

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

CAIO CESAR RUY

**“POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS ANTOCIANIDINAS
CIANIDINA E MALVIDINA SOBRE O METABOLISMO
LIPÍDICO DE MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*.”**

Bragança Paulista
2026

CAIO CESAR RUY – R.A.: 202113356

**“POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DAS ANTOCIANIDINAS
CIANIDINA E MALVIDINA SOBRE O METABOLISMO
LIPÍDICO DE MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO*.”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco, como requisito para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Bragança Paulista
2026

WB 200 R947p	Ruy, Caio Cesar Potencial anti-inflamatório das antocianidinas cianidina e malvidina sobre o metabolismo lipídico de modelos experimentais <i>in vitro</i> / Caio Cesar Ruy. -- Bragança Paulista, 2026. 73 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro 1. Obesidade. 2. Antocianidinas. 3. Inflamação. 4. Resistência à insulina. 5. Distúrbios do metabolismo dos lipídios. I. Ribeiro, Marcelo Lima.
-----------------	--



RUY, Caio Cesar. “Potencial anti-inflamatório das antocianidinas cianidina e malvidina sobre o metabolismo lipídico de modelos experimentais *in vitro*”. Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 27 de fevereiro de 2026 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Prof(a). Dr(a). Marcelo Lima Ribeiro
Orientador(a) e Presidente
(por videoconferência)
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Daisy Machado
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Manoela Marques Ortega
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Paola Souza Santos
(por videoconferência)
Universidade do Estado de Mato Grosso

Prof(a). Dr(a). Rosane Maria Andrade Vasconcelos
(por videoconferência)
Universidade do Estado de Mato Grosso

Dedicatória

À memória da minha querida avó, exemplo de fé, amor e força, que segue viva em tudo o que sou.

Agradecimentos

A Deus, por me sustentar nos momentos difíceis, renovar minhas forças quando pensei em desistir e iluminar cada etapa desta caminhada.

À Universidade São Francisco e ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde, pela concessão da bolsa BDC e pelo suporte oferecido ao longo desta trajetória acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro, à Dra. Tanila Wood e à Me. Quélita Pereira, por todo o apoio, ensinamentos e contribuições fundamentais para a realização deste trabalho. Sem vocês, esta conquista não seria possível.

À Profa. Dra. Raquel Girardello e Giovanna Longato pela generosidade ao longo dessa jornada e por ter renovado minha esperança em seguir adiante.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições que certamente enriquecerão este estudo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e fizeram parte desta etapa tão importante da minha vida, meu sincero agradecimento.

E, de forma muito especial, ao meu parceiro, Ricardo Martins Nader, por ter sido meu pilar nos momentos finais desta caminhada desafiadora, oferecendo amor, apoio e força quando mais precisei.

RESUMO

A obesidade é uma condição multifatorial caracterizada por inflamação crônica de baixo grau, disfunções no metabolismo lipídico e resistência à insulina, estando fortemente associada ao desenvolvimento de doenças cardiometabólicas. Evidências recentes indicam que a integridade da barreira intestinal e a comunicação ao longo do eixo intestino–tecido adiposo desempenham papel central na fisiopatologia da obesidade. Nesse contexto, compostos bioativos de origem alimentar, como as antocianidinas, têm despertado interesse devido ao seu potencial modulador imunometabólico. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório das antocianidinas cianidina e malvidina sobre o metabolismo lipídico em modelos experimentais *in vitro* de pré-adipócitos 3T3-L1 e células epiteliais intestinais Caco-2. Foram realizados ensaios de citotoxicidade (MTT), diferenciação adipocitária e acúmulo lipídico (*Oil Red O*), resistência à insulina, análise de perfil lipídico e avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B, TLR-4, PCR), metabólicos (GLUT4/Slc2A4, ADIPOQ) e estruturais da barreira intestinal (ZO-1, occludina e claudinas). Os resultados demonstraram que a cianidina e a malvidina não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas e promoveram redução significativa do acúmulo de triglicerídeos, atenuação do perfil inflamatório e melhora da sensibilidade à insulina em adipócitos 3T3-L1. No modelo intestinal Caco-2, observou-se modulação positiva de marcadores inflamatórios e de integridade da barreira, associada à redução da ativação do eixo TLR-4/NF- κ B. Em conjunto, os achados indicam que as antocianidinas exercem efeitos imunometabólicos integrados ao longo do eixo intestino–tecido adiposo, reforçando seu potencial como componentes estratégicos em abordagens nutricionais e terapêuticas adjuvantes voltadas à prevenção e ao manejo das disfunções metabólicas associadas à obesidade.

Palavras-chave: Obesidade. Antocianidinas. Inflamação. Distúrbios do Metabolismo dos Lipídios. Resistência à Insulina.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial condition characterized by chronic low-grade inflammation, lipid metabolism dysfunction, and insulin resistance, being strongly associated with the development of cardiometabolic diseases. Increasing evidence highlights the central role of intestinal barrier integrity and the communication along the gut–adipose tissue axis in obesity pathophysiology. In this context, food-derived bioactive compounds such as anthocyanidins have gained attention due to their immunometabolic modulatory potential. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory effects of the anthocyanidins cyanidin and malvidin on lipid metabolism using in vitro experimental models of 3T3-L1 preadipocytes and Caco-2 intestinal epithelial cells. Cytotoxicity (MTT assay), adipocyte differentiation and lipid accumulation (*Oil Red O*), insulin resistance, lipid profile analysis, and gene expression of inflammatory (TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B, TLR-4, CRP), metabolic (GLUT4/Slc2A4, ADIPOQ), and intestinal barrier markers (ZO-1, occludin, and claudins) were assessed. The results showed that cyanidin and malvidin were not cytotoxic at the tested concentrations and significantly reduced triglyceride accumulation, attenuated inflammatory responses, and improved insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. In the Caco-2 model, both anthocyanidins positively modulated inflammatory markers and intestinal barrier integrity, associated with reduced activation of the TLR-4/NF- κ B pathway. Taken together, these findings demonstrate that cyanidin and malvidin exert integrated immunometabolic effects along the gut–adipose tissue axis, supporting their potential role as strategic components in nutritional and adjuvant therapeutic approaches for the prevention and management of obesity-related metabolic disorders.

Keywords: *Obesity. Anthocyanidins. Inflammation. Lipid metabolism disorders. Insulin Resistance.*

Lista de Símbolos e Abreviações

- 3T3-L1** – Linhagem murina de pré-adipócitos
CL – Colesterol
ADIPOQ – Adiponectina
AGL / FFA – Ácidos graxos livres
AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA – Análise de variância
C – Cianidina (cianidina-3-O-glicosídeo)
Caco-2 – Linhagem de células epiteliais intestinais humanas
CLDN / Cld – Claudinas (proteínas de junção estreita)
CO₂ – Dióxido de carbono
DAG – Diacilglicerol
DM2 – Diabetes mellitus tipo 2
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
EPM – Erro padrão da média
FBS – Soro fetal bovino
GLUT4 (Slc2A4) – Transportador de glicose tipo 4
HBSS – Hank's Balanced Salt Solution
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HIF-1 α – Fator induzido por hipóxia 1-alfa
hs-CRP (PCR-us) – Proteína C reativa ultrasensível
IBMX – 3-isobutil-1-metilxantina
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6
IMC – Índice de massa corporal
IKK β – Quinase do inibidor do NF- κ B beta
JNK – c-Jun N-terminal kinase
LPL / Lpl – Lipoproteína lipase
LPS – Lipopolissacarídeo
M – Malvidina (malvidina-3-O-glicosídeo)
MASLD – Doença hepática gordurosa metabólica
MEM – Minimum Essential Medium
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MyD88 – Myeloid differentiation primary response 88
NEAA – Aminoácidos não essenciais
NF- κ B – Nuclear factor kappa B
NPC1L1 – Niemann-Pick C1-like 1
OCLN – Occludina
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PCR – Proteína C Reativa

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PCR – Proteína C reativa

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PKC – Proteína quinase C

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SCFA – Ácidos graxos de cadeia curta

STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3

TG – Triglicerídeos

TLR-4 – Toll-like receptor 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

ZO-1 – Zona occludens-1

Lista de Figuras

Figura 1: Estimativa de excesso de peso em adultos no mundo em 2021	16
Figura 2: Estimativa de obesidade em adultos no mundo em 2021	16
Figura 3: Morte por obesidade em 2021	18
Figura 4: Principais causas de morte no mundo em 2021	20
Figura 5: Estruturas químicas das antocianidinas cianidina e malvidina e exemplos de alimentos naturalmente ricos nesses compostos.	29
Figura 6: Representação esquemática dos efeitos das antocianidinas sobre a inflamação associada à obesidade..	31
Figura 7: MTT de diferentes concentrações de antocianidinas C e M em células 3T3-L1.....	45
Figura 8: Oil Red O e acúmulo de triacilgliceróis em células 3T3-L1 após o tratamento com diferentes concentrações de antocianidinas C e M.....	46
Figura 9: Expressão de NF- κ B, TLR-4 e PCR em células epiteliais intestinais Caco-2 estimuladas com LPS e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas (C) e (M)..	47
Figura 10: Expressão dos marcadores de integridade da barreira epitelial ZO-1 e CLDN-1 em células epiteliais intestinais Caco-2 submetidas ao estímulo lipotóxico com ácido oleico (AO) e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas (C) e (M).....	49
Figura 11: Expressão dos genes associados ao metabolismo e ao transporte lipídico LPL e NPC1L1 em células epiteliais intestinais Caco-2 submetidas ao estímulo com ácido oleico (AO) e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas (C) e (M).....	50
Figura 12: Efeito das antocianidinas cianidina e malvidina sobre a resistência à insulina em adipócitos 3T3-L1. Tratamento com (C) e (M) em modelo de resistência à insulina induzida por palmitato..	51
Figura 13: Expressão gênica associada à resposta inflamatória em células 3T3-L1 submetidas aos diferentes tratamentos com antocianidinas.....	52
Figura 14: MTT de diferentes concentrações de antocianidinas C e M em células Caco 2.	53
Figura 15: Oil Red O e acúmulo de triacilgliceróis em células Caco 2 após o tratamento com diferentes concentrações de antocianidinas.....	54
Figura 16: Efeito das antocianidinas (C) e (M) sobre o metabolismo da glicose em células Caco-2.	55

Figura 17: Expressão gênica de IL-6 e IL-1 β em células Caco-2 submetidas ao estímulo inflamatório por LPS e aos tratamentos com antocianidinas 56

Figura 18: Modelo mecanístico proposto dos efeitos da cianidina e da malvidina no eixo intestino–tecido adiposo, com impacto em vias inflamatórias e metabólicas associadas à obesidade 68

Lista de Tabelas

Tabela 1: Marcadores intestinais associados à integridade da barreira e inflamação na obesidade, incluindo suas funções fisiológicas, alterações observadas no estado obeso e a modulação promovida por antocianidinas, com destaque para malvidina e cianidina..	24
Tabela 2: Sequências de primers utilizados para qPCR no ensaio em 3T3-L1	40
Tabela 3: Sequências de primers utilizados para qPCR no ensaio em Caco-2.	43
Tabela 4: Síntese integrativa dos efeitos imunometabólicos da cianidina e da malvidina em modelos experimentais <i>in vitro</i> (3T3-L1 e Caco-2).	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Obesidade e panorama demográfico	15
1.2. Doenças associadas à obesidade	19
1.2.1 Fisiopatologia da obesidade: resistência à insulina, inflamação e disfunção do metabolismo	21
1.3.1 Saúde intestinal e obesidade: estruturas, função e importância da barreira intestinal	22
1.3.2. Integridade intestinal e impacto em distúrbios do metabolismo lipídico	25
1.4. Antocianidinas: Cianidina e Malvidina, obesidade e saúde intestinal	27
2. OBJETIVO	34
2.1. Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Linhagens	35
3.2 Antocianidinas	35
3.3 Determinação da Citotoxicidade - Ensaio MTT	36
3.4 Ensaios desenvolvidos com linhagem de pré adipócitos 3T3-L1	37
3.4.1 Diferenciação de adipócitos e coloração com Oil Red O	37
3.4.2 Teste de Resistência à insulina	38
3.4.3 Análises de perfil lipídico	38
3.4.4 Avaliação da expressão de gênica	39
3.5 Ensaios desenvolvidos com linhagem Caco-2	40
3.5.1 Ensaios de permeação de colesterol em células Caco-2	41
3.6 Análises Estatísticas	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Efeito das diferentes concentrações de antocianidinas sobre a citotoxicidade de pré-adipócitos 3T3-L1	45
4.2 Antocianidinas em baixas concentrações reduziram o acúmulo de TG em modelo celular de adipócitos 3T3-L1	45
4.3 Efeito do ácido oleico e das antocianidinas sobre a expressão de genes inflamatórios em células Caco-2	46
4.4 Efeito do estímulo com ácido oleico sobre a expressão gênica de marcadores metabólicos e de integridade da barreira intestinal em células Caco-2	48
4.5 Modulação de genes associados à integridade da barreira intestinal em células Caco-2 estimuladas com ácido oleico	48

4.6 Modulação da expressão de genes associados ao transporte lipídico em células Caco-2 após estímulo com ácido oleico	50
4.7 Antocianidinas atuam sobre efeito a resistência à insulina em adipócitos 3T3-L1	51
4.8 Antocianidinas modulam marcadores inflamatórios em adipócitos 3T3-L1	52
4.9 Efeito das antocianidinas sobre a viabilidade celular em Caco-2	53
4.10 Modulação do acúmulo lipídico em células epiteliais intestinais Caco-2.	54
4.11 Efeitos das antocianidinas sobre o metabolismo da glicose em células Caco-2.	55
4.12 Efeitos das antocianidinas sobre o metabolismo da glicose em células Caco-2 e expressão gênica de IL-6 e IL-1β.	56
5.DISSCUSSÃO	58
6.CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e panorama demográfico

A obesidade consolidou-se como uma das mais graves ameaças à saúde pública global e tem apresentado crescimento sustentado nas últimas décadas. De acordo com dados da World Health Organization (OMS), em 2022 cerca de 1 em cada 8 pessoas no mundo vivia com obesidade o que representa mais de um bilhão de indivíduos afetados. Além disso, estima-se que, em 2022, aproximadamente 2,5 bilhões de adultos (18 anos ou mais) estavam com sobrepeso dos quais cerca de 890 milhões eram classificados como obesos (NONOGAKI, 2024). Desde 1990, a obesidade adulta mais que dobrou e, de modo ainda mais preocupante, a obesidade em crianças e adolescentes quadruplicou refletindo profundas transformações ambientais e comportamentais, marcadas pela urbanização, aumento do sedentarismo e maior disponibilidade e consumo de alimentos ultraprocessados (COLLABORATORS, 2025; LIU; FANG; LU; WANG *et al.*, 2025; ZHANG; LIU; NI; YI *et al.*, 2024). Esse panorama evidencia a dimensão global da crise de obesidade, em que fatores socioambientais, econômicos e comportamentais se combinam para agravar o problema, tornando urgente o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e controle.

Em 2022, estimou-se que 2,5 bilhões de adultos viviam com excesso de peso, dos quais aproximadamente 890 milhões apresentavam obesidade valores que correspondem a 43% e 16% da população adulta global, respectivamente (HUNG; LEE; TSAI; HUANG *et al.*, 2024). Esses números, além de expressivos, evidenciam uma trajetória crescente e persistente da carga global da doença (WHO 2024).

Resultados recentes do Global Burden of Disease (GBD, 2021) (Figura 1 e 2) reforçam esse cenário, demonstrando por meio de séries temporais e projeções comparativas que a prevalência de sobrepeso e obesidade continua aumentando em praticamente todas as regiões do mundo (NONOGAKI, 2024; SACHS; KARIM; AKNIN; ALLEN *et al.*, 2022).

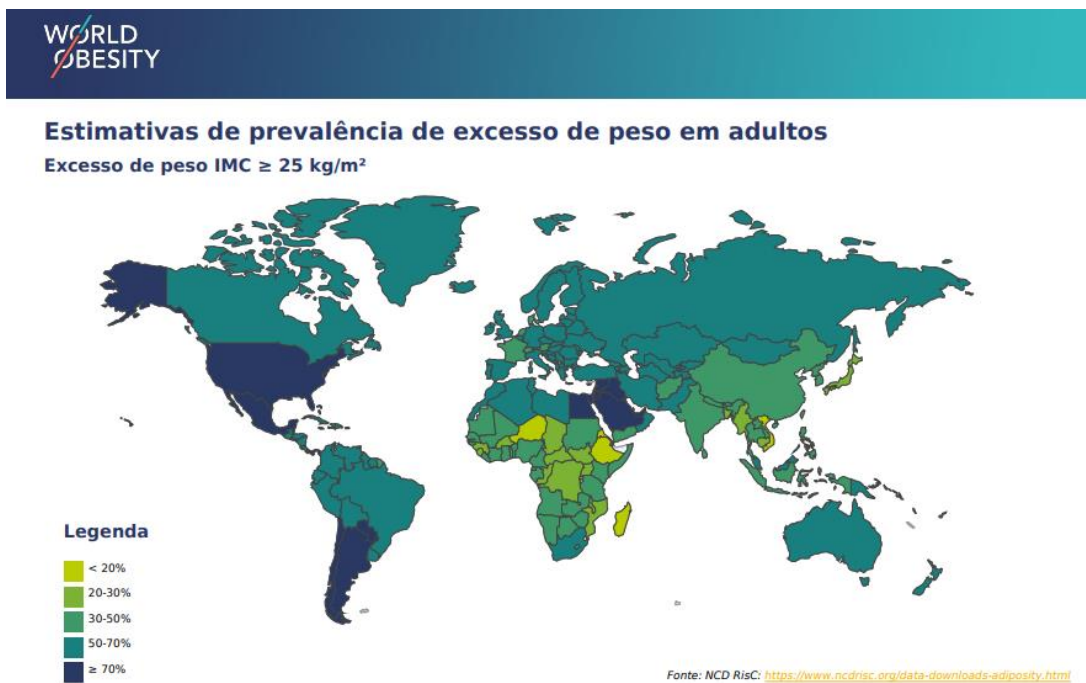


FIGURA 1: Estimativa de excesso de peso em adultos no mundo em 2021 (Fonte: Global Burden of Disease 2021)

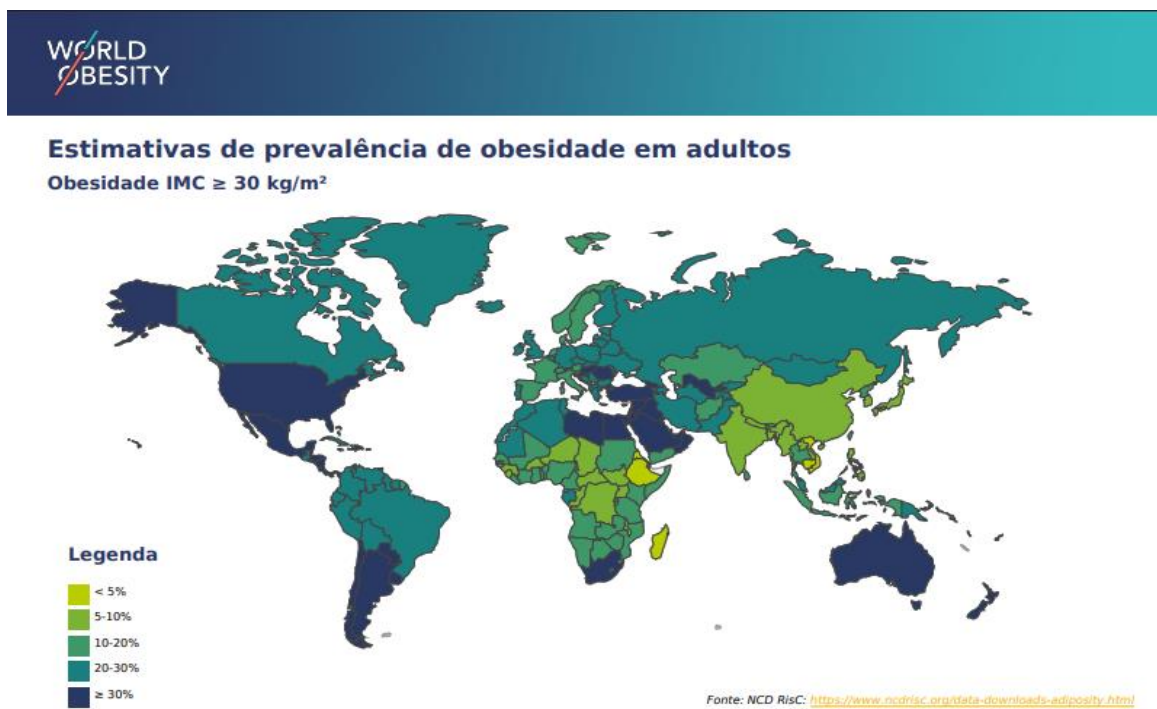


FIGURA 2: Estimativa de obesidade em adultos no mundo em 2021 (Fonte: Global Burden of Disease 2021)

O impacto da obesidade também é significativo entre as populações infantis e adolescentes. Em 2024, cerca de 35 milhões de crianças menores de cinco anos estavam classificadas com sobrepeso. Já na faixa etária de 5 a 19 anos, mais de 390 milhões de crianças e adolescentes estavam acima do peso em 2022, incluindo 160 milhões com diagnóstico de obesidade (OMS, 2024).

Determinada pela genética, biologia, disponibilidade de assistência médica, estado mental, fatores socioculturais, socioeconômicos, estilo de vida pessoal e outros indutores ambientais, a obesidade é agora geralmente reconhecida como uma doença crônica, recorrente e multifatorial, que compromete dilatoriamente quase todos os sistemas orgânicos com seus distúrbios metabólicos concomitantes ou outras comorbidades relacionadas (BUSEBEE; GHUSN; CIFUENTES; ACOSTA, 2023; LIN; LI, 2021; SINGH; SUN; CHENG; KWAN *et al.*, 2025). A obesidade apresenta-se como um grave problema de saúde pública em escala mundial, com prevalência crescente nas últimas décadas. Dados recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que mais de 500 milhões de adultos são considerados obesos e estimativas recentes indicam que a prevalência global de excesso de peso e obesidade continuará aumentando de forma expressiva ao longo das próximas décadas. Projeções sugerem que, até 2035, mais da metade da população mundial poderá estar afetada, refletindo um cenário epidemiológico de grande preocupação para a saúde pública internacional. (AHMED, SIRWAN KHALID; MOHAMMED, RIBWAR ARSALAN, 2025; COLLABORATORS, 2025; LIN; LI, 2021).

A falta de avanços significativos na prevenção e no tratamento da obesidade pode gerar um impacto econômico global anual de até US\$ 4,32 trilhões até 2035 valor comparável ao impacto econômico da COVID-19 em 2020. Esse cenário reforça a magnitude do desafio global para a saúde pública (AHMED, SIRWAN KHALID; MOHAMMED, RIBWAR ARSALAN, 2025).

Dados do GBD – Global Burden of Disease (2024) reforçam em 2021 o desafio global enfrentado pelas autoridades sanitárias visto que, o alto índice de massa corporal (IMC) está ligado a aproximadamente 1,6 milhão de mortes prematuras (Figura 3). Em paralelo, mais de 160 milhões de anos de vida são perdidos anualmente devido a doenças associadas ao excesso de peso. Se as tendências atuais continuarem, quase 3 bilhões de adultos – metade da população mundial – terão sobrepeso ou obesidade até 2030 e poucos países estão plenamente preparados para enfrentar essa realidade, seja por meio da prevenção ou do tratamento adequado. Essas são algumas das

conclusões do Atlas Mundial da Obesidade 2025, relatório produzido pela Federação Mundial da Obesidade (WORLD OBESITY FEDERATION, 2025).

Death rate from obesity, 2021

Estimated annual number of deaths attributed to obesity¹ per 100,000 people.

