		Fabricante
Salmonella	Negativo em 25g	Conforme		Fabricante
Staphylococcus	Negativo em 10g	Conforme		Fabricante



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Citrus Extrato Seco 30%	Data de Análise:	04-07-2018
Lote Interno:	18G01-B049-034954	Lote Fabricante:	HK18050201
Data de Fabricação:	02-05-2018	Data de Validade:	01-05-2021
Origem:	China	Procedência:	China
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	034954

DCB:	-	DCI:	-
CAS:	-	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		

Observações 1:	Sol. Extração	Água
Observações 2:	Parte Utilizada:	Fruta
	Nome Científico:	Citrus Aurantium L.

*Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)
Reprovado ()

Farmacêutico Responsável
João Paulo Santos Mendes
CRF-GO: Nº 7.355
Fagron Services Brasil

Farmacêutico Responsável
Karine Maria da Silva
CRF-SP: Nº 66.627
Florien Fitofármacos
SAC: (19) 3420-1199

Fim do Documento