Our World
in Data

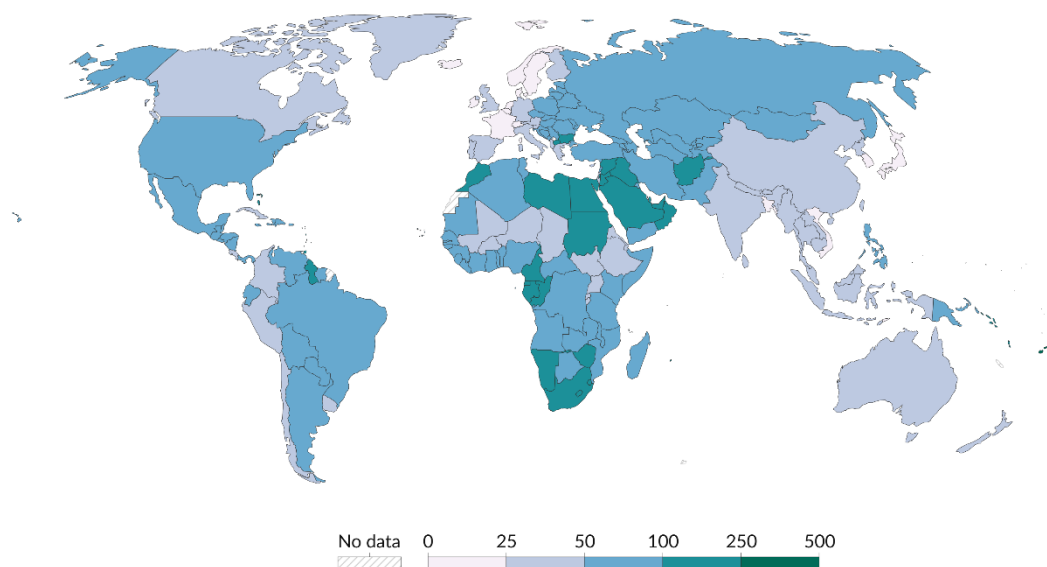


FIGURA 3: Morte por obesidade em 2021 (Fonte: Global Burden of Disease 2021)

No contexto brasileiro, informações oriundas do sistema Vigitel (2022) revelam que 60,3% da população adulta apresenta excesso de peso, o que corresponde a aproximadamente 96 milhões de indivíduos. Dentre esses, observa-se uma prevalência maior entre mulheres (62,6%) em comparação aos homens, a estimativa para 2025 é que 31% da população brasileira esteja obesa. A distribuição etária também revela um aumento progressivo do excesso de peso entre todas as faixas etárias, incluindo crianças e adolescentes (BRASIL 2021; BRASIL 2022;).

Além dos impactos individuais sobre a saúde, a obesidade acarreta custos substanciais aos sistemas de saúde e à economia. De acordo com estimativas da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), os custos globais relacionados ao sobrepeso e à obesidade alcançaram, em 2022, a marca de 2,8 trilhões de dólares, o que evidencia a necessidade urgente de ações integradas de prevenção e manejo em nível global e nacional (OPAS, 2022;(AHMED, S. K.; MOHAMMED, R. A., 2025; FATOYE; MBADA; NIYI-ODUMOSU; FATOYE *et al.*, 2025; LING; CHEN; ZAHRY;

KAO, 2023; NAGI; AHMED; REZQ; SANGROONGRUANGSRI *et al.*, 2024; OKUNOGBE; NUGENT; SPENCER; POWIS *et al.*, 2022)).

1.2. Doenças associadas à obesidade

A obesidade configura-se como um dos principais determinantes de doenças crônicas não transmissíveis, especialmente no espectro cardiometabólico (AHMED, S. K.; MOHAMMED, R. A., 2025; BARROSO; SOUZA, 2020; LIU; FANG; LU; WANG *et al.*, 2025; PUTRA; DALY; SUTIN; STEPTOE *et al.*, 2024; YAMADA; KIMURA-KOYANAGI; SAKAGUCHI; OGAWA *et al.*, 2023). O acúmulo excessivo de tecido adiposo (sobretudo visceral) promove disfunção metabólica, inflamação crônica de baixo grau e alterações hormonais que elevam o risco de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão, doença renal crônica, doença hepática gordurosa metabólica (MASLD) e cânceres relacionados à obesidade (BUSEBEE; GHUSN; CIFUENTES; ACOSTA, 2023; CHOI; WOO; KWON; JEON, 2025; WANG; WANG; XIONG; SHI *et al.*, 2025). Estudos recentes demonstram que indivíduos com obesidade apresentam risco significativamente maior de desenvolver DM2 e complicações cardiovasculares, mesmo quando metabolicamente “estáveis”, reforçando a noção de que a adiposidade excessiva compromete múltiplos sistemas orgânicos (KHAN; FIELD; CHEN; AHMAD *et al.*, 2023; OPIO; CROKER; ODONGO; ATTIA *et al.*, 2020; SCHULZE; STEFAN, 2024; ZHANG; ZHU; KIM; SUMERLIN *et al.*, 2023)

Evidências fortalecem essa associação, indicando que a obesidade aumenta substancialmente a incidência de Doenças cardiovasculares (DCV), incluindo infarto, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca (WEI; GONZÁLEZ-MARRACHELLI; MELGAREJO; LIAO *et al.*, 2023; ZEMBIC; ECKEL; STEFAN; BAUDRY *et al.*, 2021; ZHOU; MACPHERSON; GRAY; GILL *et al.*, 2021) . A presença simultânea de inflamação sistêmica, resistência à insulina e disfunção endotelial eleva o risco de eventos fatais em populações com IMC elevado (BENDER; LAUGHLIN, 2015; ENGIN, A., 2024b; HOTAMISLIGIL, 2017; VIRDIS, 2016; VIRDIS; COLUCCI; BERNARDINI; BLANDIZZI *et al.*, 2019).

Estudos clínicos e metanálises recentes mostram que a obesidade está ligada a maior mortalidade cardiovascular e global, independentemente de outros fatores de risco tradicionais, enquanto intervenções terapêuticas que promovem redução de peso ou melhora metabólica reduzem esses desfechos adversos (LINCOFF; BROWN-FRANSEN; COLHOUN; DEANFIELD *et al.*, 2023; NAUDE; BRAND; SCHOONEES; NGUYEN *et al.*, 2022; RAZA;

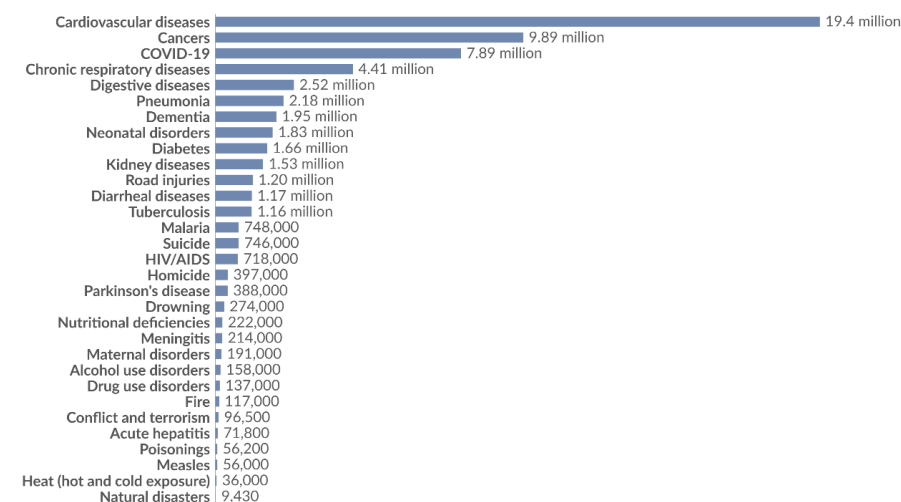
NJIDEAKA-KEVIN; POLO; AZIMUDDIN, 2023; TENDA; HENRINA; SETIADHARMA; FELIX *et al.*, 2024; WANG; WANG; XIONG; SHI *et al.*, 2025)

Além das DCV e do DM2, diversas outras comorbidades têm sido fortemente relacionadas à obesidade. Entre elas destacam-se a Doença hepática gordurosa metabólica, a apneia obstrutiva do sono, a insuficiência renal crônica, certos tipos de câncer (como colorretal, mama pós-menopausa e endométrio) e doenças osteoarticulares (GRIMM; BECKER, 2006; PICON-RUIZ; MORATA-TARIFA; VALLE-GOFFIN; FRIEDMAN *et al.*, 2017; TIMOFTE; TUDOR; MOCANU; LABUSCA, 2024; YOUNOSSI; KALLIGEROS; HENRY, 2025). Estudos recentes também demonstram que a carga global atribuível à obesidade resulta em milhões de anos de vida perdidos, incapacidades prolongadas e mortalidade precoce, reforçando seu impacto sistêmico e contínuo na saúde pública mundial (CHEN; MA; HAN; XIONG, 2024; COLLABORATORS, 2023; SONG; ZHOU; FENG; FU *et al.*, 2024)

Causes of death, World, 2021



The estimated annual number of deaths from each cause. Estimates come with wide uncertainties, especially for countries with poor vital registration¹.



Data source: IHME, Global Burden of Disease (2024)

OurWorldinData.org/causes-of-death | CC BY

FIGURA 4: Principais causas de morte no mundo em 2021 (Fonte: Global Burden of Disease 2021)

1.2.1 Fisiopatologia da obesidade: resistência à insulina, inflamação e disfunção do metabolismo

A obesidade é caracterizada por uma remodelação profunda do tecido adiposo, cuja expansão acelerada leva à hipertrofia dos adipócitos, hipóxia local e ativação de vias pró-inflamatórias como NF- κ B e JNK, resultando na liberação exacerbada de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (CHOI; SAHA; AN; CHO *et al.*, 2022; ENGIN, A., 2024c; HOTAMISLIGIL, 2017; KARLSSON; RASK-ANDERSEN; PAN; HöGLUND *et al.*, 2019; KOENEN; HILL; COHEN; SOWERS, 2021; LEE; OLEFSKY, 2021; LONGO; ZATTERALE; NADERI; PARRILLO *et al.*, 2019). Esse microambiente inflamatório estabelece um estado sistêmico de inflamação metabólica, considerado um dos principais motores das complicações cardiometabólicas associadas ao excesso de adiposidade. Evidências recentes mostram que a ativação de HIF-1 α em adipócitos hipertrofiados intensifica a expressão inflamatória e compromete a sensibilidade à insulina em diferentes tecidos metabólicos (CODONER-FRANCH; ALONSO-IGLESIAS, 2015; ENGIN, A., 2024a; ENGIN, A. B., 2024; FUJISAKA, 2021; HILL; SOLT; FOSTER, 2018; LONGO; ZATTERALE; NADERI; PARRILLO *et al.*, 2019; LU; MA; ZHAO; SONG *et al.*, 2020).

A progressão da inflamação crônica leva à resistência à insulina, resultado de interferências diretas na cascata de sinalização da insulina (LEE; OLEFSKY, 2021; LI; MENG; HE; TAN *et al.*, 2022; XU; YAN; ZHAO; WANG *et al.*, 2022). Citocinas pró-inflamatórias e intermediários lipídicos ativam cinases como JNK e IKK β , promovendo a fosforilação inibitória de IRS-1 em resíduos de serina e reduzindo sua capacidade de acionar a via PI3K/Akt. Esse bloqueio limita a translocação de GLUT4 ao sarcolema e prejudica a captação de glicose, sobretudo no músculo esquelético e no tecido adiposo branco, enquanto de forma paralela, o acúmulo de ceramidas e outros lipídeos bioativos intensifica a lipotoxicidade, comprometendo a homeostase energética celular e exacerbando tanto o estresse do retículo endoplasmático quanto a disfunção mitocondrial, eventos que contribuem de forma decisiva para o estabelecimento da resistência à insulina. (CHAURASIA; TALBOT; SUMMERS, 2020; LI; LIN; XIE; JIN *et al.*, 2022; LONGO; ZATTERALE; NADERI; PARRILLO *et al.*, 2019; OLIVEIRA; CARVALHO; TOBAR; ROPELLE *et al.*, 2011; ONO, 2019; TONG; ZHANG; LI; LIU *et al.*, 2023; YE; LIANG; GUO; YU *et al.*, 2016). Essa combinação sugere um ciclo autoreforçado entre lipotoxicidade, inflamação e falha da resposta insulínica.

O distúrbio no metabolismo lipídico constitui outra peça-chave da fisiopatologia da obesidade. A sobrecarga de ácidos graxos livres supera a capacidade oxidativa mitocondrial, levando à deposição ectópica de gordura em tecidos metabolicamente sensíveis, como fígado, músculo e pâncreas. O acúmulo de DAGs, ceramidas e outros intermediários ativa vias inflamatórias dependentes de PKC e TLR-4, ampliando a resistência à insulina e contribuindo para a evolução de condições como esteatose hepática metabólica (CHAURASIA; TALBOT; SUMMERS, 2020; LI; YANG; YE; XU *et al.*, 2024; SAMUEL; SHULMAN, 2012; ZUNIGA; RAGHURAMAN; HITCHNER; WEYAND *et al.*, 2017).

1.3.1 Saúde intestinal e obesidade: estruturas, função e importância da barreira intestinal

A mucosa intestinal desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase, operando como uma interface dinâmica entre o ambiente externo e o meio interno do organismo. A barreira intestinal é composta por enterócitos organizados em monocamada, proteínas de junção estreita (tight junctions), muco, células imunes da lâmina própria e a microbiota residente, formando um sistema integrado que controla a permeabilidade intestinal e regula o intercâmbio de nutrientes, microrganismos e moléculas bioativas (DI TOMMASO; GASBARRINI; PONZIANI, 2021; GAO; CAO; ZHAO; LI *et al.*, 2023; JANDHYALA; TALUKDAR; SUBRAMANYAM; VUYYURU *et al.*, 2015; LEMME-DUMIT, 2025; WANG; LIN; HE; LIAO *et al.*, 2025). Estudos recentes demonstram que proteínas como ocludina, claudinas e ZO-1 são determinantes para integridade da barreira, e sua redução está diretamente relacionada ao aumento da permeabilidade intestinal observada em condições metabólicas adversas, incluindo a obesidade (ALLAM-NDOUL; CASTONGUAY-PARADIS; VEILLEUX, 2020; CANI; BIBILONI; KNAUF; WAGET *et al.*, 2008; KUO; SHEN; ZUO; SHASHIKANTH *et al.*, 2019; LOMBARDO; NAVARRA; CREMONINI, 2024; MATHEUS; MONTEIRO; OLIVEIRA; MASCHIO *et al.*, 2017)

A microbiota intestinal exerce influência decisiva na funcionalidade da barreira, atuando na produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como butirato, propionato e acetato, que fortalecem as junções estreitas, modulam o sistema imune local e promovem efeitos anti-inflamatórios sistêmicos (AHO; HOUSER; PEREIRA; CHANG *et al.*, 2021; LOMBARDO; NAVARRA; CREMONINI, 2024; MANN; LAM; UHLIG, 2024; MATHEUS; MONTEIRO; OLIVEIRA; MASCHIO *et al.*, 2017; NOGAL; VALDES; MENNI, 2021). Em indivíduos

saudáveis, essa relação simbiótica contribui para a manutenção do equilíbrio metabólico e imunológico (DUAN; WANG; HUANGFU; LI, 2023; HAYS; PFAFFINGER; RYZNAR, 2024). No entanto, na obesidade, observa-se disbiose caracterizada pela redução de bactérias benéficas, diminuição de metabólitos protetores e expansão de microrganismos pró-inflamatórios, mecanismos que comprometem a integridade da barreira e promovem inflamação de baixo grau (DARYABOR; ATASHZAR; KABELITZ; MERI *et al.*, 2020; KANG; KANG; YANG; LIU *et al.*, 2022; SCHEITHAUER; RAMPANELLI; NIEUWDORP; VALLANCE *et al.*, 2020; TILG; ZMORA; ADOLPH; ELINAV, 2020).

A deterioração da barreira intestinal resulta em maior translocação de produtos microbianos, especialmente lipopolissacarídeo (LPS), para a corrente sanguínea, desencadeando um processo denominado endotoxemia metabólica. Esse fenômeno ativa vias pró-inflamatórias, como TLR-4/NF- κ B, estimulando a liberação de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, amplamente descritas na fisiopatologia da obesidade e da resistência à insulina, a ativação crônica dessas vias promove desequilíbrios sistêmicos que afetam diretamente o metabolismo glicídico e lipídico, criando um ciclo vicioso de inflamação e disfunção metabólica (KHANNA; KHANNA; KHANNA; KAHAR *et al.*, 2022; LAI; LIU; LIU; QI *et al.*, 2017; TANG; XU; ZENG; GONG, 2021; WU; HUANG; CHEN; LI *et al.*, 2019; YU; ZHU; ZHAO; LI *et al.*, 2025).

Estudos clínicos recentes reforçam a correlação entre obesidade, permeabilidade intestinal e inflamação sistêmica: concentrações elevadas de zonulina, alterações nas proteínas de junção estreita, aumento na relação Firmicutes/Bacteroidetes e redução na produção de SCFAs foram observados em indivíduos obesos quando comparados a controles metabolicamente saudáveis (FRÜHBECK; GÓMEZ-AMBROSI; RAMÍREZ; BECERRIL *et al.*, 2024; GARCIA-MANTRANA; SELMA-ROYO; ALCANTARA; COLLADO, 2018; GENSER; AGUANNO; SOULA; DONG *et al.*, 2018; MATHEUS; MONTEIRO; OLIVEIRA; MASCHIO *et al.*, 2017; NASCIMENTO; MATHEUS; OLIVEIRA; TADA *et al.*, 2021; RÉGNIER; VAN HUL; KNAUF; CANI, 2021; SEO; SEO; YEUN; CHOI *et al.*, 2021; VAN DE WOUW; SCHELLEKENS; DINAN; CRYAN, 2017). No mesmo sentido, marcadores de permeabilidade intestinal correlacionam-se com intolerância à glicose, aumento de triglicerídeos, diminuição de HDL-colesterol e níveis elevados de PCR-ultrasensível (ARANGO-GONZÁLEZ; LARA-GUZMÁN; RIVERA; ÁLVAREZ *et al.*, 2023; NEVES; COELHO; COUTO; LEITE-MOREIRA *et al.*, 2013; PEPE; CORICA; CURRÒ; AVERSA *et al.*, 2024; RIBEIRO; KRAVCHYCHYN; BRESSAN;

HERMSDORFF, 2025; RIEDEL; PHEIFFER; JOHNSON; LOUW *et al.*, 2021; ROSENDO-SILVA; VIANA; CARVALHO; REIS *et al.*, 2023).

Com base nesses achados, a preservação da integridade estrutural e funcional da barreira intestinal emerge como estratégia fundamental no enfrentamento da obesidade e suas comorbidades metabólicas. Intervenções que visam restaurar a composição da microbiota, fortalecer as tight junctions e modular a inflamação como dietas ricas em fibras, prebióticos, probióticos, compostos bioativos e mudanças no estilo de vida têm demonstrado potencial terapêutico significativo (AL-HABSI; AL-KHALILI; HAQUE; ELIAS *et al.*, 2024; LI; ZHOU; GAN; HUANG *et al.*, 2021; SHEIKH; YOUNUS; SHERGILL; HASAN, 2025). Esses achados reforçam que a saúde intestinal não é apenas componente coadjuvante, mas elemento central na prevenção e manejo da obesidade e de suas repercussões sistêmicas.

TABELA 1: Marcadores intestinais associados à integridade da barreira e inflamação na obesidade, incluindo suas funções fisiológicas, alterações observadas no estado obeso e a modulação promovida por antocianidinas, com destaque para malvidina e cianidina. **Fonte:** autoria própria.

(*continua*)

Marcador Intestinal	Papel Fisiológico	Alterações na Obesidade	Modulação por Antocianidinas	Referência
ZO-1	Mantém integridade da barreira epitelial	Redução da expressão	Aumenta ZO-1 e restaura barreira	Peng et al., 2021; Costa et al., 2021; Luo et al., 2022
Occludina	Proteína das junções oclusivas	Redução; facilita endotoxemia	Malvidina ↑ occludina; cianidina reduz estresse oxidativo	Wang et al., 2020; Chen et al., 2022; Li et al., 2023
Claudina-1	Essencial para o selamento epitelial	Diminuição; leaky gut	↑ claudina-1 via redução inflamatória	Costa et al., 2021; Qin et al., 2023
LPS	Ativa resposta inflamatória via TLR4	↑ LPS circulante	Cianidina reduz LPS; malvidina melhora junções	Chen et al., 2022; Zhang et al., 2023
TLR4	Receptor inflamatório	Hiperativado	Antocianidinas ↓ TLR4/NF-κB	Qin et al., 2023; Park et al., 2023
NF-κB	Fator pró-inflamatório	Hiperativado	Inibição por malvidina e cianidina	Wang et al., 2020; Costa et al., 2021; Li et al., 2023

TABELA 1: Marcadores intestinais associados à integridade da barreira e inflamação na obesidade, incluindo suas funções fisiológicas, alterações observadas no estado obeso e a modulação promovida por antocianidinas, com destaque para malvidina e cianidina. **Fonte:** autoria própria.

(conclusão)

<i>Akkermansia muciniphila</i>	Mantém camada de muco	Redução	Cianidina ↑ Akkermansia	Chen et al., 2022; Park et al., 2023
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Estabilidade da barreira	Redução	Cianidina ↑ Bifidobacterium	Zhang et al., 2023; Kim et al., 2024
Citocinas	Mediadores inflamatórios	Aumentadas	Antocianidinas ↓ IL-6, TNF-α, IL-1β	Costa et al., 2021; Li et al., 2023
Estresse oxidativo	Homeostase redox	Aumentado	Antioxidante potente	Wang et al., 2020; Luo et al., 2022; Kim et al., 2024

1.3.2. Integridade intestinal e impacto em distúrbios do metabolismo lipídico

A mucosa intestinal é a primeira linha de defesa entre o lúmen (nutrientes, microrganismos, metabolitos) e o meio interno do hospedeiro, sendo composta por epitélio (enterócitos), camada de muco, proteínas de junção apertada (occludina, claudinas, ZO-1), sistema imune intestinal (células dendríticas, macrófagos, linfócitos) e microbiota residente. A integridade dessa barreira regula a absorção seletiva de nutrientes e previne a translocação de produtos bacterianos (ex.: LPS) para a circulação. Quando há perda de integridade (increased intestinal permeability / “leaky gut”), observa-se translocação de LPS e outros antígenos que ativam receptores de reconhecimento de padrão especialmente TLR-4, desencadeando cascatas pró-inflamatórias (via MyD88 → NF-κB) e aumento de citocinas como TNF-α, IL-1β e IL-6; esse processo tem sido implicado como gatilho de “metabolic endotoxemia” e inflamação sistêmica de baixo grau em obesidade (BOUTAGY; MCMILLAN; FRISARD; HULVER, 2016; CANI; AMAR; IGLESIAS; POGGI *et al.*, 2007; CHAKAROUN; MASSIER; KOVACS, 2020; DAVIS; GABLER; WALKER-DANIELS; SPURLOCK, 2008; GHOSH; WHITLEY; HARIBABU; JALA, 2021; GÜNZEL; YU, 2013; HONDA; LITTMAN, 2016; KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021; KRUG; FROMM, 2020; LIM; STAUDT, 2013; LONGO; ZATTERALE; NADERI; PARRILLO *et al.*, 2019; OLIVEIRA; CARVALHO; TOBAR; ROPELLE *et al.*, 2011; SEO; SEO; YEUN; CHOI *et al.*, 2021; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).

A translocação de produtos microbianos e a ativação de TLR-4/NF- κ B têm efeitos diretos e indiretos sobre o metabolismo lipídico: LPS-induzido estímulo inflamatório aumenta a expressão de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β) que modulam o metabolismo hepático e adipocitário, promovendo secreção aumentada de VLDL, redução da atividade da lipoproteína lipase (LPL), alteração na captação/efluxo de colesterol e modulação de transportadores intestinais (ex.: NPC1L1) e vias relacionadas a acúmulo de ceramidas e estresse lipotóxico. Essas alterações favorecem esteatose hepática, perfil lipídico aterogênico (\uparrow TG, \uparrow LDL, \downarrow HDL) e progressão de doenças cardiovasculares (BOUTAGY; MCMILLAN; FRISARD; HULVER, 2016; CHAURASIA; TALBOT; SUMMERS, 2020; FERRARI; WHANG; XIAO; KENNELLY *et al.*, 2023; KOTA; RAMANA; TENORIO; ENELOW *et al.*, 2005; LEHRSKOV; CHRISTENSEN, 2019; LIBBY, 2012; MENG; ZHOU; HUANG; GU *et al.*, 2024; PORRAS; NISTAL; MARTÍNEZ-FLÓREZ; PISONERO-VAQUERO *et al.*, 2017; ROM; AVIRAM, 2016; TANG; XU; ZENG; GONG, 2021; ZHANG; YE; GONG; LV *et al.*, 2017; ZHENG; SECHI; NAVARESE; CASU *et al.*, 2024). Evidências experimentais recentes e revisões clínicas associam permeabilidade intestinal aumentada e endotoxemia a alterações sustentadas no metabolismo lipídico mediadas por TLR-4 / NF- κ B e por citocinas inflamatórias(CANI; AMAR; IGLESIAS; POGGI *et al.*, 2007; DAVIS; GABLER; WALKER-DANIELS; SPURLOCK, 2008; DING; SUBRAMANIAN; MONTES; GOODSPEED *et al.*, 2012; HAN; WU; LING; WU *et al.*, 2021).

Modelos celulares e pré-clínicos (por exemplo 3T3-L1 para adipócitos e Caco-2 para epitélio intestinal) são ferramentas centrais para investigar mecanismos moleculares: em 3T3-L1 avalia-se a modulação de genes de captação de glicose (Slc2A4/GLUT4), adipocinas (ADIPOQ) e marcadores lipogênicos/lipolíticos (LPL, genes reguladores do VLDL), bem como a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e ativação de NF- κ B após estímulos (LPS, ácidos graxos saturados, extratos bioativos). Em Caco-2 estudam-se alterações de CLDN/OCLN/ZO-1, produção de muco e a resposta TLR-4 mediada por LPS, bem como a ligação entre perda de barreira e transporte intestinal de lipídios (incluindo regulação de NPC1L1)(BASHIR; KIM; CHUN; CHOI *et al.*, 2023; ECKMANN, 2006; HERMAN; KRAVOS; JENSTERLE; JANEŽ *et al.*, 2022; JANG, 2016; KIM; HA; KIM, 2020; LIM; LEE; HAN; CHOI, 2021; MA; QUAN; LI; HE *et al.*, 2018; MOINI; TIROSH; PARK; CHO *et al.*, 2002; PARADA VENEGAS; DE LA FUENTE; LANDSKRON; GONZÁLEZ *et al.*, 2019; PARK; KUNITAKE; HIRASAKI; TANAKA *et al.*, 2015; SANG; WANG; NING; WANG *et al.*, 2023; XIAO; DONG; LIU; MENG *et al.*, 2023). Intervenções com

compostos naturais (por exemplo antocianidinas) mostraram, em estudos *in vitro* e *in vivo* recentes, capacidade de modular TLR-4/NF- κ B, reduzir IL-6/TNF- α /IL-1 β , melhorar expressão de proteínas de junção e atenuar sinais de disfunção lipídica (redução de TG/LDL e acúmulo lipídico hepático/adipocitário), justificando ensaios dirigidos em 3T3-L1 e Caco-2 para avaliar efeitos sobre os marcadores pedidos (TNF α , IL1 β , IL6, NF κ B, TLR-4; Slc2A4/GLUT4; NPC1L1; LPL; CLD/OCLN/ZO-1)(ABOONABI, 2020; CHEN; LIU; XIONG; WU *et al.*, 2019; HARIRI; AMIRKALALI; GHOLAMI, 2024; HONG; KIM; KIM, 2021; LIU; SHANGGUAN; ZHANG; DUAN, 2024; MATTIOLI; FRANCIOSO; MOSCA; SILVA, 2020; MOLONIA; OCCHIUTO; MUSCARÀ; SPECIALE *et al.*, 2020; RUY; SANTOS; PEREIRA; RIBEIRO, 2025; SPECIALE; MOLONIA; MUSCARÀ; CRISTANI *et al.*, 2024; TSUDA, 2008; WANG; WANG; WANG; WANG *et al.*, 2015)

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, torna-se relevante contextualizar essas evidências dentro da fisiopatologia sistêmica da obesidade. A obesidade constitui uma condição multifatorial fortemente associada à inflamação crônica de baixo grau, disfunção do metabolismo lipídico e resistência à insulina. Evidências recentes reforçam o papel do eixo intestino–tecido adiposo na progressão dessas alterações, sobretudo por mecanismos relacionados ao aumento de permeabilidade intestinal, endotoxemia metabólica e ativação de vias pró-inflamatórias como o eixo LPS/TLR4/NF- κ B. Nesse contexto, compostos bioativos naturais, incluindo antocianinas e antocianidinas, têm sido propostos como estratégias adjuvantes para modular processos inflamatórios e metabólicos envolvidos na fisiopatologia da obesidade.

1.4. Antocianidinas: Cianidina e Malvidina, obesidade e saúde intestinal

As antocianidinas, especialmente cianidina e malvidina, emergem como compostos bioativos de destaque na interface entre obesidade, inflamação e integridade intestinal, atuando como moduladores de vias metabólicas e imunológicas essenciais (BASTIN; SADEGHI; NEMATOLLAHI; ABOLHASSANI *et al.*, 2021; CHAMNANSILPA; AKSORNCHU; ADISAKWATTANA; THILAVECH *et al.*, 2020; GO; RYU; GIM; SHIN *et al.*, 2025; GUO; XIA; ZOU; LING *et al.*, 2012; KOWALCZYK; MUSKAŁA; MERECZ-SADOWSKA; SIKORA *et al.*, 2024; MERECZ-SADOWSKA; SITAREK; KOWALCZYK; ZAJDEL *et al.*, 2023; SAULITE; JEKABSONS; KLAVINS; MUCENIECE *et al.*, 2019; VALENTI; RISO; MAZZOCCHI; PORRINI *et al.*, 2013; ZHANG; LIU; ZENG; MENG *et al.*, 2022). Em modelos celulares, animais

e estudos clínicos, essas moléculas demonstram capacidade de regular marcadores inflamatórios clássicos associados à obesidade, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B, PCR e TLR-4 além de influenciar positivamente a estrutura e função da barreira intestinal (BHASWANT; FANNING; NETZEL; MATHAI *et al.*, 2015; GO; RYU; GIM; SHIN *et al.*, 2025; HARIRI; AMIRKALALI; GHOLAMI, 2024; HUANG; ZHU; LI; SUI *et al.*, 2016; LIU; ZHOU; SONG; YANG *et al.*, 2021; SPECIALE; MOLONIA; MUSCARÀ; CRISTANI *et al.*, 2024). As antocianidinas exercem efeito redutor sobre a expressão de TLR-4, atenuando a ativação da cascata pró-inflamatória dependente de NF- κ B, reduzindo a secreção sistêmica e local de TNF- α e IL-6, enquanto restauram o equilíbrio imunometabólico prejudicado pela condição obesogênica. Estudos apontam também diminuição da PCR de alta sensibilidade (hs-CRP) em protocolos clínicos que utilizam alimentos ou extratos ricos em antocianinas. Esses efeitos são particularmente relevantes diante da constatação de que a inflamação de baixo grau sustentada é amplamente modulada por vias intestino-imunometabolismo (CREMONINI; MASTALOUDIS; HESTER; VERSTRAETEN *et al.*, 2017; HARIRI; AMIRKALALI; GHOLAMI, 2024; HOTAMISLIGIL, 2017; HUANG; LIU; WANG; WANG *et al.*, 2014; TAN; LI; HOU; WU, 2019).

As antocianidinas cianidina e malvidina pertencem à classe dos flavonoides fenólicos e diferenciam-se principalmente pelo padrão de substituição química em seu anel flavílio. A cianidina apresenta maior número de grupos hidroxila (-OH), enquanto a malvidina possui grupos metoxi (-OCH₃), diferenças estruturais que influenciam propriedades físico-químicas como polaridade, estabilidade e interação com alvos moleculares. Essas características podem impactar a biodisponibilidade e a capacidade de modulação de vias inflamatórias e metabólicas associadas à obesidade, incluindo processos relacionados à inflamação crônica de baixo grau e ao metabolismo lipídico. Do ponto de vista dietético, a cianidina é predominantemente encontrada em frutas vermelhas, cerejas, repolho roxo e arroz negro, enquanto a malvidina é abundante em uvas escuras, vinho tinto, mirtilo e suco de uva, destacando a relevância nutricional dessas antocianidinas e seu potencial interesse translacional (Figura 5).

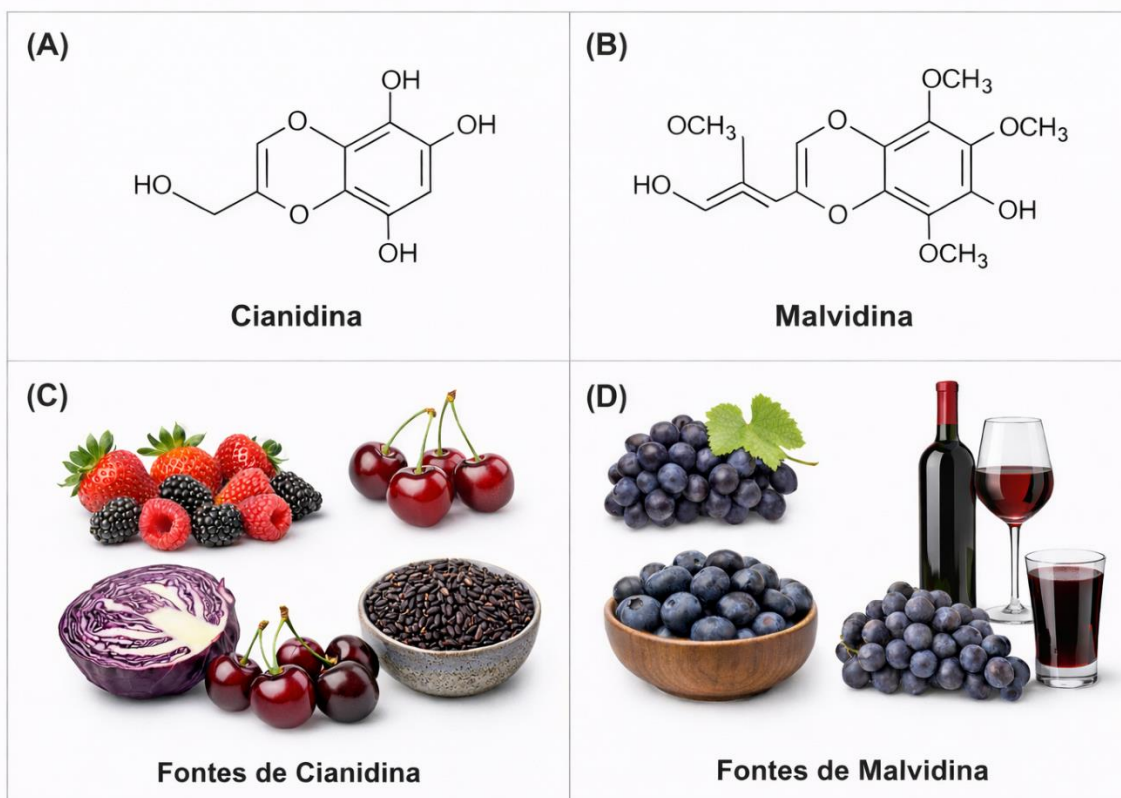


FIGURA 5: Estruturas químicas das antocianidinas cianidina (A) e malvidina (B) e exemplos de alimentos naturalmente ricos nesses compostos (C e D, respectivamente). As diferenças estruturais entre cianidina e malvidina, especialmente no padrão de substituição por grupos hidroxila (–OH) e metoxi (–OCH₃), podem influenciar suas propriedades físico-químicas, biodisponibilidade e interações moleculares, contribuindo para diferenças em seus efeitos biológicos. Fonte: Elaborado pelo autor. Nota: Figura criada com o auxílio da plataforma BioRender.com (licença de uso).

No trato gastrointestinal, cianidina e malvidina apresentam ação direta sobre proteínas estruturais das tight junctions, como occludina, claudinas e ZO-1, contribuindo para a restauração da integridade da barreira epitelial (GO; RYU; GIM; SHIN *et al.*, 2025; HUANG; LIU; WANG; WANG *et al.*, 2014; LI; WU; FU; REDDIVARI, 2019; VEREDIANO; STAMPINI DUARTE MARTINO; DIAS PAES; TAKO, 2021). A permeabilidade intestinal aumentada marcada por disfunção nas junções estreitas e elevação de marcadores como zonulina facilita a passagem de lipopolissacarídeos (LPS) para a circulação portal, ativando TLR-4 e intensificando a inflamação sistêmica (CANI; AMAR; IGLESIAS; POGGI *et al.*, 2007; COCHET; PERI, 2017; FASANO, 2012). As antocianidinas mitigam esse processo ao promover a expressão de occludina e ZO-1,

reduzir o estresse oxidativo e modular a microbiota intestinal, favorecendo bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como butirato, que fortalecem a barreira epitelial e reprimem vias inflamatórias (DU; HE; AN; HUANG *et al.*, 2024; MO; NI; ZHANG; XU *et al.*, 2022; OLEJNIK; KOWALSKA; KIDOń; CZAPSKI *et al.*, 2016; PARADA VENEGAS; DE LA FUENTE; LANDSKRON; GONZÁLEZ *et al.*, 2019; ZHANG; CHANG; SHAO; ZHAO *et al.*, 2022). Em modelos 3T3-L1 e Caco-2, observam-se ainda efeitos regulatórios sobre genes ligados ao transporte de glicose (Slc2A4/GLUT4) e metabolismo lipídico (NPC1L1, Lpl), indicando um papel direto no controle da adipogênese e captação lipídica (ALTMANN; DAVIS; ZHU; YAO *et al.*, 2004; MORELLI; SAVOVA; QUEIROZ; HARMS *et al.*, 2025; SHEPHERD; KAHN, 1999; THU; CHEN; RUBINSTEIN; CHEVEE *et al.*, 2014; ZECHNER; STRAUSS; FRANK; WAGNER *et al.*, 2000).

Somando a isso, estudos mostram que cianidina e malvidina reduzem significativamente a endotoxemia metabólica condição caracterizada pelo aumento crônico de LPS circulante, altamente prevalente em indivíduos obesos (BOUTAGY; MCMILLAN; FRISARD; HULVER, 2016; DU; DING; ZHANG; HUANG *et al.*, 2025; GODYLA-JABŁOńSKI; RACZKOWSKA; JODKOWSKA; KUCHARSKA *et al.*, 2024; KIADEHI; SAMANI; BARAZANDEH; PAM *et al.*, 2025; LI; WU; FU; REDDIVARI, 2019; RUY; SANTOS; PEREIRA; RIBEIRO, 2025). A neutralização desse estímulo inflamatório reduz a ativação de TLR-4 em tecidos periféricos, incluindo tecido adiposo, fígado e músculo esquelético, repercutindo na melhora da resistência à insulina. Em adipócitos 3T3-L1 diferenciados, a exposição a antocianidinas reduz a transcrição de TNF- α e IL-1 β , enquanto aumenta sensibilidade à insulina e fosforilação de AMPK, resultando em menor lipólise inflamatória e menor acúmulo lipídico (KIM; HAN; PARK, 2025; LEE; YOON; YOON; PARK *et al.*, 2017; MA; DU; LI; YANG *et al.*, 2021; SASAKI; NISHIMURA; HOSHINO; ISA *et al.*, 2007; TSUDA, 2008). Esses efeitos contribuem para a regulação do perfil lipídico sistêmico, redução do colesterol LDL oxidado e melhora da função mitocondrial.

No contexto metabólico sistêmico, há evidências de que antocianidinas possuem a capacidade de remodelar vias centrais da fisiopatologia obesogênica, reduzindo estresse oxidativo, melhorando a ação da insulina e modulando sinais inflamatórios provenientes do intestino. No eixo frequentemente designado como "intestino-metabolismo-inflamação" (CHEN; KORTESNIEMI; LINDERBORG; YANG, 2023; SONG; YUAN; WANG; MAI *et al.*, 2023; TIAN; ZHAO; ZHANG; CHEN *et al.*, 2021; TIAN; NING; SHAO; SONG *et al.*, 2020; TSUDA, 2008).

Intervenções dietéticas baseadas em alimentos ricos em cianidina (como amora, mirtilo, açaí) e malvidina (como uva roxa e vinho tinto sem álcool) demonstram redução consistente da IL-6, TNF- α e PCR em humanos, ao mesmo tempo em que melhoram parâmetros de permeabilidade intestinal, sensibilidade à insulina e distribuição de gordura corporal. A restauração da barreira epitelial e o reequilíbrio da microbiota parecem ser componentes centrais desses efeitos (CHAMBERS; PRESTON; FROST; MORRISON, 2018; DU; DING; TIAN; CHEN *et al.*, 2024; NOGAL; VALDES; MENNI, 2021; SCAZZOCCHIO; VARI; FILESI; D'ARCHIVIO *et al.*, 2011; SIVAMARUTHI; KESIKA; CHAIYASUT, 2020; SONG; YUAN; WANG; MAI *et al.*, 2024; STULL; CASH; JOHNSON; CHAMPAGNE *et al.*, 2010; ZORRAQUÍN-PEÑA; TALADRID; TAMARGO; SILVA *et al.*, 2021) (Figura 6).

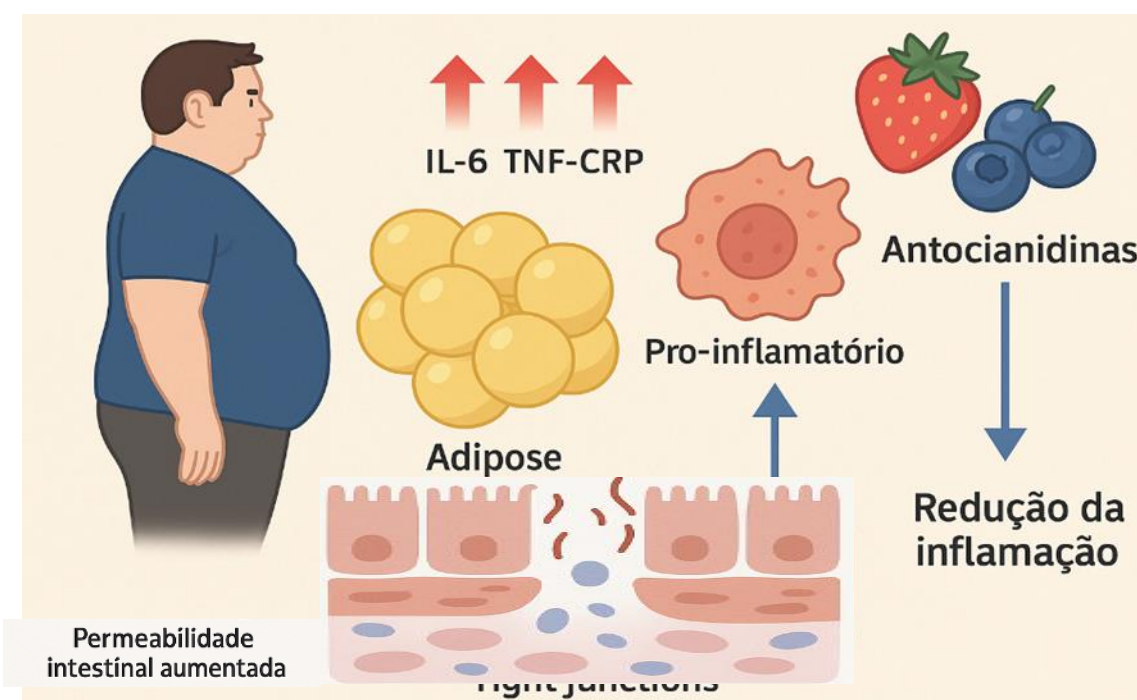


FIGURA 6: Representação esquemática dos efeitos das antocianidinas sobre a inflamação associada à obesidade. O acúmulo de tecido adiposo na obesidade promove aumento de citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF- α e PCR, contribuindo para ativação de células pró-inflamatórias e disfunção das tight junctions no epitélio intestinal. As antocianidinas, presentes em frutas como morango e mirtilo, exercem ação anti-inflamatória, reduzindo a ativação celular e promovendo melhora da integridade das junções epiteliais. Fonte: Elaborado pelo autor. Nota: Figura criada com o auxílio da plataforma BioRender.com (licença de uso).

Diante desses achados, a busca por estratégias terapêuticas capazes de atuar simultaneamente sobre inflamação, metabolismo lipídico e integridade intestinal torna-se não apenas relevante, mas necessária. Compostos bioativos de origem alimentar têm despertado especial interesse, em virtude de sua ampla disponibilidade, perfil de segurança e potencial modulador de vias metabólicas e imunológicas. Entre esses compostos, as antocianidinas, com destaque para a cianidina e a malvidina que vêm se consolidando como moléculas promissoras, capazes de exercer efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e regulatórios sobre a homeostase metabólica.

Em conjunto esses dados tornam-se evidente que a obesidade ultrapassa a noção clássica de simples desequilíbrio energético, configurando-se como uma condição sistêmica complexa, marcada por inflamação crônica de baixo grau, disfunções no metabolismo lipídico e glicídico e comprometimento progressivo de múltiplos eixos fisiológicos. Do ponto de vista imunometabólico, o tecido adiposo deixa de atuar apenas como reservatório energético e passa a exercer papel ativo na modulação imunometabólica, por meio da secreção de adipocinas, citocinas pró-inflamatórias e intermediários lipídicos bioativos, que contribuem diretamente para a resistência à insulina, a lipotoxicidade e o aumento do risco cardiometabólico.

Paralelamente, a crescente compreensão do papel da saúde intestinal na fisiopatologia da obesidade reforça a existência de um eixo integrado intestino–metabolismo–inflamação, no qual a integridade da barreira epitelial intestinal emerge como elemento central. A disfunção das tight junctions, associada à disbiose e ao aumento da permeabilidade intestinal, favorece a translocação de produtos microbianos, especialmente o lipopolissacarídeo, desencadeando endotoxemia metabólica e amplificando a ativação de vias inflamatórias sistêmicas, como TLR-4/NF- κ B. Esses mecanismos não apenas perpetuam o estado inflamatório crônico, mas também interferem diretamente no metabolismo lipídico, promovendo alterações no perfil de lipoproteínas, acúmulo ectópico de gordura e progressão de doenças metabólicas associadas à obesidade.

Evidências crescentes demonstram que essas antocianidinas são capazes de modular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, atenuar a ativação de vias como NF- κ B e JNK, melhorar a sensibilidade à insulina e interferir positivamente no metabolismo lipídico, reduzindo o acúmulo de triglicerídeos e a lipotoxicidade celular. Adicionalmente, seus efeitos sobre a barreira intestinal incluindo o fortalecimento das proteínas de junção estreita, a redução da permeabilidade intestinal

e a modulação favorável da microbiota apontam que essas moléculas atuam de forma integrada sobre os principais eixos fisiopatológicos envolvidos na obesidade.

As evidências apresentadas na literatura, permanece uma lacuna importante quanto à avaliação isolada de antocianidinas específicas em modelos celulares controlados. Apesar do avanço do conhecimento sobre antocianinas de forma geral, ainda é limitada a compreensão mecanística dos efeitos de antocianidinas específicas, particularmente cianidina e malvidina, avaliadas de forma isolada e em condições experimentais controladas, sobretudo no que se refere à modulação do eixo LPS/TLR4–NF- κ B e suas consequências sobre inflamação metabólica, acúmulo de triglicerídeos e resistência à insulina no adipócito. Nesse contexto, o presente estudo foi delineado para preencher essa lacuna, investigando os efeitos dose-dependentes de cianidina e malvidina em modelos celulares complementares (Caco-2 e 3T3-L1), avaliando parâmetros relacionados ao metabolismo lipídico, resistência à insulina e expressão gênica de biomarcadores inflamatórios e metabólicos.

2. OBJETIVO

Avaliar o potencial anti-inflamatório das antocianidinas Cianidina (C) e Malvidina (M) sobre o metabolismo lipídico em modelos experimentais de pré-adipócitos 3T3-L1 e Caco-2.

2.1. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento de diferentes concentrações de C e M sobre o acúmulo de TG em pré-adipócitos 3T3-L1;
- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento de diferentes concentrações de (C) e (M) sobre a resistência à insulina em linhagem 3T3-L1;
- ✓ Avaliar a captação de lipídios em ensaio *in vitro* em modelo de monocamada de células Caco-2;
- ✓ Investigar a modulação da expressão gênica de biomarcadores relacionados ao processo inflamatório (TNF α , IL1b, IL6, NFkB, PCR, TLR-4) e metabolismo de glicose (Slc2A4 (Glut4) e perfil lipídico (NPC1L1, Lpl) em linhagem celular 3T3-L1;
- ✓ Analisar a modulação do perfil inflamatório (TNF α , IL1b, IL6, NFkB, PCR, TLR-4), expressão de genes associados ao transporte lipídico (NPC1L1, Lpl) e de integridade de barreira intestinal (Cld, Ocln, Zo1) em modelo celular Caco-2 após o tratamento com as antocianidinas C e M.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Linhagens*

A linhagem celular 3T3-L1 foi adquirida no Banco de Celulares do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil) e cultivada até a confluência em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina/glutamina a 37 °C e 5% de CO₂.

Células intestinais humanas da linhagem Caco-2 (Banco de células do Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivadas em meio MEM (+20% de soro bovino fetal + 1% de piruvato, 1% de NEAA, 1% de glutamina, 1% de penicilina, 1% de estreptomicina) e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Quando atingiram 80% de confluência, sendo observadas através de

microscópio invertido, as células serão submetidas a Tripsina 0,25% (Gibco/Invitrogen™, Estados Unidos) e transferidas para as placas destinadas aos ensaios de Captação de Triglicerídeos (Modelo experimental induzido por Oil Red O) e para o Ensaio de Indução de Inflamação por LPS. As células foram transferidas para placas de 96 poços (Kasvi®, Pinhais, Paraná, Brasil) na densidade de $1,92 \times 10^4$ células/poço ou em placas de 6 poços na densidade de $5,7 \times 10^5$ (NATOLI et al., 2012; PONCE DE LEÓN-RODRÍGUEZ; GUYOT; LAURENT-BABOT, 2019).

3.2 *Antocianidinas*

As antocianidinas utilizadas foram cianidina (chloride) (Cayman Chemical, Item No. 14803) e malvidina (chloride) (Cayman Chemical, Item No. 19752), ambas correspondendo a antocianidinas na forma aglicona (não glicosiladas), fornecidas como sal cloreto (flavylium chloride). De acordo com o fabricante, os compostos apresentam pureza $\geq 98\%$. Para malvidina, o certificado de análise (COA) do lote (Batch No. 0634580) confirmou pureza por HPLC de 100,0%, com validação de identidade por espectrometria de massas ($M-CI = 331.1$) e espectroscopia (IR e NMR conformes). As soluções estoque foram preparadas imediatamente antes do uso e mantidas protegidas da luz e a 4 °C durante os ensaios, visando reduzir degradação fotoquímica e oxidação. Para todos os tratamentos, os compostos foram dissolvidos inicialmente em DMSO, com concentração final do veículo mantida em 0,1% (v/v) em todos os grupos, incluindo o controle veículo. As concentrações finais avaliadas foram 5, 10 e 100 μ M. Essas doses foram definidas com base em estudos prévios conduzidos pelo grupo de pesquisa, bem como em evidências descritas na literatura, nas quais esses compostos demonstraram atividade biológica em modelos celulares

comparáveis. A utilização de diferentes concentrações foi planejada para permitir a análise de efeitos dependentes da dose, incluindo condições de maior exposição celular, com o objetivo de investigar possíveis fenômenos de saturação, competição por transportadores ou sítios de ligação, bem como alterações na cinética intracelular, biodisponibilidade e resposta farmacodinâmica dos compostos. A inclusão de concentrações mais elevadas também possibilita avaliar a ocupação de alvos moleculares e potenciais limitações associadas à capacidade de internalização ou metabolização celular. Esse delineamento experimental permite uma análise mais abrangente da relação dose–resposta, contribuindo para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação dos parâmetros inflamatórios e metabólicos avaliados. As soluções de trabalho foram obtidas por diluição das soluções estoque em meio de cultura completo e adicionadas aos poços no início de cada experimento. Considerando a estabilidade limitada de antocianidinas em condições aquosas e pH fisiológico, o preparo foi realizado imediatamente antes da incubação; adicionalmente, o fabricante descreve que os compostos são pouco solúveis em tampões aquosos e recomenda não armazenar soluções aquosas por mais de 24 h, reportando solubilidade aproximada de 0,1 mg/mL em DMF:PBS (1:9) a pH 7,2. Não foi realizada quantificação das antocianidinas no meio de cultura ao longo do tempo por LC-MS/LC-MS/MS; assim, as concentrações foram consideradas nominais, devendo-se considerar possível variação da dose efetivamente disponível às células em função de estabilidade dependente de pH/tempo e interações com componentes do meio.

Considerando a estabilidade limitada das antocianidinas em meio aquoso e em pH fisiológico, todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e protegidas da luz ao longo dos experimentos. As concentrações avaliadas (5, 10 e 100 μ M) foram consideradas nominais, uma vez que não foi realizada quantificação da concentração efetivamente disponível no meio ao longo do tempo por métodos analíticos (ex.: LC-MS/MS). Assim, possíveis variações na biodisponibilidade celular decorrentes de degradação, oxidação ou interação com componentes do meio de cultura devem ser consideradas como limitação inerente aos ensaios *in vitro* conduzidos com antocianidinas.

3.3 Determinação da Citotoxicidade - Ensaio MTT

A determinação da toxicidade celular dos compostos utilizados neste trabalho foi estimada utilizando o teste de redução do sal de tetrazólio (ensaio MTT), conforme método previamente

descrito (SANTOS; GOTARDO; BRIANTI; PIRAEI *et al.*, 2014). Células 3T3-L1 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células por poço e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina e malvidina (5, 10 e 100 μM) por 48 h. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio por enzimas mitocondriais. Após incubação com MTT, o formazan formado foi solubilizado e a absorbância foi medida em espectrofotômetro, sendo os resultados expressos em relação ao grupo controle.

3.4 Ensaios desenvolvidos com linhagem de pré adipócitos 3T3-L1

Células da linhagem murina 3T3-L1 (ATCC, EUA) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, mantidas em incubadora a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

As células foram mantidas em frascos de cultura até atingirem aproximadamente 80% de confluência, sendo então tripsinizadas com solução de tripsina-EDTA e semeadas em placas de cultura apropriadas para cada ensaio experimental.

3.4.1 Diferenciação de adipócitos e coloração com Oil Red O

O protocolo de diferenciação de adipócitos de pré adipócitos 3T3-L1 foi desenvolvido conforme descrito por Madani, *et al.* com adaptações (MADANI; MAJEED; ABDESSELEM; AGHA *et al.*, 2021). Para tanto, pré-adipócitos 3T3-L1 foram plaqueados em placas de 6 poços (2,0 x 10⁵ células por poço), e após as células atingirem 100% de confluência, a diferenciação foi induzida com a adição de coquetel de diferenciação durante 96 horas (4 dias) acrescido dos compostos de tratamento C e M nas diferentes concentrações propostas (5, 10 e 100 μM). O coquetel de diferenciação foi composto de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina/glutamina, 0,01 de dexametasona (1 mM), 0,01 de insulina (100 UI) e 0,1 de IBMX (0,5 mM). Após as 96 horas, o coquetel foi retirado, e o meio foi substituído por coquetel de maturação, composto de meio DMEM completo suplementado com de insulina

(100 UI) durante 10 dias e trocado a cada 2-3 dias. Ao final deste período, as células foram coletadas e armazenadas em freezer à -80 °C para análises de expressão gênica de biomarcadores inflamatórios (TNF α , IL1b, IL6, NFkB, PCR, TLR-4), de metabolismo de glicose (Slc2A4 (Glut4), ADIPOq, CdKn), bem como captação de lipídios (Lpl).

A fim de verificar o acúmulo de triglicerídeos nos diferentes grupos de tratamento, foi desenvolvido o ensaio de coloração *Oil Red O* (MOON; CHUNG; LEE; KIM *et al.*, 2007). Para tanto, paralelamente ao ensaio desenvolvido nas placas de 6 poços, uma placa de 96 poços foi utilizada para o cultivo celular, submetido às mesmas condições e tratamentos descritos acima e, após o período de maturação, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 min e incubadas por 1 h com solução de Oil Red O a 1%. Após múltiplas lavagens com água, o *Oil Red O* foi dissolvido em álcool isopropílico a 100% e a densidade óptica foi medida num espectrofotômetro de microplacas a 540 nm. Os dados foram apresentados como média \pm DP de três experimentos independentes (cada um em triplicata).

3.4.2 Teste de Resistência à insulina

Pré-adipócitos 3T3-L1 foram submetidos a teste para verificação de resistência à insulina, conforme adaptado de Den Hartogh et al. (DEN HARTOGH; VLAVCHESKI; GIACCA; MACPHERSON *et al.*, 2022) Para tanto, estas células previamente plaqueadas em placas de 6 poços, foram submetidas ao processo de diferenciação por 96h concomitantemente ao tratamento com C e M (5, 10 e 100 μ M) e, ao final do período de maturação (10 dias), o meio foi substituído por meio DMEM completo adicionado de 0,2 mM de Palmitato (conjugada com BSA resultando em solução estoque de palmitato de 8mM) durante 16 horas. Ao término desse período, 100nM de insulina foi adicionado aos poços durante 30 minutos. Finalmente o meio de cultivo foi coletado, e a avaliação dos níveis de glicose presentes nas amostras foi detectado com o uso de kit comercial (LABORLAB, Guarulhos-SP, Brasil), realizado conforme especificações do fabricante. Além disso, as células foram coletadas para análises de expressão gênica de biomarcadores relacionados ao metabolismo de glicose tais como Slc2A4 (Glut4), ADIPOq e CdKn.

3.4.3 Análises de perfil lipídico

O conteúdo de TG extracelulares foi avaliados utilizando um kit comercial (LABORLAB, Guarulhos-SP, Brasil) conforme descrito por Santos et al. (SANTOS; GOTARDO; BRIANTI; PIRAEI *et al.*, 2014). Para tanto, ao final do período de maturação, as células foram

privadas de soro fetal bovino 24 horas antes da coleta. A absorbância a 550 nm é proporcional à concentração de triglicerídeos de cada amostra.

Níveis extracelulares de CL e AGL, também foram mensurados. Resumidamente, ao final do período de maturação o meio de cultivo foi coletado e os ensaios foram realizados com o uso de kits comerciais (LABORLAB, Guarulhos-SP, Brasil). Todas as amostras foram determinadas em triplicata.

3.4.4 Avaliação da expressão de gênica

A extração de RNA total das amostras foi realizada utilizando o protocolo de extração com Trizol. Para tanto, as células foram homogeneizadas com 750µL de Trizol™ Reagent (Invitrogen™), seguido da adição de 200 µL de clorofórmio e incubação a 4°C durante 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (12000 g, 4°C, 10 minutos), e a fase aquosa coletada e homogeneizada com uma mistura contendo 100 µL de álcool isoamílico, 20 µL de AcNa 3M e 1 µL de Glicógeno (10 µg/ µL) (GenElute LPA-Sigma Aldrich, MO, Estados Unidos). Em seguida, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos, seguida de nova centrifugação (12000 g, 4°C, 10 minutos). O sobrenadante foi descartado e, em sequência 500 µL de álcool 75% foram adicionados ao pellet resultante e, após nova centrifugação (12000 g, 4°C, 5 minutos), o solvente foi descartado. Após evaporação completa do solvente (10-15 minutos) os pellets foram ressuspensos em um volume apropriado de H₂O nuclease free (cerca de 10- 20µL), e a concentração de RNA total das amostras foi mensurada por espectrofotometria com auxílio do equipamento NanoDrop 2000 (ThermoScientific™, MA, USA). A reação de PCR em tempo real foi desenvolvida utilizando-se o SYBR® (Go-Taq Master Mix, Promega, [Madison, Wisconsin, EUA](#)) conforme especificações do fabricante. Os experimentos foram realizados em duplicata, e as amostras foram normalizadas utilizando-se controles constitutivos. Todas as reações de PCR em tempo real foram desenvolvidas no equipamento 7300 Real-Time PCR System.

TABELA 2: Sequências de primers utilizados para qPCR no ensaio em 3T3-L1. Para obtenção dos dados apresentados, foram utilizados primers específicos para os genes relacionados ao processo inflamatório, metabolismo lipídico e transporte de glicose, empregados nas análises de expressão gênica por RT-qPCR em células 3T3-L1. As sequências foram selecionadas com base em dados da literatura e bancos genéticos, sendo utilizadas após extração de RNA total, síntese de cDNA e amplificação por PCR em tempo real, conforme descrito na seção de Materiais e Métodos.

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	GenBank number
18S	AAACGGCTACCACATCCAAG	CAATTACAGGGCCTCGAAAG	19791
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT	14433
LPL	CAGGATGCAACATTGGAGAA	CAGCAGGGAGTCAATGAAGAG	16956
TNF-α	GACGCAATTAAGTTTTGAGGGCC	GGGGACACACAAAGCATCAAG	21926
IL-6	AAAGAGGCACTGGGCAGAAA	TTTACCAGGCAAGTCTCCT	16193
IL1-β	TGGCAATTGATCTGGTTCATC	GTTTAGGAATCTTTCCCACTT	16176
NFKβ	AATGTAGTTGCCACGCACAG	GACACTGCACCTGAGCCATA	18033
TLR-4	AGCTTCTCCAATTTTTTCAGAACTTC	TGAGAGGTGGTGTAAAGCCATGC	21898
PI3K	CAGTTTGGTGTATCCTGGAAGC	TCTGCTCAGCTTACCGCATTC	74769
IRS-1	TGTCACCCAGTGGTAGTTGCTC	CTCTCAACAGGAGGTTTGGCATG	16367
IRS-2	CCAGTAAACGGAGGTGGCTACA	CCATAGACAGCTTGGAGCCACA	384783
Slc2A4 (Glut4)	GGTGTGGTCAATACGGTCTTCAC	AGCAGAGCCACGGTCATCAAGA	20528
Akt	GGACTACTTGCACTCCGAGAAG	CATAGTGGCACCGTCCTTGATC	11651

3.5 Ensaios desenvolvidos com linhagem Caco-2

Células epiteliais intestinais humanas da linhagem Caco-2 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivadas em meio MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, 1% de piruvato, 1% de aminoácidos não essenciais (NEAA), 1% de glutamina, 1% de penicilina e 1% de estreptomicina, sendo mantidas em incubadora a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Quando atingiram aproximadamente 80% de confluência, observadas em microscópio invertido, as células foram tripsinizadas com Tripsina 0,25% (Gibco/Invitrogen™, Estados Unidos) e semeadas em placas de cultura para realização dos ensaios experimentais.

Para os ensaios de acúmulo lipídico por Oil Red O, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (Kasvi®, Pinhais, Brasil) na densidade de $1,92 \times 10^4$ células por poço. Após atingirem confluência total, as células permaneceram em cultura por mais 7 dias para estabilização da monocamada, sendo posteriormente tratadas com ácido oleico na concentração de 40 μ M e com as antocianidinas cianidina e malvidina nas concentrações de 5, 10 e 100 μ M, durante 48 h.

Para os ensaios de expressão gênica, as células foram semeadas em placas de 6 poços (Kasvi®, Pinhais, Brasil) na densidade de $5,7 \times 10^5$ células por poço. Após atingirem aproximadamente 80% de confluência, as células foram submetidas ao estímulo inflamatório com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 100 ng/mL, seguido do tratamento com as antocianidinas cianidina e malvidina nas concentrações de 5, 10 e 100 μ M por 48 h.

Após os tratamentos, as células foram coletadas para análise de expressão gênica por RT-qPCR, conforme descrito a seguir. Os procedimentos experimentais foram realizados com base em protocolos previamente descritos na literatura, com adaptações (NATOLI et al., 2012; PONCE DE LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2019; PATEL et al., 2022).

3.5.1 Ensaios de permeação de colesterol em células Caco-2

O ensaio de permeação de colesterol foi realizado conforme descrito por Thilavech e Adisakwattana (2019) e Figueira (2021), com adaptações (FIGUEIRA, 2021; THILAVECH; ADISAKWATTANA, 2019).

As células Caco-2 foram tripsinizadas e semeadas em insertos Transwell® de placas de 24 poços, em densidade correspondente a aproximadamente 60% de confluência, utilizando 0,25 mL de meio de cultura no compartimento apical e 0,75 mL no compartimento basolateral. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e aproximadamente 90% de umidade relativa, até a formação de uma monocamada diferenciada, o que ocorreu após 7 dias após atingir confluência, com troca de meio a cada 2–3 dias.

Para o ensaio de permeação, o meio foi removido e as monocamadas foram expostas às diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M) (5, 10 e 100 μ M), diluídas em tampão Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) contendo micelas de colesterol na concentração final de 130 μ g/mL, previamente preparadas conforme descrito na literatura. A solução foi filtrada em filtro de seringa com poro de 0,22 μ m antes da utilização.

O preparado foi adicionado ao compartimento apical das monocamadas em volume final de 0,25 mL, enquanto no compartimento basolateral foi adicionado apenas HBSS em volume final de 0,75 mL. As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Após o período de incubação, os meios dos compartimentos apical e basolateral foram coletados e armazenados a -20 °C para posterior análise da permeação de colesterol.

As monocamadas celulares foram coletadas e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior extração de RNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR, conforme descrito anteriormente. Foram avaliados genes relacionados ao processo inflamatório (TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B, PCR e TLR-4), ao metabolismo lipídico (NPC1L1 e LPL) e à integridade da barreira intestinal (CLDN, OCLN e ZO-1).

3.5.2 Ensaio de coloração Oil Red com Caco-2

Para o ensaio de *Oil Red O*, as células foram transferidas para placas de 96 poços (Kasvi®, Pinhais-PR, Brasil) na densidade de $1,92 \times 10^4$, o tratamento foi realizado após 7 dias de confluência, a confluência se deu no dia 5 após o plaqueamento, e a partir de 100% de confluência iniciou-se a contagem de 7 dias, as células foram tratadas com Ácido Oleico na concentração de $40\mu\text{M}$ por poço, e as antocinidinas Malvidina e Cianidina nas concentrações de 5,10 e $100\mu\text{M}$ e mantidas por 48h (PATEL et al., 2022). A fim de verificar o acúmulo de triglicerídeos nos diferentes grupos de tratamento, foi desenvolvido o ensaio de coloração *Oil Red O* (MOON; CHUNG; LEE; KIM et al., 2007). Para tanto, paralelamente ao ensaio desenvolvido nas placas de 6 poços, uma placa de 96 poços foi utilizada para o cultivo celular, submetido às mesmas condições e tratamentos descritos acima e, após o período de maturação, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 min e incubadas por 1 h com solução de *Oil Red O* a 1%. Após múltiplas lavagens com água, o *Oil Red O* foi dissolvido em álcool isopropílico a 100% e a densidade óptica foi medida num espectrofotômetro de microplacas a 540 nm. Os dados foram apresentados como média \pm DP de três experimentos independentes (cada um em triplicata).

3.5.3 Ensaio de inflamação induzida por LPS em células Caco-2

O LPS foi utilizado como estímulo pró-inflamatório a fim de induzir inflamação celular e mimetizar um microambiente inflamatório associado à obesidade, permitindo a avaliação do potencial modulador/anti-inflamatório dos tratamentos testados, para isso as células foram transferidas para placas de 6 poços (Kasvi®, Pinhais-PR, Brasil) na densidade de $5,7 \times 10^5$ células/poço para avaliação de expressão gênica por RT-qPCR. O tratamento foi iniciado após as células atingirem aproximadamente 80% de confluência, o que ocorreu em torno de 4 dias após o plaqueamento. As células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) na concentração de 100 ng/mL por poço, e tratadas com as antocianidinas malvidina e cianidina, nas concentrações de 5, 10 e $100\mu\text{M}$, permanecendo em incubação por 48 h. O protocolo experimental foi adaptado com

base em metodologia previamente descrita na literatura (PRECIADO-ORTIZ et al., 2024) e ao final do protocolo induzido por LPS, foram avaliados marcadores relacionados à inflamação e resposta imune, incluindo citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 β), componentes centrais da via de reconhecimento inflamatório (TLR-4 e NF- κ B) e marcador geral de inflamação (CRP/PCR).

3.5.4 Análise da expressão gênica por qPCR

A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real (RT-qPCR). Após os tratamentos, o RNA total foi extraído das células utilizando protocolo padrão e convertido em cDNA por meio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, Estados Unidos). A amplificação foi realizada utilizando SYBR Green Master Mix (Cellco Biotec, São Carlos, Brasil) em equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram analisados, no ensaio com ácido oleico, os genes NPC1L1, LPL, ZO-1, CLDN-1 e OCLN, e no ensaio com LPS os genes TNF- α , IL-6, IL-1 β , NF- κ B, PCR e TLR-4. A expressão gênica foi normalizada pelo gene constitutivo GAPDH e calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As sequências dos primers utilizados encontram-se descritas nas tabelas correspondentes.

TABELA 3: Sequências de primers utilizados para qPCR no ensaio em Caco-2. Para obtenção dos dados apresentados, foram utilizados primers específicos para genes associados ao processo inflamatório, transporte lipídico e integridade da barreira intestinal, empregados nas análises de expressão gênica por RT-qPCR em células Caco-2. As sequências foram definidas com base em estudos prévios e bancos de dados genéticos, sendo utilizadas após extração de RNA total, síntese de cDNA e amplificação por PCR em tempo real, conforme descrito na metodologia.

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	GenBank number
ZO-1	GTCCAGAATCTCGGAAAAGTGCC	CTTTCAGCGCACCATAACCAACC	7082
CLDN-1	GTCTTTGACTCCTTGCTGAATCTG	CACCTCATCGTCTTCCAAGCAC	9076
OCLN	ATGGCAAAGTGAATGACAAGCGG	CTGTAACGAGGCTGCCTGAAGT	100506658
NPC1L1	TGCTGTTGTGCAGCCTCTCTGA	CCACAAAGGCTGACATCTGCAG	29881
LPL	CTGCTGGCATTGCAGGAAGTCT	CATCAGGAGAAAGACGACTCGG	4023
TLR-4	CCCTGAGGCATTTAGGCAGCTA	AGGTAGAGAGGTGGCTTAGGCT	7099
NFK β	GCAGCACTACTTCTTGACCACC	TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC	4790
PCR	TCGTGGAGTTCTGGGTAGATGG	TTCCCACCGAAGGAATCCTGCT	1401
IL-6	AAAGAGGCACTGGGCAGAAA	TTTACCAGGCAAGTCTCTCT	3569
IL1- β	TGGCAATTGATCTGGTTCATC	GTTTAGGAATCTTTCCCACTT	3553
TNF- α	GACGCAATTAAGGTTTTGAGGGCC	GGGGACACACAAAGCATCAAG	7124

3.6 Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 10. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student, e para múltiplas comparações foi utilizada análise de variância (ANOVA) unidirecional ou bidirecional, seguida do pós-teste de Tukey ou Bonferroni, conforme apropriado. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito das diferentes concentrações de antocianidinas sobre a citotoxicidade de pré-adipócitos 3T3-L1

Os dados obtidos do teste de MTT indicaram que as antocianidinas não se mostraram citotóxicas neste modelo, conforme pode ser observado na Figura 7. Com base nos achados do presente ensaio, seguiu-se então com a intervenção de C e M nas diferentes concentrações propostas [5, 10 e 100 μ M] no modelo *in vitro* de obesidade em 3T3-L1

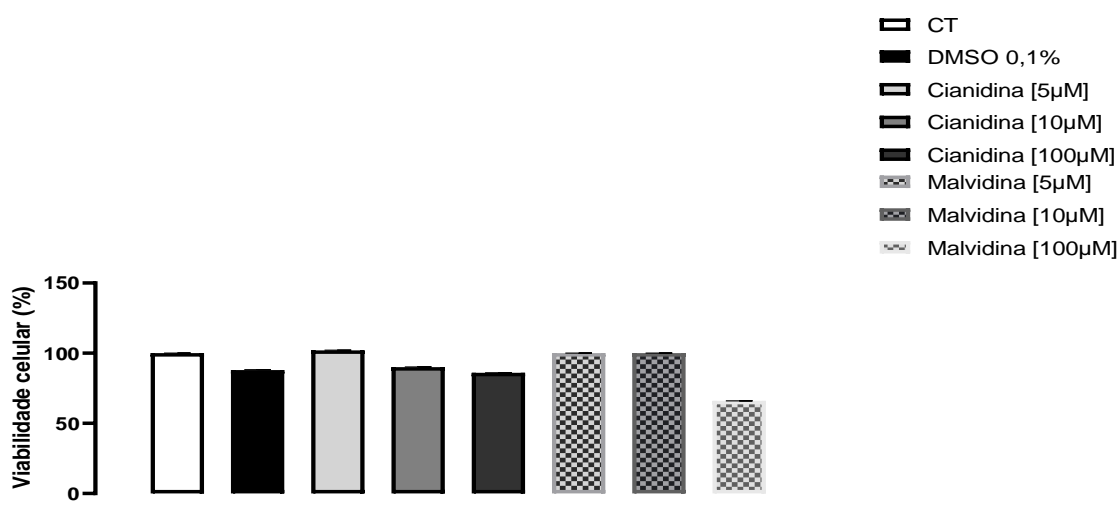


FIGURA 7: MTT de diferentes concentrações de antocianidinas C e M em células 3T3-L1. Para obtenção desses resultados, as células 3T3-L1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino e antibióticos, mantidas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M) por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio por enzimas mitocondriais, com leitura espectrofotométrica da absorbância. Os resultados foram expressos em relação ao grupo controle e representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.2 Antocianidinas em baixas concentrações reduziram o acúmulo de TG em modelo celular de adipócitos 3T3-L1

O tratamento com antocianidinas C e M em baixas concentrações [5 e 10 μ M] foi capaz de reduzir significativamente o acúmulo de triacilgliceróis no modelo celular de adipócitos 3T3-

L1, conforme apresentado na Figura 8. Observou-se que em altas concentrações de C, e, especialmente de M tiveram um efeito inverso, viabilizando o acúmulo de lipídios nestas células.

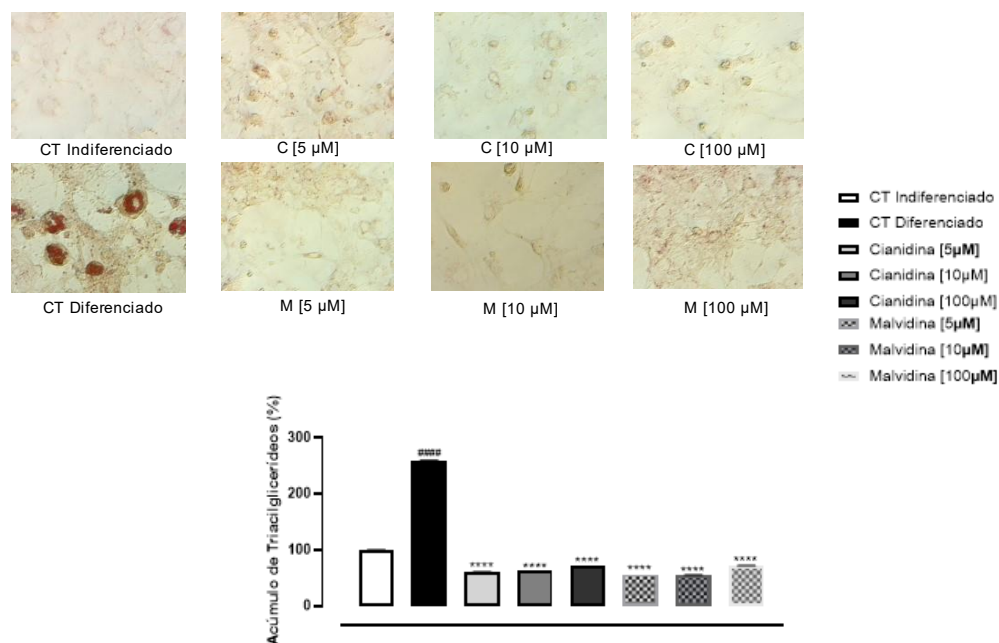


FIGURA 8: *Oil Red O* e acúmulo de triacilgliceróis em células 3T3-L1 após o tratamento com diferentes concentrações de antocianidinas C e M. (****, ##### e *** $p < 0.0001$ para * CT Indiferenciado vs Diferenciado e #CT Diferenciado vs C e * CT Diferenciado vs M). Para obtenção desses resultados, as células 3T3-L1 foram induzidas à diferenciação adipogênica utilizando meio contendo dexametasona, IBMX e insulina, sendo tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M) durante o período de maturação celular. O acúmulo lipídico intracelular foi avaliado por coloração com *Oil Red O*, seguido de extração do corante e quantificação por leitura espectrofotométrica. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.3 Efeito do ácido oleico e das antocianidinas sobre a expressão de genes inflamatórios em células Caco-2

A expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 β foi avaliada em células Caco-2 após estímulo com ácido oleico e tratamento com (C) e (M). O ácido oleico promoveu alterações

na expressão dessas citocinas em relação ao grupo controle, enquanto o tratamento com as antocianidinas modulou seus níveis de expressão quando comparado ao grupo estimulado com ácido oleico. De forma complementar, a expressão dos genes associados a vias inflamatórias TLR-4 e NF- κ B também foi alterada após o estímulo com ácido oleico, sendo observada modulação desses genes após o tratamento com (C) e (M) (Figura 9).

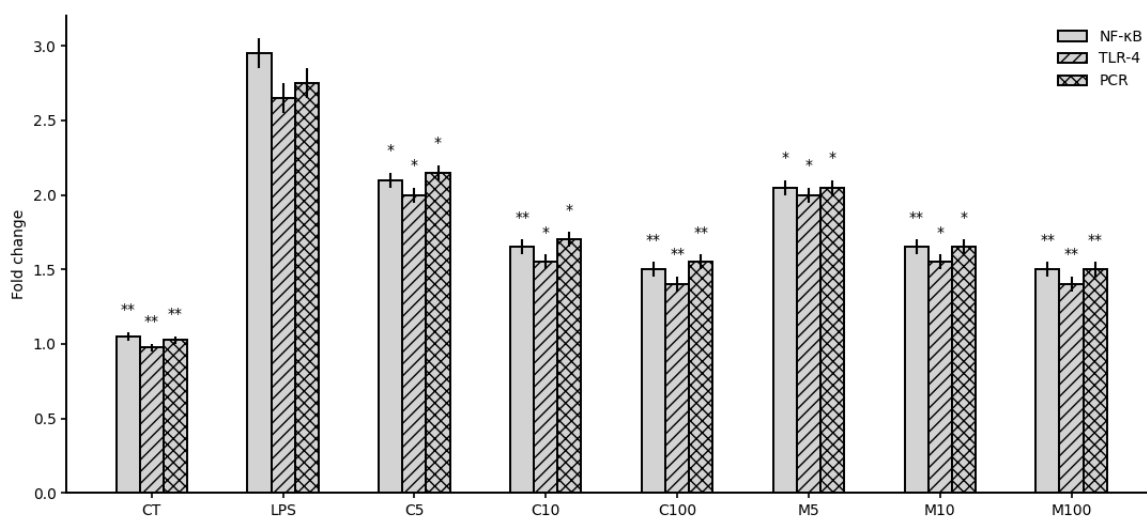


FIGURA 9: Expressão de NF- κ B, TLR-4 e PCR em células epiteliais intestinais Caco-2 estimuladas com LPS e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas (C) e (M). Os dados são apresentados como média \pm EPM. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA one-way seguida de pós-teste de Dunnett, considerando o grupo LPS como referência ($p < 0,05$; $*p < 0,01$; $**p < 0,001$). Para obtenção desses resultados, as células Caco-2 foram cultivadas em meio MEM suplementado até atingirem confluência, sendo posteriormente estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) para indução de resposta inflamatória e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M). Após o período experimental, o RNA total foi extraído, convertido em cDNA e a expressão gênica de NF- κ B, TLR-4 e PCR foi determinada por RT-qPCR utilizando primers específicos. Os valores foram normalizados por gene de referência e expressos como Ct médio. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.4 Efeito do estímulo com ácido oleico sobre a expressão gênica de marcadores metabólicos e de integridade da barreira intestinal em células Caco-2

A exposição das células epiteliais intestinais Caco-2 ao ácido oleico promoveu alterações na expressão gênica de marcadores relacionados ao metabolismo lipídico e à integridade da barreira intestinal. Foram avaliados os níveis de expressão de LPL, NPC1L1, ZO-1 e CLDN-1, normalizados por gene de referência, após estímulo com ácido oleico e tratamento com as antocianidinas (C) e (M) em diferentes concentrações.

Observou-se que o estímulo lipídico foi capaz de modular a expressão desses marcadores em relação ao grupo controle, sendo detectadas alterações adicionais nos grupos tratados com antocianidinas, tanto para genes associados ao transporte/metabolismo lipídico quanto para proteínas estruturais das tight junctions (Figuras 10 e 11).

4.5 Modulação de genes associados à integridade da barreira intestinal em células Caco-2 estimuladas com ácido oleico

A expressão dos genes ZO-1 e CLDN-1 foi avaliada em células Caco-2 após estímulo com ácido oleico. O tratamento com ácido oleico promoveu alterações na expressão desses marcadores em comparação ao grupo controle. O tratamento com (C) e (M) modulou a expressão de ZO-1 e CLDN-1 em relação ao grupo estimulado com ácido oleico (Figura 10).

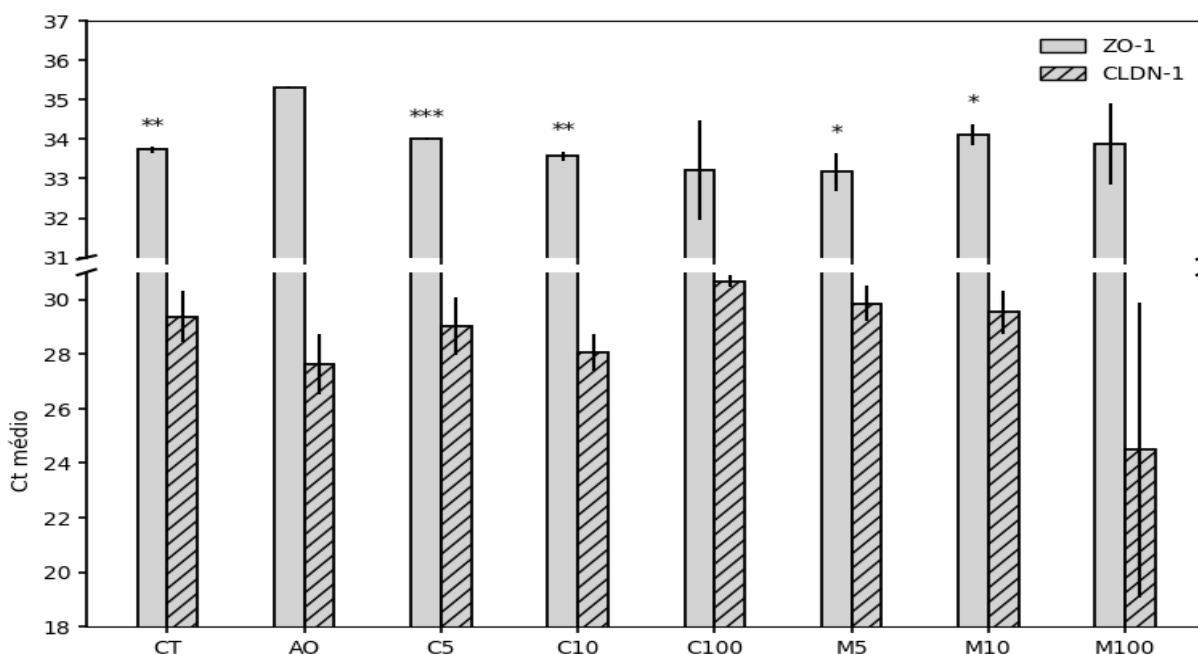


FIGURA 10: Expressão dos marcadores de integridade da barreira epitelial ZO-1 e CLDN-1 em células epiteliais intestinais Caco-2 submetidas ao estímulo lipotóxico com ácido oleico (AO) e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas (C) e (M). As barras representam ZO-1 (barra lisa) e CLDN-1 (barra hachurada). Os dados são apresentados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA one-way seguida de pós-teste de Dunnett, considerando o grupo AO como referência ($p < 0,05$; $*p < 0,01$; $***p < 0,001$). O eixo Y foi fragmentado para melhor visualização das diferenças entre os grupos. Para obtenção desses resultados, as células Caco-2 foram cultivadas até confluência e submetidas ao estímulo com ácido oleico (AO), seguido do tratamento com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M). Após o tratamento, o RNA total foi extraído, convertido em cDNA e a expressão gênica de ZO-1 e CLDN-1 foi determinada por RT-qPCR utilizando primers específicos. Os valores foram normalizados por gene de referência e expressos como Ct médio. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.6 Modulação da expressão de genes associados ao transporte lipídico em células Caco-2 após estímulo com ácido oleico

A expressão dos genes LPL e NPC1L1 foi avaliada em células Caco-2 após estímulo com ácido oleico. O ácido oleico alterou a expressão desses genes quando comparado ao grupo controle, enquanto o tratamento com (C) e (M) modulou seus níveis de expressão em relação ao grupo estimulado com ácido oleico (Figura 11).

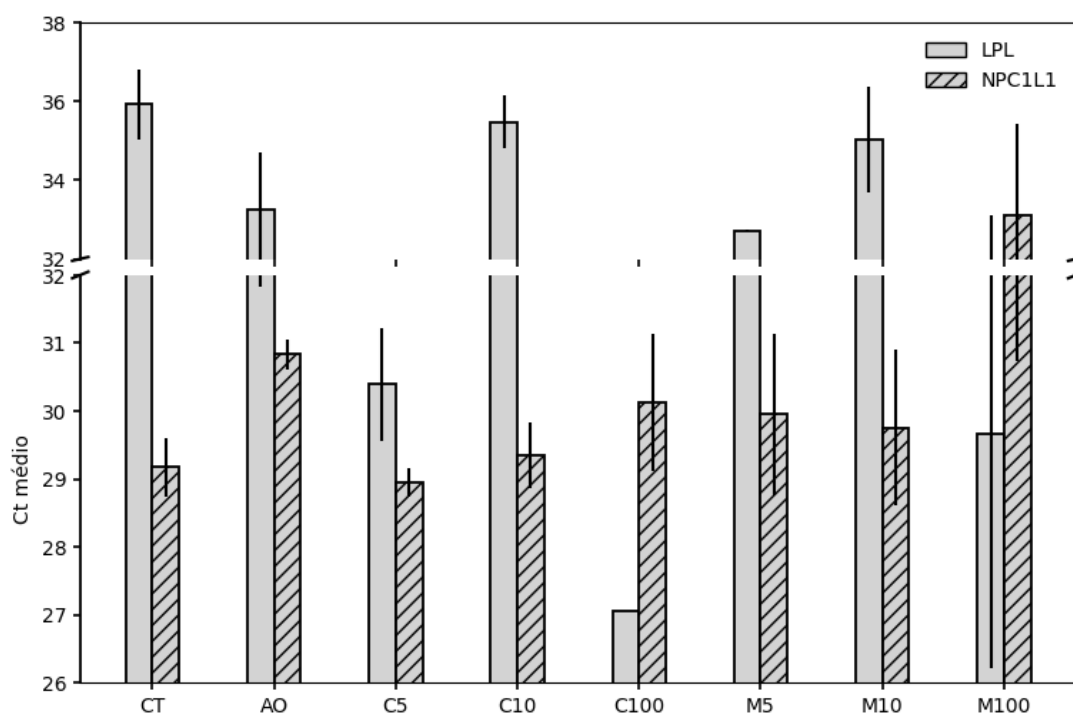


FIGURA 11: Expressão dos genes associados ao metabolismo e ao transporte lipídico LPL e NPC1L1 em células epiteliais intestinais Caco-2 submetidas ao estímulo com ácido oleico (AO) e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas (C) e (M). Os dados são apresentados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA one-way seguida de pós-teste de Dunnett, considerando o grupo AO como referência. Para obtenção desses resultados, as células Caco-2 foram cultivadas em meio MEM suplementado até atingirem confluência e submetidas ao estímulo com ácido oleico (AO), seguido do tratamento com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M). Após o período experimental, o RNA total foi extraído, convertido em cDNA e a expressão gênica de LPL e NPC1L1 foi determinada por RT-qPCR utilizando primers específicos. Os valores foram normalizados por gene de referência e expressos como Ct médio. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.7 Antocianidinas atuam sobre efeito a resistência à insulina em adipócitos 3T3-L1

A indução de resistência à insulina por palmitato resultou em aumento significativo da glicose residual no meio de cultura, confirmando disfunção da sinalização insulínica nos adipócitos. O tratamento com (C) e (M) reduziram esses níveis, indicando melhora da sensibilidade à insulina Figura 12. Esses achados sustentam a hipótese que as antocianidinas exercem papel relevante na reversão da resistência à insulina induzida por lipotoxicidade, um dos principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2.

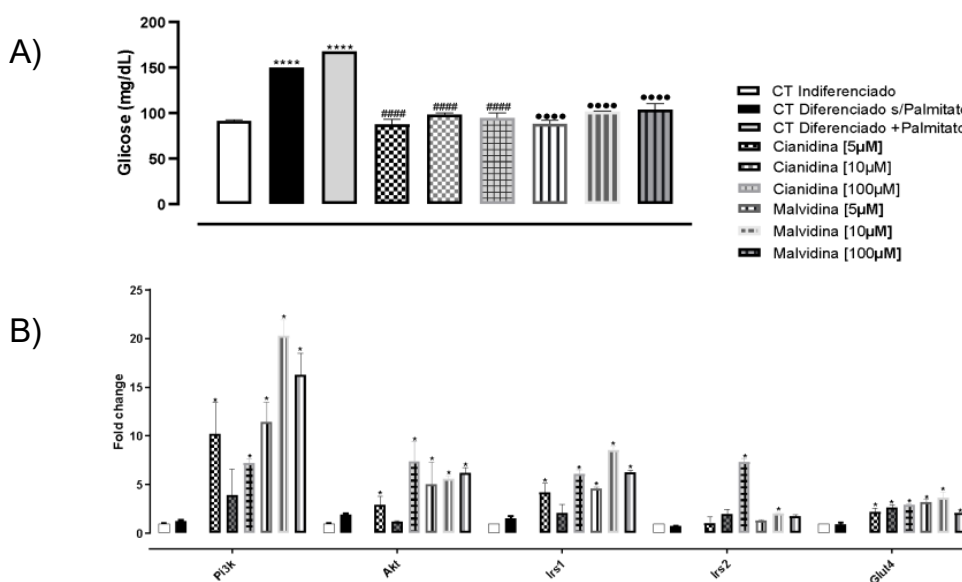


FIGURA 12: Efeito das antocianidinas (C) e (M) sobre a resistência à insulina em adipócitos 3T3-L1.

Tratamento com (C) e (M) em modelo de resistência à insulina induzida por palmitato. A) Glicose; B) Expressão gênica. Onde (****, ##### e ***** $p < 0,0001$; ***, ### e *** $p < 0,001$; # e * $p < 0,05$ para *CT Indiferenciado vs. CT Diferenciado s/Palmitato e CT Diferenciado +Palmitato; # CT Diferenciado +Palmitato vs. Cianidina e * CT Diferenciado +Palmitato vs. Malvidina). Para obtenção desses resultados, as células 3T3-L1 foram diferenciadas em adipócitos utilizando meio adipogênico contendo dexametasona, IBMX e insulina, sendo posteriormente submetidas à indução de resistência à insulina por tratamento com palmitato. Após a indução, as células foram tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M). O parâmetro avaliado foi determinado conforme descrito no protocolo experimental, sendo os resultados expressos em relação ao grupo controle. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.8 Antocianidinas modulam marcadores inflamatórios em adipócitos 3T3-L1

A análise da expressão gênica demonstrou que o tratamento com (C) e (M) reduziram significativamente a expressão de marcadores inflamatórios em adipócitos 3T3-L1, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B e TLR-4. Esses resultados indicam que as antocianidinas atuam como moduladoras imunometabólicas no tecido adiposo, reduzindo a inflamação crônica de baixo grau que caracteriza a obesidade e contribui para a resistência à insulina e disfunções metabólicas (Figura 13).

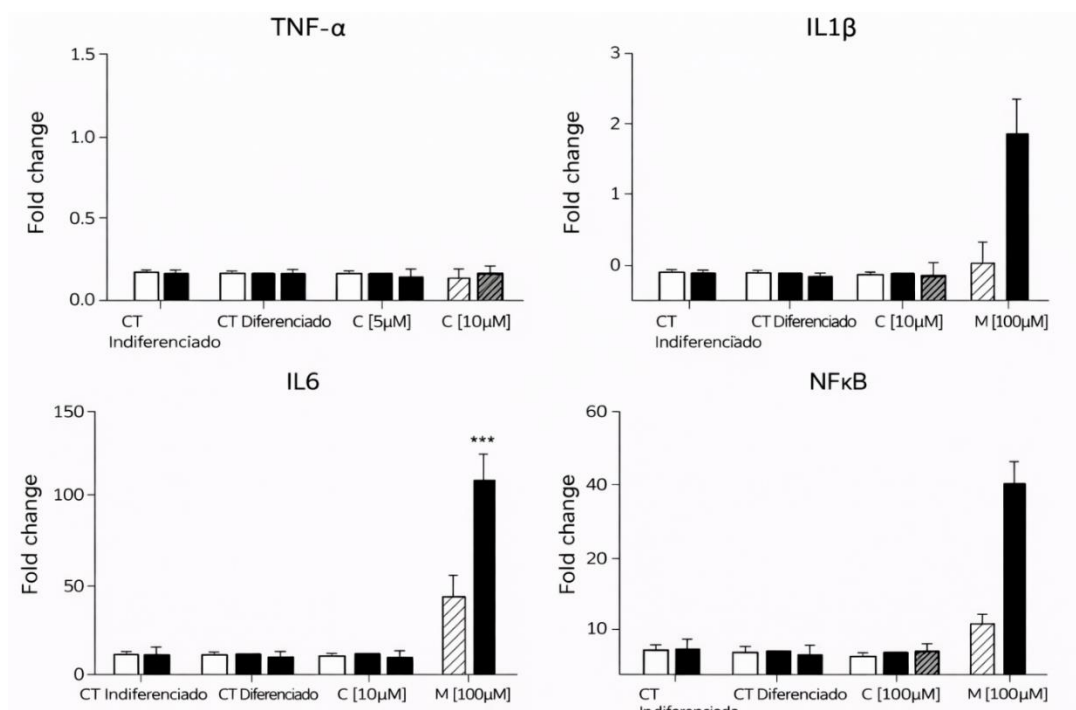


FIGURA 13: Expressão gênica associada à resposta inflamatória (TNF- α , IL1 β , IL6, NF κ B e Tlr4) em células 3T3-L1 submetidas aos diferentes tratamentos com antocianidinas. (*, #### e **** p<0,0001; ***, ### e *** p<0,001; # e * p<0,05 para *CT Indiferenciado vs. CT Diferenciado # CT Diferenciado vs. Cianidina e * CT Diferenciado vs. Malvidina). Para obtenção desses resultados, as células 3T3-L1 foram cultivadas e diferenciadas em adipócitos, sendo posteriormente tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M). Após o período experimental, o RNA total foi extraído, convertido em cDNA e a expressão gênica dos marcadores inflamatórios foi determinada por RT-qPCR utilizando primers específicos. Os valores foram normalizados por gene de referência e expressos como Ct médio. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando p < 0,05.**

4.9 Efeito das antocianidinas sobre a viabilidade celular em Caco-2

A viabilidade celular avaliada por meio do ensaio de MTT demonstrou que o tratamento com (C) e (M), nas concentrações de 5, 10 e 100 μM , não comprometeu a atividade metabólica mitocondrial tanto em células epiteliais intestinais Caco-2 quanto em pré-adipócitos 3T3-L1 (Figura 14). Esses resultados confirmam que as concentrações utilizadas são biologicamente seguras e adequadas para a investigação de efeitos metabólicos e inflamatórios, permitindo a interpretação dos dados subsequentes sem interferência de citotoxicidade. A manutenção da viabilidade celular reforça a validade dos modelos experimentais empregados e está em consonância com estudos que descrevem perfil de segurança elevado das antocianidinas em modelos celulares associados à obesidade e inflamação metabólica.

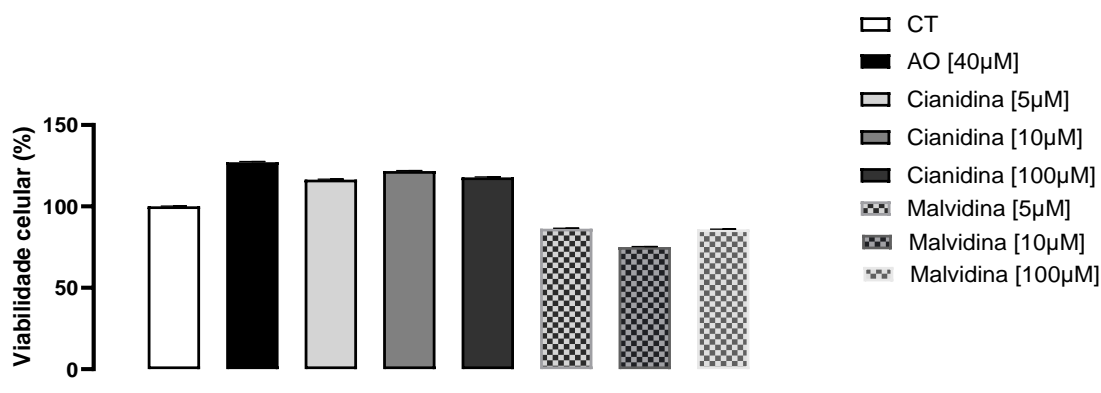


FIGURA 14: MTT de diferentes concentrações de antocianidinas C e M em células Caco 2. Para obtenção desses resultados, as células Caco-2 foram cultivadas em meio MEM suplementado e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M) por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, baseado na redução do brometo de tetrazólio por enzimas mitocondriais, com leitura espectrofotométrica da absorbância. Os resultados foram expressos em relação ao grupo controle e representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.10 Modulação do acúmulo lipídico em células epiteliais intestinais Caco-2.

A coloração *Oil Red O* mostrou que houve aumento significativo do acúmulo de triglicerídeos nas células Caco-2. O tratamento com (C) e (M) reduziram de forma significativa e consistente esse conteúdo lipídico intracelular, sugerindo que essas antocianidinas modulam a homeostase lipídica intestinal e podem ter efeito protetor contra a sobrecarga de lipídios relacionada à obesidade (Figura 15).

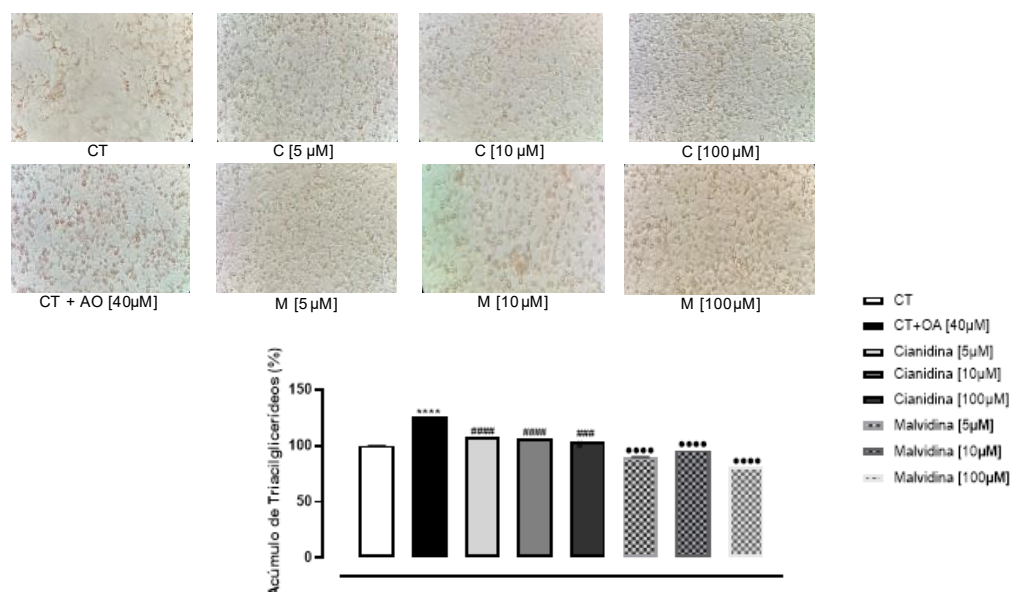


FIGURA 15: *Oil Red O* e acúmulo de triacilgliceróis em células Caco 2 após o tratamento com diferentes concentrações de antocianidinas C e M. Onde **** $p < 0,0001$ CT vs. CT + AO [40 μ M]; #### $p < 0,0001$ CT + AO [40 μ M] vs. Cianidina; $p < 0,0001$ CT + AO [40 μ M] vs. Malvidina. Para obtenção desses resultados, as células Caco-2 foram cultivadas até confluência e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M). O acúmulo lipídico intracelular foi avaliado por coloração com *Oil Red O*, seguido de extração do corante e quantificação por leitura espectrofotométrica. Os dados foram expressos em relação ao grupo controle e representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.11 Efeitos das antocianidinas sobre o metabolismo da glicose em células Caco-2.

Os ensaios de metabolismo da glicose demonstraram que a diferenciação metabólica das células Caco-2 está associada a aumento da glicose residual no meio de cultura, indicando comprometimento da captação e/ou utilização da glicose pelo epitélio intestinal. O tratamento com (C) e (M) resultou em redução significativa desses níveis, sugerindo melhora da homeostase glicídica intestinal (Figura 16). Essas evidências corroboram o papel do intestino como órgão regulador da glicemia sistêmica e indicam que as antocianidinas podem contribuir para a redução da carga glicêmica pós-prandial e da resistência à insulina associada à obesidade.

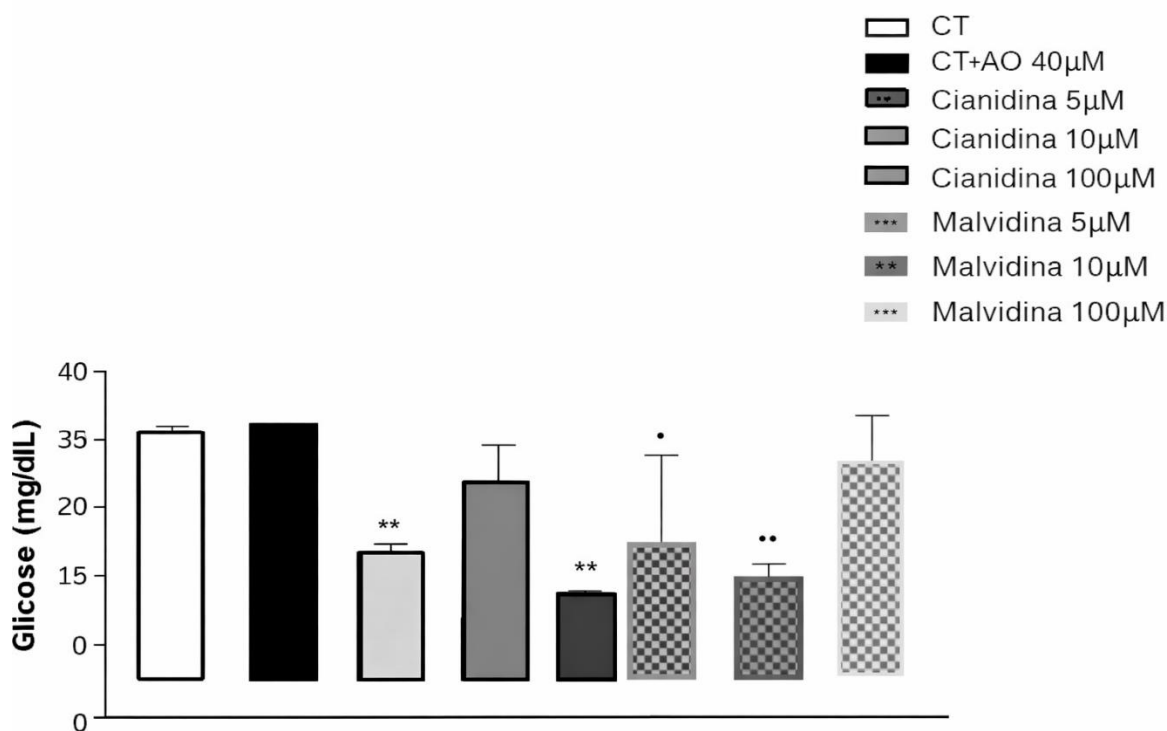


FIGURA 16: Efeito das antocianidinas (C) e (M) sobre o metabolismo da glicose em células Caco-2.

(***, #### e **** $p < 0,0001$; **, ### e *** $p < 0,001$; # e * $p < 0,05$ para *CT vs. CT+AO; # CT+AO vs. C e * CT+AO vs. M). Para obtenção desses resultados, as células Caco-2 foram cultivadas em meio MEM suplementado até atingirem confluência e tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e malvidina (M). Após o período experimental, o metabolismo da glicose foi avaliado por ensaio bioquímico conforme descrito na metodologia, sendo os resultados expressos em relação ao grupo controle. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

4.12 Efeitos das antocianidinas sobre o metabolismo da glicose em células Caco-2 e expressão gênica de IL-6 e IL-1 β .

A exposição das células Caco-2 ao LPS resultou em ativação significativa de vias inflamatórias, evidenciada pelo aumento da expressão de marcadores pró-inflamatórios. O tratamento com (C) e (M) atenuou de forma consistente essa resposta, sugerindo efeito anti-inflamatório das antocianidinas no ambiente intestinal. Esses resultados são particularmente relevantes diante do papel central da endotoxemia metabólica e da ativação do eixo TLR-4/NF- κ B na fisiopatologia da obesidade e da inflamação sistêmica (Figura 17).

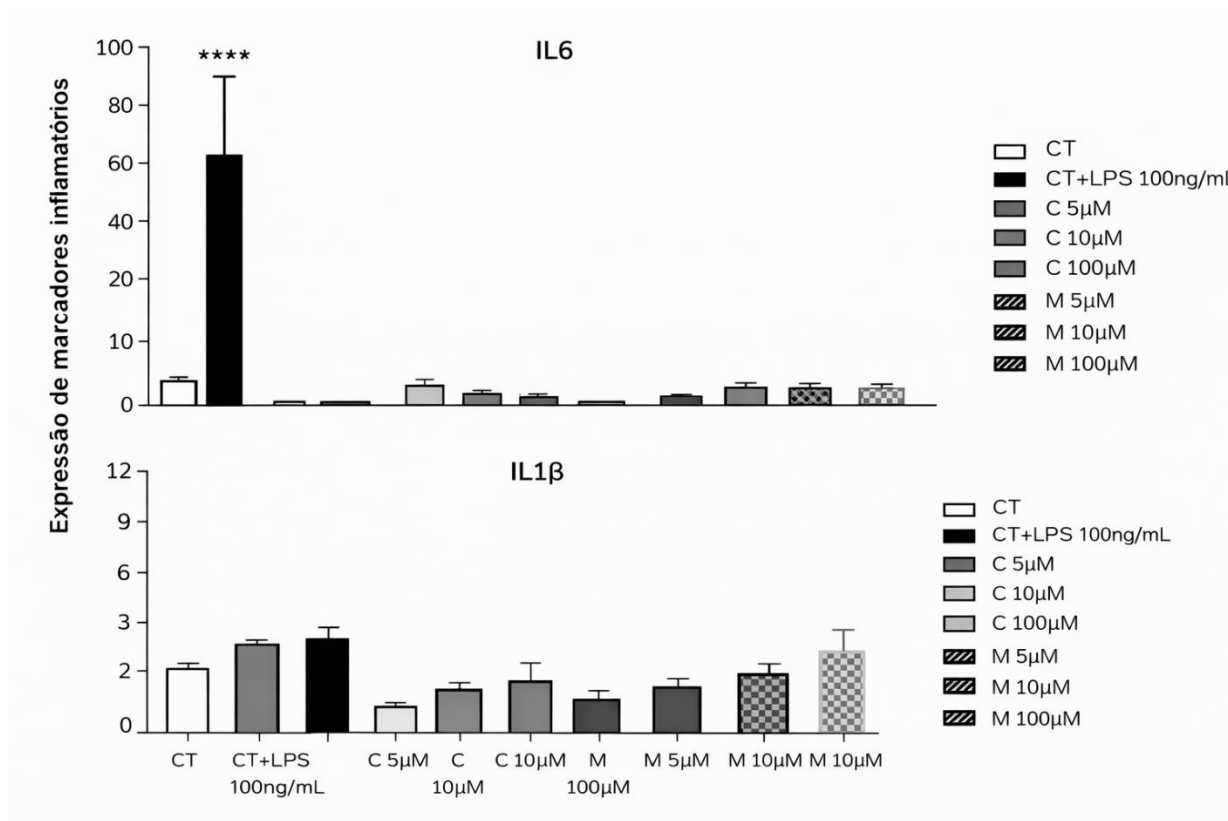


FIGURA 17: Expressão gênica de marcadores inflamatórios em células Caco-2 estimuladas por LPS frente ao tratamento com diferentes doses de antocianidinas. Diferenças estatísticas foram consideradas para $***p < 0,001$; $**p < 0,01$ e $*p < 0,05$ em comparação ao grupo CT; e para $\#p < 0,05$ em comparação ao grupo CT+LPS. Para obtenção desses resultados, as células Caco-2 foram cultivadas até atingirem confluência e posteriormente estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS, 100 ng/mL) para indução de resposta inflamatória, sendo tratadas com diferentes concentrações das antocianidinas cianidina (C) e

malvidina (M) (5, 10 e 100 μ M). Após o período experimental, o RNA total foi extraído, convertido em cDNA e a expressão gênica de IL-6 e IL-1 β foi determinada por RT-qPCR utilizando primers específicos. Os valores foram normalizados pelo gene de referência e expressos como Ct médio. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimentos independentes, sendo analisados por ANOVA, considerando significância quando $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram, de forma consistente, que as antocianidinas (C) e (M) exercem efeitos imunometabólicos relevantes em modelos *in vitro* associados à fisiopatologia da obesidade, atuando simultaneamente sobre processos interligados que envolvem metabolismo lipídico, resistência à insulina, inflamação e homeostase intestinal. Considerando que a obesidade constitui uma condição de disfunção sistêmica caracterizada por expansão do tecido adiposo, alteração do perfil lipídico e inflamação crônica de baixo grau, torna-se evidente que intervenções capazes de modular vias centrais como TLR4/NF- κ B, sinalização insulínica e mecanismos regulatórios do metabolismo energético apresentam grande relevância translacional para a prevenção e mitigação de complicações cardiometabólicas (LEE *et al.*, 2017; AHMED *et al.*, 2021; YILDIZ, 2020).

No presente estudo, os resultados obtidos nos modelos celulares de adipócitos 3T3-L1 e células epiteliais intestinais Caco-2 demonstram que as antocianidinas (C) e (M) modulam de forma integrada vias inflamatórias, metabólicas e estruturais relevantes à fisiopatologia da obesidade. Nos ensaios com células Caco-2, diferentes estímulos foram empregados de acordo com o desfecho avaliado, sendo o LPS utilizado como indutor inflamatório e o ácido oleico como estímulo lipotóxico. Em células Caco-2 estimuladas com ácido oleico, observou-se modulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e IL-1 β , bem como de componentes centrais da via TLR4/NF- κ B, confirmando que o estímulo lipotóxico induziu resposta inflamatória no epitélio intestinal e que as antocianidinas atenuaram parcialmente esse perfil inflamatório (Figura 13 e Figura 17). Essas alterações foram avaliadas em nível de expressão gênica, não incluindo mensurações funcionais diretas da permeabilidade intestinal.

Além da resposta inflamatória, os resultados demonstraram modulação da expressão de genes associados à integridade da barreira intestinal. A análise de ZO-1 e CLDN-1 revelou que o estímulo com ácido oleico promoveu alterações nesses marcadores estruturais, enquanto o tratamento com (C) e (M) modulou sua expressão, sugerindo possível efeito protetor sobre a homeostase epitelial intestinal (Figura 10). Esses achados são consistentes com evidências que relacionam estímulos lipídicos à disfunção de tight junctions e sustentam o papel do epitélio intestinal como alvo de intervenções imunometabólicas.

No que se refere ao metabolismo lipídico intestinal, como LPL e NPC1L1, foi modulada no modelo Caco-2 após estímulo com ácido oleico, sendo observadas alterações adicionais na presença das antocianidinas (Figura 11). Essas alterações foram avaliadas em nível de expressão gênica, não incluindo mensurações funcionais diretas. Embora esses resultados se baseiem em expressão gênica e não em ensaios funcionais diretos de absorção lipídica, eles indicam que (C) e (M) interferem em vias moleculares envolvidas na regulação do metabolismo lipídico intestinal em contexto de disfunção metabólica induzida por lipídios.

De forma integrada, os achados obtidos no modelo intestinal complementam os resultados observados em adipócitos 3T3-L1, reforçando a hipótese de que as antocianidinas exercem efeitos imunometabólicos integrados ao longo do eixo intestino–tecido adiposo. A modulação de vias inflamatórias associadas ao TLR4/NF- κ B, aliada às alterações em marcadores de barreira intestinal e metabolismo lipídico, fornece suporte experimental para o papel dessas moléculas na atenuação de mecanismos centrais envolvidos na inflamação crônica de baixo grau e na disfunção metabólica associadas à obesidade.

No modelo de adipócitos 3T3-L1, verificou-se inicialmente ausência de citotoxicidade no intervalo de 5 a 100 μ M para ambas as antocianidinas, o que confere robustez biológica à interpretação dos efeitos funcionais detectados (BENDOKAS *et al.*, 2020). Esse ponto é fundamental, uma vez que alterações metabólicas ou inflamatórias observadas em culturas celulares podem ser confundidas com efeito secundário de dano celular; no presente estudo, as concentrações testadas preservaram a viabilidade, permitindo atribuir os resultados predominantemente ao efeito farmacodinâmico/metabólico das moléculas avaliadas. Sob essa perspectiva, destaca-se que o tratamento com (C) e (M) promoveu redução do acúmulo de triglicerídeos (TG) em adipócitos, sobretudo em baixas concentrações (5–10 μ M), evidenciando potencial antiadipogênico e/ou regulador da lipogênese (CHEN *et al.*, 2022; RANDENI *et al.*, 2025). Clinicamente, essa observação é relevante porque a obesidade é frequentemente acompanhada por aumento de lipogênese e disfunções na dinâmica de armazenamento/fluxo lipídico, favorecendo lipotoxicidade e agravamento de resistência insulínica em múltiplos tecidos (LEE *et al.*, 2017; AHMED *et al.*, 2021).

Em consonância com essa interpretação, evidências experimentais demonstram que (C) e (M) podem reduzir o acúmulo lipídico em 3T3-L1 por mecanismos associados à modulação do

metabolismo energético e lipídico, incluindo aumento de marcadores de β -oxidação e supressão de vias lipogênicas como SREBP-1c e FAS, reforçando a plausibilidade do racional proposto para o efeito anti-lipidogênico observado no presente estudo (PARK *et al.*, 2015;). Somado a isso, é amplamente reconhecido que a modulação de AMPK constitui um mecanismo central na reprogramação metabólica, especialmente pela inibição de programas lipogênicos e favorecimento de vias catabólicas, apoiando a hipótese de que antocianidinas possam exercer seus efeitos via eixos como AMPK/SREBP-1c (HARDIE, 2016; YILDIZ, 2020; CHEN *et al.*, 2022; RANDENI *et al.*, 2025).

De forma funcionalmente integrada, os achados também demonstraram melhora funcional da homeostase glicêmica em contexto de resistência à insulina. No modelo experimental induzido por palmitato, tanto cianidina quanto malvidina foram capazes de reduzir a glicose residual no meio, sugerindo melhora na utilização/captação de glicose pelas células mesmo na presença de estímulo lipotóxico. Esse resultado é coerente com a noção de que adipócitos sob lipotoxicidade e inflamação passam a apresentar prejuízo de vias dependentes de insulina e disfunção metabólica progressiva, contribuindo para agravamento sistêmico de resistência à insulina na obesidade (AHMED *et al.*, 2021). Em modelos celulares e em contexto fisiopatológico, ácidos graxos saturados podem induzir resistência à insulina por ativação de respostas inflamatórias, com destaque para sinalização envolvendo TLR4/NF- κ B e aumento de citocinas pró-inflamatórias, levando à disfunção de cascatas de sinalização como IRS-1/PI3K/Akt (SHI *et al.*, 2006;).

Um ponto essencial evidenciado pelo presente estudo foi a modulação de vias pró-inflamatórias clássicas associadas à obesidade. O tecido adiposo obeso caracteriza-se por ativação de sensores inflamatórios e recrutamento imune, com aumento da expressão de citocinas como TNF- α , IL-6 e outros mediadores que interferem diretamente na sinalização insulínica e no metabolismo lipídico. Sob essa perspectiva, foi evidenciado que (C) e (M) reduziram marcadores inflamatórios, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6, bem como reduziram a expressão de componentes do eixo TLR4/NF- κ B, sugerindo mecanismo de ação associado à atenuação de sinalização pró-inflamatória induzida por estímulos lipídicos e/ou endotoxêmicos. A integração desses resultados é particularmente importante, pois existe forte evidência de que o eixo TLR4 \rightarrow NF- κ B \rightarrow citocinas contribui para a disfunção adipocitária, sustentando resistência à insulina e alterações metabólicas relacionadas ao acúmulo lipídico na obesidade (SHI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2017).

Cabe destacar que, ainda que existam discussões sobre se ácidos graxos saturados atuam como agonistas diretos de TLR4, há suporte robusto para o papel desse receptor como nodo central de inflamação metabólica, atuando inclusive por mecanismos de reprogramação metabólica de macrófagos e amplificação da resposta inflamatória em cenário de obesidade (LANCASTER *et al.*, 2018). Dessa forma, a redução de TLR4/NF- κ B observada no presente estudo com tratamento sugere modulação de vias inflamatórias centrais, coerente com redução do fenótipo de inflamação metabólica.

A discussão desses achados permite propor que parte do efeito metabólico favorável observado (redução de TG e melhora funcional de utilização de glicose) esteja associado à capacidade das antocianidinas de reduzir inflamação local e, conseqüentemente, limitar mecanismos inflamatórios que sustentam resistência à insulina. Em nível molecular, é plausível que a redução de TNF- α e IL-6 contribua para diminuição de eventos que favorecem fosforilação inibitória de IRS-1 e redução de sinalização via Akt, preservando a cascata insulínica responsável por translocação de transportadores de glicose e manutenção de metabolismo energético adequado (SHI *et al.*, 2006; MOLONIA *et al.*, 2020). Em modelo altamente comparável ao utilizado no presente estudo, Molonia et al. demonstraram que a antocianina cianidina-3-O-glicosídeo (C3G) foi capaz de reduzir inflamação e restaurar sinalização IRS-1/PI3K/Akt em adipócitos expostos ao palmitato, reforçando a plausibilidade mecânica da melhora funcional observada (MOLONIA *et al.*, 2020).

Ainda que o presente estudo tenha utilizado glicose residual como marcador funcional, recomenda-se, como continuidade, complementar o modelo com avaliação de p-Akt/Akt e fosforilação de IRS-1 (serina/tirosina), o que fortaleceria substancialmente a robustez mecânica e permitiria confirmar de forma direta que a melhora funcional observada decorre da restauração da sinalização insulínica intracelular. De modo adicional, a mensuração de GLUT4 (Slc2a4) e seu tráfego subcelular pode contribuir para corroborar o efeito insulinosensibilizante, uma vez que maior expressão e/ou maior translocação à membrana plasmática constituem eventos esperados em condições de melhora de sensibilidade à insulina (MOLONIA *et al.*, 2020; DEEPA *et al.*, 2023).

Um aspecto adicional evidenciado pelos resultados refere-se ao efeito dose-dependente observado, no qual concentrações baixas (5–10 μ M) apresentaram perfil metabólico protetor, enquanto concentrações mais elevadas (especialmente 100 μ M) demonstraram efeito reduzido,

nulo ou mesmo inverso em determinados parâmetros lipídicos. Esse comportamento é compatível com o conceito de hormese, fenômeno no qual compostos bioativos exercem efeitos benéficos em baixas concentrações, mas podem desencadear respostas distintas em concentrações elevadas (BENDOKAS *et al.*, 2020). Para polifenóis e antocianinas, esse padrão pode ocorrer por múltiplos mecanismos: (i) mudança do perfil redox, com possível comportamento pró-oxidante em altas doses; (ii) saturação ou modulação divergente de vias de sinalização metabólica; (iii) interferência com metabolismo intracelular e sistemas enzimáticos; e (iv) instabilidade química e degradação gerando metabólitos com ação distinta (LEE *et al.*, 2017; DEEPA *et al.*, 2023). De forma adicional, é importante considerar que respostas biológicas não lineares são compatíveis com um perfil hormético frequentemente descrito para polifenóis e flavonoides, no qual concentrações mais baixas podem desencadear efeitos regulatórios favoráveis, enquanto doses elevadas podem perder eficácia ou induzir respostas opostas. Além disso, concentrações mais altas podem estar associadas a maior instabilidade química em meio aquoso e/ou alterações do potencial redox do sistema, de modo que os resultados em 100 μM devem ser interpretados com cautela. Assim, os achados reforçam a relevância de concentrações fisiologicamente plausíveis (5–10 μM) como faixa de maior consistência biológica no presente modelo experimental. Portanto, sugere-se, como continuidade, incorporar avaliação de marcadores de estresse oxidativo e resposta antioxidante (ex.: ROS intracelular, atividade de SOD/GPx, expressão de Nrf2/HO-1), permitindo esclarecer se a reversão do efeito em dose alta envolve alteração no equilíbrio redox celular (DEEPA *et al.*, 2023).

Além dos efeitos observados no tecido adiposo, outro resultado relevante do presente estudo foi observado no modelo intestinal Caco-2, que representa um sistema valioso para investigar mecanismos epiteliais envolvidos em homeostase e inflamação intestinal. A obesidade e suas complicações frequentemente se associam à deterioração da barreira intestinal, aumento da permeabilidade e consequente endotoxemia metabólica, caracterizada pela passagem de lipopolissacarídeos (LPS) e ativação sistêmica de vias inflamatórias (Valdez & Bolling, 2019; Lee *et al.*, 2017). Nesse arcabouço fisiopatológico, no que se refere a citocinas inflamatórias e ativação de NF- κ B contribuem para disfunção de tight junctions e aumento de permeabilidade, incluindo redistribuição e/ou queda de expressão de proteínas como ZO-1, ocludina e claudinas, promovendo amplificação de inflamação sistêmica em condições metabólicas (VALDEZ & BOLLING, 2019).

No ambiente intestinal, os resultados obtidos no ensaio com células Caco-2 estimuladas com ácido oleico reforçam a relevância do epitélio intestinal como alvo de alterações metabólicas induzidas por lipídios. Os dados demonstram que o estímulo com ácido oleico foi capaz de modular a expressão de genes associados à inflamação intestinal (IL-6 e IL-1 β), bem como componentes centrais da via TLR4/NF- κ B, confirmando o potencial desse ácido graxo em induzir resposta inflamatória no epitélio intestinal. O tratamento com as antocianidinas (C) e (M) promoveu modulação desses marcadores inflamatórios, sugerindo atenuação da resposta inflamatória induzida pelo ácido oleico.

De forma complementar, no mesmo modelo experimental, a expressão de genes relacionados à integridade da barreira intestinal, como ZO-1 e CLDN-1, foi modulada após o estímulo lipotóxico, sendo observadas alterações adicionais na presença das antocianidinas. O conjunto de achados obtidos são compatíveis com a noção de que estímulos lipídicos podem comprometer a homeostase epitelial intestinal e que compostos fenólicos podem interferir em vias moleculares associadas à manutenção da barreira intestinal.

Adicionalmente, a análise da expressão de genes associados ao transporte lipídico intestinal, como LPL e NPC1L1, demonstrou que o ácido oleico altera a regulação molecular dessas vias no epitélio intestinal, enquanto o tratamento com (C) e (M) modulou a expressão desses genes em relação ao grupo estimulado. Apesar desses resultados se basearem em expressão gênica e não em avaliação funcional direta da absorção lipídica, eles indicam que as antocianidinas atuam em níveis moleculares relacionados ao metabolismo lipídico intestinal em um contexto de disfunção induzida por ácido oleico.

No presente estudo, em contexto experimental com estímulo inflamatório (LPS), (C) e (M) demonstraram potencial para atenuar a inflamação intestinal, com redução da expressão de mediadores pró-inflamatórios como IL-6 e IL-1 β , além de favorecer parâmetros relacionados à homeostase glicídica intestinal, observados pela redução de glicose residual no meio. Esses achados, interpretados de forma integrada, indicam um perfil de resposta intestinal mais favorável sob tratamento com antocianidinas e indicam melhora da função epitelial, sendo compatíveis com um efeito protetor sobre a barreira intestinal (MO *et al.*, 2022; BENDOKAS *et al.*, 2020). Entretanto, deve-se ressaltar que a preservação direta de tight junctions (por exemplo, ZO-1, ocludina e claudinas) e a redução objetiva de permeabilidade intestinal configuram hipótese

mecanística que requer confirmação experimental específica (VALDEZ & BOLLING, 2019; REMENYIK *et al.*, 2022).

A conexão mecanística entre epitélio intestinal e tecido adiposo é particularmente plausível ao considerar que a melhora da barreira intestinal pode limitar a translocação de LPS e, por consequência, reduzir ativação de TLR4/NF- κ B em tecidos metabólicos periféricos, incluindo tecido adiposo. Dessa forma, os efeitos observados em Caco-2 são coerentes com a hipótese de que (C) e (M) possam contribuir para reduzir a translocação de LPS (endotoxemia metabólica) ao preservar a integridade epitelial, atenuando a ativação sistêmica de vias pró-inflamatórias e reduzindo a pressão inflamatória sobre o adipócito (VALDEZ & BOLLING, 2019; LEE *et al.*, 2017). Nesse sentido, para validação do modelo proposto, recomenda-se que estudos futuros avaliem diretamente a integridade de barreira intestinal por meio de ensaios funcionais clássicos como TEER (transepithelial electrical resistance) e permeabilidade ao FITC-dextran, bem como a análise de proteínas de tight junction (ZO-1, ocludina e claudinas) e quantificação de LPS em sobrenadantes (*in vitro*) ou plasma (*in vivo*), permitindo confirmar de forma objetiva a redução de endotoxemia metabólica sugerida pelo conjunto de resultados (MO *et al.*, 2022; BENDOKAS *et al.*, 2020; VALDEZ & BOLLING, 2019; REMENYIK *et al.*, 2022).

Do ponto de vista de vias metabólicas plausíveis, além do eixo TLR4/NF- κ B, destaca-se o potencial envolvimento de AMPK como regulador central de homeostase energética e metabolismo lipídico. A literatura sugere que antocianidinas e outros polifenóis podem ativar AMPK, promovendo inibição de fatores lipogênicos como SREBP-1c, reduzindo síntese de lipídios e favorecendo β -oxidação, fornecendo racional robusto para explicar a redução de acúmulo de TG observada no presente estudo em baixas doses (HARDIE, 2016; PARK *et al.*, 2015). Assim, recomenda-se discutir AMPK como marcador-alvo a ser mensurado em estudos futuros por Western blot (p-AMPK/AMPK), o que permitiria fortalecer o elo mecanístico entre antocianidinas e reprogramação metabólica do adipócito e epitélio intestinal.

Apesar da consistência dos achados, é necessário reconhecer limitações importantes inerentes a modelos celulares. Apesar de que as células 3T3-L1 e Caco-2 sejam amplamente utilizados e bem caracterizados, tais modelos não reproduzem integralmente a complexidade da obesidade em organismos vivos, especialmente no que se refere à interação com microbiota intestinal, metabolismo hepático, biodisponibilidade, biotransformação e microambiente imune.

Assim, a extrapolação dos resultados deve ser realizada com cautela, e investigações futuras em modelos *in vivo* ou *ex vivo* são recomendadas para validar os mecanismos sugeridos e confirmar a relevância fisiológica dos efeitos observados (VALDEZ & BOLLING, 2019; LEE *et al.*, 2017; AHMED *et al.*, 2021).

Outro ponto crítico refere-se à plausibilidade farmacocinética das concentrações testadas. Embora o intervalo 5–100 μM seja útil para estabelecer dose-resposta e explorar mecanismos celulares, níveis plasmáticos e teciduais alcançados após ingestão dietética de antocianinas/antocianidinas geralmente são inferiores e dependem de fatores como absorção, metabolismo intestinal e hepático e presença de metabólitos ativos. Dessa forma, o fato de o efeito benéfico ser mais evidente em baixas concentrações (5–10 μM) reforça a relevância translacional dos achados, enquanto a resposta inversa em dose alta pode representar condição supra-fisiológica mais útil para compreensão de toxicodinâmica ou hormese do que para aplicabilidade clínica direta (DEEPA *et al.*, 2023; YILDIZ, 2020).

E em síntese, os resultados do presente estudo indicam que as antocianidinas (C) e (M) exercem efeitos imunometabólicos relevantes em modelos *in vitro*, modulando vias associadas à inflamação e ao metabolismo lipídico. Em 3T3-L1, o tratamento reduziu o acúmulo intracelular de triglicerídeos e atenuou marcadores inflamatórios associados ao eixo TLR4/NF- κB . Em Caco-2, foi possível identificar redução do conteúdo lipídico intracelular e modulação de marcadores relacionados à função da barreira intestinal, sugerindo possível efeito protetor no eixo intestino–tecido adiposo. Considerando o conjunto de evidências, os achados reforçam o potencial dessas antocianidinas como moduladores de processos centrais envolvidos na fisiopatologia da obesidade, especialmente em baixas concentrações (5–10 μM). (MOLONIA *et al.*, 2020; PARK *et al.*, 2015; VALDEZ & BOLLING, 2019).

Embora os resultados obtidos apontem de forma consistente para modulação de vias inflamatórias e metabólicas pelas antocianidinas (C) e (M), uma limitação do presente estudo é que parte dos mecanismos foi inferida predominantemente com base em marcadores de expressão gênica. Dessa forma, recomenda-se que estudos futuros incluam validação em nível proteico (por exemplo, Western blot, ELISA e/ou imunofluorescência), especialmente para alvos centrais como TLR4, NF- κB (e suas formas fosforiladas), bem como proteínas relacionadas à sinalização de

insulina e metabolismo lipídico. Essa abordagem permitirá maior robustez causal na interpretação dos mecanismos e melhor sustentação translacional dos achados.

A Tabela 4 apresenta a síntese dos principais achados do estudo nos modelos 3T3-L1 e Caco-2, relacionando os efeitos do tratamento com as vias envolvidas e possíveis implicações mecanísticas e translacionais.

TABELA 4: Síntese integrativa dos efeitos imunometabólicos da cianidina e da malvidina em modelos experimentais *in vitro* (3T3-L1 e Caco-2).

(continua)

Modelo / ensaio	Achado principal (tratamento)	Via / alvo relacionado	Implicação clínica / translacional	Referência de suporte (literatura)
3T3-L1 MTT (5–100 μ M)	Cianidina e a malvidina não apresentaram citotoxicidade nas doses testadas.	Viabilidade celular (ausência de toxicidade \rightarrow efeitos metabólicos interpretáveis).	Sugere segurança celular em faixa de dose experimental; reforça que efeitos anti-inflamatórios/metabólicos não são decorrentes de morte celular.	Bendokas <i>et al.</i> , 2020 (revisão: antocianinas, bioatividade e segurança).
3T3-L1 Oil Red O / acúmulo de TG	\downarrow TG intracelular em baixas doses (5–10 μ M) com cianidina e malvidina.	Metabolismo lipídico/adipogênese; hipótese: AMPK \uparrow \rightarrow SREBP1c \downarrow \rightarrow lipogênese \downarrow .	Potencial anti-lipidogênico \rightarrow redução de lipotoxicidade e melhora de fenótipo metabólico associado à obesidade.	Chen <i>et al.</i> , 2022; Randeni <i>et al.</i> , 2025 (antocianinas e antiobesidade / vias metabólicas).
3T3-L1 Oil Red O / acúmulo de TG (dose alta)	Efeito inverso em 100 μ M (principalmente malvidina): \uparrow acúmulo lipídico/TG.	Resposta bifásica/hormese; possível estresse oxidativo (ROS \uparrow) em altas doses; interferência redox/metabólica.	Relevante para dose-resposta: altas doses podem ser contraproducentes (prólipogênicas). Importante para desenho de intervenção/suplementação.	Bendokas <i>et al.</i> , 2020 (redox/antocianinas); discussão de hormese em polifenóis (revisões gerais).
3T3-L1 Resistência à insulina (palmitato) glicose residual	Melhora da sensibilidade à insulina: \downarrow glicose residual com cianidina/malvidina em modelo palmitato.	Sinalização de insulina (PI3K/Akt; IRS-1) proposta: p-Akt \uparrow , p-IRS1 Tyr \uparrow / Ser \downarrow ; GLUT4 \uparrow .	Efeito insulinossensibilizante \rightarrow potencial benefício em obesidade/DM2 e síndrome metabólica.	Molonia <i>et al.</i> , 2020 (C3G em adipócitos hipertrofiados: inflamação \downarrow e sinalização insulina \uparrow).

TABELA 4: Síntese integrativa dos efeitos imunometabólicos da cianidina e da malvidina em modelos experimentais *in vitro* (3T3-L1 e Caco-2).

(conclusão)

Modelo / ensaio	Achado principal (tratamento)	Via / alvo relacionado	Implicação clínica / translacional	Referência de suporte (literatura)
3T3-L1 Expressão gênica inflamatória	↓ TNF- α , ↓ IL-6, ↓ IL-1 β ; ↓ TLR4; ↓ NF- κ B com tratamento.	Eixo TLR4 → NF- κ B → citocinas pró-inflamatórias (inflamação metabólica).	Atenuação da inflamação adiposa → melhora de RI e redução de progressão cardiometabólica associada à obesidade.	Randeni <i>et al.</i> , 2025; Chen <i>et al.</i> , 2022 (anti-inflamatório/metabólico).
Caco-2 Estímulo com LPS (inflamação intestinal)	Redução de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS (↓ IL-6 e ↓ IL-1 β).	Eixo TLR4/NF- κ B intestinal; imunidade inata; endotoxemia metabólica.	Sugere proteção intestinal → menor drive inflamatório sistêmico e potencial redução de endotoxemia em obesidade.	Mo <i>et al.</i> , 2022 (antocianinas e barreira intestinal); Bendokas <i>et al.</i> , 2020.
Caco-2 avaliação da Barreira intestinal (marcadores TJ)	Melhora de marcadores associados à barreira/tight junctions (descrito como melhoria de barreira).	ZO-1/Ocludina/Claudininas (tight junctions) → permeabilidade intestinal ↓ → LPS ↓.	Redução de permeabilidade → menor endotoxemia metabólica → menor ativação de TLR4 no tecido adiposo.	Mo <i>et al.</i> , 2022; revisões de antocianinas e barreira (Bendokas <i>et al.</i> , 2020).

Com base nessa síntese, elaborou-se um modelo mecanístico proposto que resume, de forma esquemática, a atuação integrada das antocianidinas ao longo do eixo intestino–tecido adiposo, contemplando a modulação inflamatória, a preservação funcional da barreira intestinal e a atenuação de vias pró-inflamatórias sistêmicas relacionadas à obesidade (Figura 18).

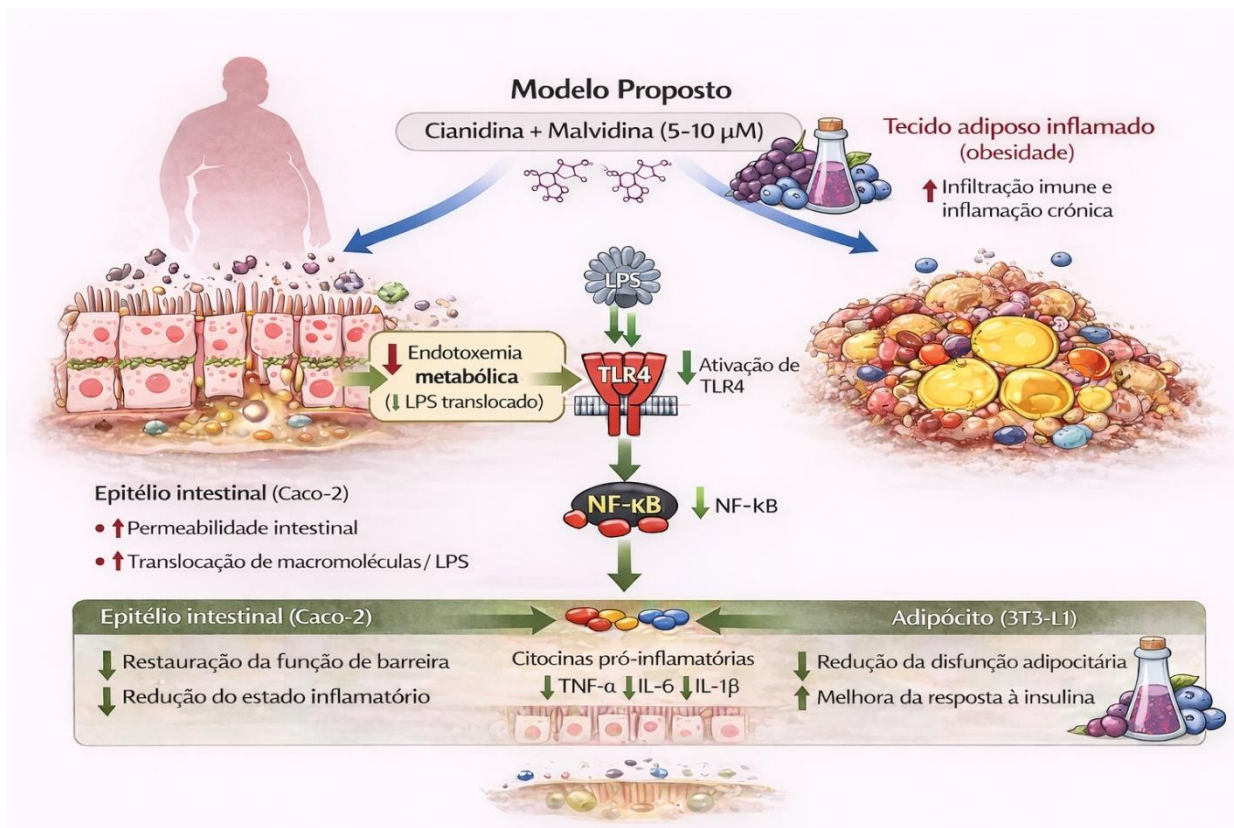


FIGURA 18: Modelo mecânico proposto dos efeitos das antocianidinas cianidina e malvidina no eixo intestino–tecido adiposo. A obesidade promove disfunção da barreira intestinal e inflamação do tecido adiposo, favorecendo a translocação de LPS e a ativação do eixo TLR4/NF- κB . A intervenção com cianidina e malvidina (5–10 μM) pode contribuir para atenuar a endotoxemia metabólica e a ativação de NF- κB , o que está associado à redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), restauração da integridade da barreira intestinal e melhora da função metabólica do adipócito.

Embora os resultados do presente estudo tenham sido obtidos em modelos experimentais *in vitro*, os efeitos observados apresentam elevada plausibilidade biológica e consistência com evidências pré-clínicas e clínicas descritas na literatura. A modulação de vias centrais da fisiopatologia da obesidade, como a atenuação do eixo TLR-4/NF- κB , a redução da expressão de marcadores inflamatórios, a melhora da sensibilidade à insulina e o fortalecimento da integridade da barreira intestinal, reforça o potencial das antocianidinas cianidina e malvidina como moduladores imunometabólicos. A avaliação isolada dessas antocianidinas representa um diferencial relevante do estudo, uma vez que contribui para a compreensão mecânica dos benefícios associados ao consumo de alimentos ricos em polifenóis e fornece subsídios para o desenvolvimento de estratégias nutricionais e nutracêuticas mais direcionadas. Ainda assim, devem

ser consideradas as limitações inerentes aos modelos *in vitro*, que não reproduzem integralmente a biodisponibilidade, o metabolismo e as interações sistêmicas observadas *in vivo*, bem como o fato de que as concentrações avaliadas representam doses nominais. Nesse contexto, estudos futuros empregando modelos experimentais mais complexos e ensaios clínicos controlados são necessários para confirmar e expandir a relevância translacional dos efeitos aqui observados.

6. CONCLUSÃO

•(C) e (M) apresentaram ausência de citotoxicidade nas concentrações avaliadas (5–100 μ M), garantindo validade biológica para interpretação dos efeitos metabólicos e inflamatórios observados.

•Em 3T3-L1, o tratamento promoveu redução do acúmulo intracelular de triglicerídeos (TG) em baixas concentrações (5–10 μ M), evidenciando potencial anti-lipidogênico/antiadipogênico.

•Observou-se efeito dose-dependente/bifásico, com redução do efeito benéfico e tendência a efeito inverso em altas concentrações (especialmente 100 μ M), sugerindo comportamento compatível com hormese e possível envolvimento de alterações redox/metabólicas.

•No modelo de resistência à insulina induzida por palmitato (3T3-L1), (C) e (M) foram associadas à melhora funcional da sensibilidade à insulina, evidenciada por redução da glicose residual no meio de cultura.

•O tratamento modulou marcadores inflamatórios em 3T3-L1, com redução de TNF- α , IL-1 β e IL-6, além de diminuição do eixo TLR4/NF- κ B, sugerindo atenuação da inflamação metabólica associada à obesidade.

•Os achados sustentam racional mecanístico plausível envolvendo interação entre inflamação metabólica e resistência à insulina, com indicação de que vias como IRS-1/PI3K/Akt e GLUT4 (Slc2A4) devem ser confirmadas em análises futuras (p-Akt/p-IRS1; GLUT4 trafficking).

•Em Caco-2, o tratamento demonstrou efeito anti-inflamatório intestinal em condição inflamada por LPS, com redução de citocinas pró-inflamatórias (ex.: IL-6 e IL-1 β), sugerindo proteção do epitélio intestinal.

•Os resultados em Caco-2 são compatíveis com a hipótese de melhora funcional da barreira intestinal, contribuindo potencialmente para reduzir endotoxemia metabólica; porém, esse mecanismo deve ser confirmado experimentalmente por ensaios específicos (TEER, FITC-dextran; ZO-1/occludina/cludinas; quantificação de LPS).

•De forma integrada, os dados suportam um modelo mecanístico intestino–tecido adiposo, no qual antocianidinas podem:

- Reduzir inflamação intestinal e favorecer função epitelial;

- Reduzir translocação/impacto de LPS;
 - Diminuir ativação do eixo TLR4/NF- κ B e citocinas pró-inflamatórias;
- reduzir acúmulo lipídico (\downarrow TG) e favorecer sensibilidade à insulina no adipócito.

- As limitações inerentes ao modelo *in vitro* (ausência de microbiota, metabolismo hepático e microambiente imune) indicam a necessidade de validação em modelos *ex vivo/in vivo*, incluindo confirmação de marcadores mecanísticos centrais (p-Akt/p-IRS1, p-AMPK, tight junctions e permeabilidade intestinal).

REFERÊNCIAS

- ABOONABI, A. Anthocyanins reduce inflammation and improve glucose and lipid metabolism associated with inhibiting nuclear factor-kappaB activation and increasing PPAR- γ gene expression in metabolic syndrome subjects. **Free Radic Biol Med**, 150, p. 30-39, Apr 2020.
- AHMED, B.; SULTANA, R.; GREENE, M. W. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 137, p. 111315, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111315.
- ARÇARI, D. P.; SANTOS, J. C.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food chemistry**, 141, n. 2, p. 809-815, 2013.
- ARÇARI, D. P.; SANTOS, J. C.; GAMBERO, A.; FERRAZ, L. F. C. *et al.* Modulatory effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) on the PI3K-AKT signaling pathway. **Molecular nutrition & food research**, 57, n. 10, p. 1882-1885, 2013.
- ARCARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A. *et al.* Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, 17, n. 12, p. 2127-2133, Dec 2009. Research Support, Non-U.S. Gov't.
- ARCARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W., Jr.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A. *et al.* Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Mol Cell Endocrinol**, 335, n. 2, p. 110-115, Mar 30 2011. Research Support, Non-U.S. Gov't
- AHMED, S. K.; MOHAMMED, R. A. Obesity: Prevalence, causes, consequences, management, preventive strategies and future research directions. **Metabol Open**, 27, p. 100375, Sep 2025.
- AHO, V. T. E.; HOUSER, M. C.; PEREIRA, P. A. B.; CHANG, J. *et al.* Relationships of gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and the gut barrier in Parkinson's disease. **Mol Neurodegener**, 16, n. 1, p. 6, Feb 08 2021.
- AL-HABSI, N.; AL-KHALILI, M.; HAQUE, S. A.; ELIAS, M. *et al.* Health Benefits of Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, and Postbiotics. **Nutrients**, 16, n. 22, Nov 19 2024.
- ALLAM-NDOUL, B.; CASTONGUAY-PARADIS, S.; VEILLEUX, A. Gut Microbiota and Intestinal Trans-Epithelial Permeability. **Int J Mol Sci**, 21, n. 17, Sep 03 2020.
- ALTMANN, S. W.; DAVIS, H. R.; ZHU, L. J.; YAO, X. *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. **Science**, 303, n. 5661, p. 1201-1204, Feb 20 2004.
- ARANGO-GONZÁLEZ, A.; LARA-GUZMÁN, O. J.; RIVERA, D. A.; ÁLVAREZ, R. *et al.* Putative intestinal permeability markers do not correlate with cardiometabolic health and gut microbiota in humans, except for peptides recognized by a widely used zonulin ELISA kit. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 33, n. 1, p. 112-123, Jan 2023.
- BARROSO, W. K. S.; SOUZA, A. L. L. Obesity, Overweight, Body Adiposity and Cardiovascular Risk in Children and Adolescents. **Arq Bras Cardiol**, 115, n. 2, p. 172-173, Aug 28 2020.
- BASHIR, K. M. I.; KIM, J. K.; CHUN, Y. S.; CHOI, J. S. *et al.* In Vitro Assessment of Anti-Adipogenic and Anti-Inflammatory Properties of Black Cumin (**Medicina (Kaunas)**), 59, n. 11, Nov 17 2023.

- BASTIN, A.; SADEGHI, A.; NEMATOLLAHI, M. H.; ABOLHASSANI, M. *et al.* The effects of malvidin on oxidative stress parameters and inflammatory cytokines in LPS-induced human THP-1 cells. **J Cell Physiol**, 236, n. 4, p. 2790-2799, Apr 2021.
- BENDER, S. B.; LAUGHLIN, M. H. Modulation of endothelial cell phenotype by physical activity: impact on obesity-related endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 309, n. 1, p. H1-8, Jul 01 2015.
- BENDOKAS, V.; LIUBIKAS, J.; *et al.* Anthocyanins: From the field to the antioxidants in the body. *Antioxidants*, v. 9, 2020.
- BHASWANT, M.; FANNING, K.; NETZEL, M.; MATHAI, M. L. *et al.* Cyanidin 3-glucoside improves diet-induced metabolic syndrome in rats. **Pharmacol Res**, 102, p. 208-217, Dec 2015.
- BOUTAGY, N. E.; MCMILLAN, R. P.; FRISARD, M. I.; HULVER, M. W. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? **Biochimie**, 124, p. 11-20, May 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2022: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svsa/vigitel>. Acesso em: 04 dez. 2025.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Obesidade no Brasil: panorama epidemiológico e tendências*. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/>. Acesso em: 04 dez. 2025.
- BUSEBEE, B.; GHUSN, W.; CIFUENTES, L.; ACOSTA, A. Obesity: A Review of Pathophysiology and Classification. **Mayo Clin Proc**, 98, n. 12, p. 1842-1857, Dec 2023.
- CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, 56, n. 7, p. 1761-1772, Jul 2007.
- CANI, P. D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A. *et al.* Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, 57, n. 6, p. 1470-1481, Jun 2008.
- CHAKAROUN, R. M.; MASSIER, L.; KOVACS, P. Gut Microbiome, Intestinal Permeability, and Tissue Bacteria in Metabolic Disease: Perpetrators or Bystanders? **Nutrients**, 12, n. 4, p. 1082, 2020.
- CHAMBERS, E. S.; PRESTON, T.; FROST, G.; MORRISON, D. J. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. **Curr Nutr Rep**, 7, n. 4, p. 198-206, Dec 2018.
- CHAMNANSILPA, N.; AKSORNCHU, P.; ADISAKWATTANA, S.; THILAVECH, T. *et al.* Anthocyanin-rich fraction from Thai berries interferes with the key steps of lipid digestion and cholesterol absorption. **Heliyon**, 6, n. 11, p. e05408, Nov 2020.
- CHAURASIA, B.; TALBOT, C. L.; SUMMERS, S. A. Adipocyte Ceramides-The Nexus of Inflammation and Metabolic Disease. **Front Immunol**, 11, p. 576347, 2020.
- CHEN, K.; KORTESNIEMI, M. K.; LINDERBORG, K. M.; YANG, B. Anthocyanins as Promising Molecules Affecting Energy Homeostasis, Inflammation, and Gut Microbiota in Type 2 Diabetes with Special Reference to Impact of Acylation. **J Agric Food Chem**, 71, n. 2, p. 1002-1017, Jan 18 2023.

- CHEN, M.; LIU, Y.; XIONG, S.; WU, M. *et al.* Dietary l-tryptophan alleviated LPS-induced intestinal barrier injury by regulating tight junctions in a Caco-2 cell monolayer model. **Food Funct**, 10, n. 5, p. 2390-2398, May 22 2019.
- CHEN, Y.; MA, L.; HAN, Z.; XIONG, P. The global burden of disease attributable to high body mass index in 204 countries and territories: Findings from 1990 to 2019 and predictions to 2035. **Diabetes Obes Metab**, 26, n. 9, p. 3998-4010, Sep 2024.
- CHOI, C.; SAHA, A.; AN, S.; CHO, Y. K. *et al.* Macrophage-Specific Connexin 43 Knockout Protects Mice from Obesity-Induced Inflammation and Metabolic Dysfunction. **Front Cell Dev Biol**, 10, p. 925971, 2022.
- CHOI, W.; WOO, G. H.; KWON, T. H.; JEON, J. H. Obesity-Driven Metabolic Disorders: The Interplay of Inflammation and Mitochondrial Dysfunction. **Int J Mol Sci**, 26, n. 19, Oct 06 2025.
- COCHET, F.; PERI, F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. **Int J Mol Sci**, 18, n. 11, Nov 03 2017.
- CODONER-FRANCH, P.; ALONSO-IGLESIAS, E. Resistin: insulin resistance to malignancy. **Clin Chim Acta**, 438, p. 46-54, Jan 01 2015.
- COLLABORATORS, G. A. B. Global, regional, and national prevalence of adult overweight and obesity, 1990-2021, with forecasts to 2050: a forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021. **Lancet**, 405, n. 10481, p. 813-838, Mar 08 2025.
- COLLABORATORS, G. D. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. **Lancet**, 402, n. 10397, p. 203-234, Jul 15 2023.
- CREMONINI, E.; MASTALLOUDIS, A.; HESTER, S. N.; VERSTRAETEN, S. V. *et al.* Anthocyanins inhibit tumor necrosis alpha-induced loss of Caco-2 cell barrier integrity. **Food Funct**, 8, n. 8, p. 2915-2923, Aug 01 2017.
- DARYABOR, G.; ATASHZAR, M. R.; KABELITZ, D.; MERI, S. *et al.* The Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Organ Metabolism and the Immune System. **Front Immunol**, 11, p. 1582, 2020.
- DAVIS, J. E.; GABLER, N. K.; WALKER-DANIELS, J.; SPURLOCK, M. E. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. **Obesity (Silver Spring)**, 16, n. 6, p. 1248-1255, Jun 2008.
- DEEPA, P.; HONG, M.; SOWNDHARARAJAN, K.; KIM, S. A review of the role of an anthocyanin, cyanidin-3-O- β -glucoside, in obesity-related complications. *Plants*, v. 12, n. 22, p. 3889, 2023. DOI: 10.3390/plants12223889.
- DEN HARTOGH, D. J.; VLAVCHESKI, F.; GIACCA, A.; MACPHERSON, R. E. K. *et al.* Carnosic Acid Attenuates the Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance in Muscle Cells and Adipocytes. **Cells**, 11, n. 1, Jan 5 2022.
- DI TOMMASO, N.; GASBARRINI, A.; PONZIANI, F. R. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 18, n. 23, p. 12836, 2021.
- DING, Y.; SUBRAMANIAN, S.; MONTES, V. N.; GOODSPEED, L. *et al.* Toll-like receptor 4 deficiency decreases atherosclerosis but does not protect against inflammation in obese low-density

- lipoprotein receptor-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 32, n. 7, p. 1596-1604, Jul 2012.
- DU, L.; DING, X.; TIAN, Y.; CHEN, J. *et al.* Effect of anthocyanins on metabolic syndrome through interacting with gut microbiota. **Pharmacol Res**, 210, p. 107511, Dec 2024.
- DU, L.; DING, X.; ZHANG, W.; HUANG, L. *et al.* Anthocyanins from blueberry and blackberry ameliorate metabolic syndrome by *Prevotella histicola* and acetic acid. **NPJ Sci Food**, 9, n. 1, p. 158, Jul 29 2025.
- DU, Y.; HE, C.; AN, Y.; HUANG, Y. *et al.* The Role of Short Chain Fatty Acids in Inflammation and Body Health. **Int J Mol Sci**, 25, n. 13, Jul 05 2024.
- DUAN, H.; WANG, L.; HUANGFU, M.; LI, H. The impact of microbiota-derived short-chain fatty acids on macrophage activities in disease: Mechanisms and therapeutic potentials. **Biomed Pharmacother**, 165, p. 115276, Sep 2023.
- ECKMANN, L. Sensor molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. **Curr Opin Gastroenterol**, 22, n. 2, p. 95-101, Mar 2006.
- ENGIN, A. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity: Clinical Reappraisal of Hypoxia Hypothesis. **Adv Exp Med Biol**, 1460, p. 329-356, 2024a.
- ENGIN, A. Endothelial Dysfunction in Obesity and Therapeutic Targets. **Adv Exp Med Biol**, 1460, p. 489-538, 2024b.
- ENGIN, A. Reappraisal of Adipose Tissue Inflammation in Obesity. **Adv Exp Med Biol**, 1460, p. 297-327, 2024c.
- ENGIN, A. B. Message Transmission Between Adipocyte and Macrophage in Obesity. **Adv Exp Med Biol**, 1460, p. 273-295, 2024.
- FASANO, A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. **Ann N Y Acad Sci**, 1258, n. 1, p. 25-33, Jul 2012.
- FATOYE, F.; MBADA, C.; NIYI-ODUMOSU, F.; FATOYE, C. *et al.* The clinical and economic burden of obesity in low- and middle-income countries: a systematic review. **Int J Obes (Lond)**, 49, n. 12, p. 2453-2461, Dec 2025.
- FERRARI, A.; WHANG, E.; XIAO, X.; KENNELLY, J. P. *et al.* Aster-dependent nonvesicular transport facilitates dietary cholesterol uptake. **Science**, 382, n. 6671, p. eadf0966, Nov 10 2023.
- FIGUEIRA, M. D. S. **Efeitos do extrato aquoso de guaraná (Paullinia cupana) em pó nos mecanismos envolvidos com a absorção de colesterol in vitro e em células Caco-2.** 2021. -, Universidade de São Paulo.
- FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; RAMÍREZ, B.; BECERRIL, S. *et al.* Decreased expression of the NLRP6 inflammasome is associated with increased intestinal permeability and inflammation in obesity with type 2 diabetes. **Cell Mol Life Sci**, 81, n. 1, p. 77, Feb 05 2024.
- FUJISAKA, S. The role of adipose tissue M1/M2 macrophages in type 2 diabetes mellitus. **Diabetol Int**, 12, n. 1, p. 74-79, Jan 2021.
- GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, 7, n. 2, p. 730-750, Jan 22 2015.

- GAO, J.; CAO, B.; ZHAO, R.; LI, H. *et al.* Critical Signaling Transduction Pathways and Intestinal Barrier: Implications for Pathophysiology and Therapeutics. **Pharmaceuticals (Basel)**, 16, n. 9, Aug 29 2023.
- GARCIA-MANTRANA, I.; SELMA-ROYO, M.; ALCANTARA, C.; COLLADO, M. C. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. **Front Microbiol**, 9, p. 890, 2018.
- GENSER, L.; AGUANNO, D.; SOULA, H. A.; DONG, L. *et al.* Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. **J Pathol**, 246, n. 2, p. 217-230, Oct 2018.
- GHOSH, S.; WHITLEY, C. S.; HARIBABU, B.; JALA, V. R. Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 11, n. 5, p. 1463-1482, 2021.
- GO, E. J.; RYU, B. R.; GIM, G. J.; SHIN, Y. R. *et al.* Regulation of Intestinal Barrier Function and Gut Microbiota by Hot Melt Extrusion-Drug Delivery System-Prepared Mulberry Anthocyanin in an Inflammatory Bowel Disease Model. **Pharmaceuticals (Basel)**, 18, n. 4, Mar 27 2025.
- GODYLA-JABŁOŃSKI, M.; RACZKOWSKA, E.; JODKOWSKA, A.; KUCHARSKA, A. Z. *et al.* Effects of Anthocyanins on Components of Metabolic Syndrome-A Review. **Nutrients**, 16, n. 8, Apr 09 2024.
- GRIMM, W.; BECKER, H. F. Obesity, sleep apnea syndrome, and rhythmogenic risk. **Herz**, 31, n. 3, p. 213-218; quiz 219, May 2006.
- GUO, H.; XIA, M.; ZOU, T.; LING, W. *et al.* Cyanidin 3-glucoside attenuates obesity-associated insulin resistance and hepatic steatosis in high-fat diet-fed and db/db mice via the transcription factor FoxO1. **J Nutr Biochem**, 23, n. 4, p. 349-360, Apr 2012.
- GÜNZEL, D.; YU, A. S. Claudins and the modulation of tight junction permeability. **Physiol Rev**, 93, n. 2, p. 525-569, Apr 2013.
- HAN, Y.; WU, L.; LING, Q.; WU, P. *et al.* Intestinal Dysbiosis Correlates With Sirolimus-induced Metabolic Disorders in Mice. **Transplantation**, 105, n. 5, p. 1017-1029, May 01 2021.
- HARDIE, D. G.; SCHAFFER, B. E.; BRUNET, A. AMPK: An energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends in Cell Biology*, v. 26, n. 3, p. 190–201, 2016. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.013.
- HARIRI, M.; AMIRKALALI, B.; GHOLAMI, A. Effects of purified anthocyanins supplementation on serum concentration of inflammatory mediators: A systematic review and dose-response meta-analysis on randomized clinical trials. **Phytother Res**, 38, n. 3, p. 1494-1508, Mar 2024.
- HAYS, K. E.; PFAFFINGER, J. M.; RYZNAR, R. The interplay between gut microbiota, short-chain fatty acids, and implications for host health and disease. **Gut Microbes**, 16, n. 1, p. 2393270, 2024.
- HERMAN, R.; KRAVOS, N. A.; JENSTERLE, M.; JANEŽ, A. *et al.* Metformin and Insulin Resistance: A Review of the Underlying Mechanisms behind Changes in GLUT4-Mediated Glucose Transport. **Int J Mol Sci**, 23, n. 3, Jan 23 2022.

- HILL, J. H.; SOLT, C.; FOSTER, M. T. Obesity associated disease risk: the role of inherent differences and location of adipose depots. **Horm Mol Biol Clin Investig**, 33, n. 2, Mar 16 2018.
- HONDA, K.; LITTMAN, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. **Nature**, 535, n. 7610, p. 75-84, Jul 07 2016.
- HONG, J.; KIM, M.; KIM, B. The Effects of Anthocyanin-Rich Bilberry Extract on Transintestinal Cholesterol Excretion. **Foods**, 10, n. 11, Nov 18 2021.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, 542, n. 7640, p. 177-185, Feb 08 2017.
- HUANG, W.; ZHU, Y.; LI, C.; SUI, Z. *et al.* Effect of Blueberry Anthocyanins Malvidin and Glycosides on the Antioxidant Properties in Endothelial Cells. **Oxid Med Cell Longev**, 2016, p. 1591803, 2016.
- HUANG, W. Y.; LIU, Y. M.; WANG, J.; WANG, X. N. *et al.* Anti-inflammatory effect of the blueberry anthocyanins malvidin-3-glucoside and malvidin-3-galactoside in endothelial cells. **Molecules**, 19, n. 8, p. 12827-12841, Aug 21 2014.
- HUNG, C. Y.; LEE, H. J.; TSAI, Z. T.; HUANG, S. J. *et al.* Maternal folic acid supplementation during pregnancy in association with childhood overweight or obesity. **Obesity (Silver Spring)**, 32, n. 6, p. 1179-1186, Jun 2024.
- IHME – Global Burden of Disease. *Death rate from obesity* [conjunto de dados]. In: Our World in Data (site). Global Burden of Disease – Risk Factors; 2024. Disponível em: <https://archive.ourworldindata.org/20250909-093708/grapher/death-rate-from-obesity-gbd.html>. Acesso em: 04 dez. 2025.
- JANDHYALA, S. M.; TALUKDAR, R.; SUBRAMANYAM, C.; VUYYURU, H. *et al.* Role of the normal gut microbiota. **World J Gastroenterol**, 21, n. 29, p. 8787-8803, Aug 07 2015.
- JANG, B. C. Tetrandrine has anti-adipogenic effect on 3T3-L1 preadipocytes through the reduced expression and/or phosphorylation levels of C/EBP- α , PPAR- γ , FAS, perilipin A, and STAT-3. **Biochem Biophys Res Commun**, 476, n. 4, p. 481-486, Aug 05 2016.
- KANG, Y.; KANG, X.; YANG, H.; LIU, H. *et al.* Lactobacillus acidophilus ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability. **Pharmacol Res**, 175, p. 106020, Jan 2022.
- KARLSSON, T.; RASK-ANDERSEN, M.; PAN, G.; HÖGLUND, J. *et al.* Contribution of genetics to visceral adiposity and its relation to cardiovascular and metabolic disease. **Nat Med**, 25, n. 9, p. 1390-1395, Sep 2019.
- KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **Am J Physiol Cell Physiol**, 320, n. 3, p. C375-C391, Mar 01 2021.
- KHAN, T. A.; FIELD, D.; CHEN, V.; AHMAD, S. *et al.* Combination of Multiple Low-Risk Lifestyle Behaviors and Incident Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. **Diabetes Care**, 46, n. 3, p. 643-656, Mar 01 2023.
- KHANNA, D.; KHANNA, S.; KHANNA, P.; KAHAR, P. *et al.* Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. **Cureus**, 14, n. 2, p. e22711, Feb 2022.

- KIADDEHI, F. B.; SAMANI, P.; BARAZANDEH, S.; PAM, P. *et al.* The Effect of Anthocyanin Supplementation on Pro-Inflammatory Biomarkers in Patients With Metabolic Disorders: A Grade-Assessed Systematic Review and Meta-Analysis. **Curr Ther Res Clin Exp**, 102, p. 100772, 2025.
- KIM, H. I.; HAN, Y.; PARK, J. AMP-Activated Protein Kinases in Health and Disease. **Int J Mol Sci**, 26, n. 16, Aug 21 2025.
- KIM, H. L.; HA, A. W.; KIM, W. K. Effect of saccharin on inflammation in 3T3-L1 adipocytes and the related mechanism. **Nutr Res Pract**, 14, n. 2, p. 109-116, Apr 2020.
- KOENEN, M.; HILL, M. A.; COHEN, P.; SOWERS, J. R. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. **Circ Res**, 128, n. 7, p. 951-968, Apr 02 2021.
- KOTA, R. S.; RAMANA, C. V.; TENORIO, F. A.; ENELOW, R. I. *et al.* Differential effects of lipoprotein lipase on tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma-mediated gene expression in human endothelial cells. **J Biol Chem**, 280, n. 35, p. 31076-31084, Sep 02 2005.
- KOWALCZYK, T.; MUSKAŁA, M.; MERECZ-SADOWSKA, A.; SIKORA, J. *et al.* Anti-Inflammatory and Anticancer Effects of Anthocyanins in In Vitro and In Vivo Studies. **Antioxidants (Basel)**, 13, n. 9, Sep 22 2024.
- KRUG, S. M.; FROMM, M. Special Issue on "The Tight Junction and Its Proteins: More than Just a Barrier". **Int J Mol Sci**, 21, n. 13, Jun 29 2020.
- KUO, W. T.; SHEN, L.; ZUO, L.; SHASHIKANTH, N. *et al.* Inflammation-induced Occludin Downregulation Limits Epithelial Apoptosis by Suppressing Caspase-3 Expression. **Gastroenterology**, 157, n. 5, p. 1323-1337, Nov 2019.
- LAI, J. L.; LIU, Y. H.; LIU, C.; QI, M. P. *et al.* Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. **Inflammation**, 40, n. 1, p. 1-12, Feb 2017.
- LANCASTER, G. I.; LANGEN, R. C. J.; WILEY, J. P.; *et al.* Evidence that TLR4 is not a receptor for saturated fatty acids but mediates lipid-induced inflammation by reprogramming macrophage metabolism. *Cell Metabolism*, v. 27, n. 5, p. 1096-1110.e5, 2018. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.03.014.
- LEE, Y. M.; YOON, Y.; YOON, H.; PARK, H. M. *et al.* Dietary Anthocyanins against Obesity and Inflammation. **Nutrients**, 9, n. 10, Oct 01 2017.
- LEE, Y. S.; OLEFSKY, J. Chronic tissue inflammation and metabolic disease. **Genes Dev**, 35, n. 5-6, p. 307-328, Mar 01 2021.
- LEHRSKOV, L. L.; CHRISTENSEN, R. H. The role of interleukin-6 in glucose homeostasis and lipid metabolism. **Semin Immunopathol**, 41, n. 4, p. 491-499, Jul 2019.
- LEMME-DUMIT, J. M. Intestinal organoid models as tools to interrogate the physiology of human mucosal tissues and host-microbe interactions. **mSphere**, 10, n. 8, p. e0082024, Aug 26 2025.
- LI, A.; LIN, C.; XIE, F.; JIN, M. *et al.* Berberine Ameliorates Insulin Resistance by Inhibiting IKK/NF- κ B, JNK, and IRS-1/AKT Signaling Pathway in Liver of Gestational Diabetes Mellitus Rats. **Metab Syndr Relat Disord**, 20, n. 8, p. 480-488, Oct 2022.
- LI, H.; MENG, Y.; HE, S.; TAN, X. *et al.* Macrophages, Chronic Inflammation, and Insulin Resistance. **Cells**, 11, n. 19, Sep 26 2022.

- LI, H. Y.; ZHOU, D. D.; GAN, R. Y.; HUANG, S. Y. *et al.* Effects and Mechanisms of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Postbiotics on Metabolic Diseases Targeting Gut Microbiota: A Narrative Review. **Nutrients**, 13, n. 9, Sep 15 2021.
- LI, S.; WU, B.; FU, W.; REDDIVARI, L. The Anti-inflammatory Effects of Dietary Anthocyanins against Ulcerative Colitis. **Int J Mol Sci**, 20, n. 10, May 27 2019.
- LI, Y.; YANG, P.; YE, J.; XU, Q. *et al.* Updated mechanisms of MASLD pathogenesis. **Lipids Health Dis**, 23, n. 1, p. 117, Apr 22 2024.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 32, n. 9, p. 2045-2051, Sep 2012.
- LIM, K. H.; STAUDT, L. M. Toll-like receptor signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 5, n. 1, p. a011247, Jan 01 2013.
- LIM, S. H.; LEE, H. S.; HAN, H. K.; CHOI, C. I. Saikosaponin A and D Inhibit Adipogenesis via the AMPK and MAPK Signaling Pathways in 3T3-L1 Adipocytes. **Int J Mol Sci**, 22, n. 21, Oct 22 2021.
- LIN, X.; LI, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 12, p. 706978, 2021.
- LINCOFF, A. M.; BROWN-FRANDSEN, K.; COLHOUN, H. M.; DEANFIELD, J. *et al.* Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Obesity without Diabetes. **N Engl J Med**, 389, n. 24, p. 2221-2232, Dec 14 2023.
- LING, J.; CHEN, S.; ZAHRY, N. R.; KAO, T. A. Economic burden of childhood overweight and obesity: A systematic review and meta-analysis. **Obes Rev**, 24, n. 2, p. e13535, Feb 2023.
- LIU, J.; FANG, Z.; LU, Q.; WANG, Y. *et al.* Projecting Global Trends and Inequalities in Adult Overweight and Obesity, 2023-2040: Findings From the NCD-RisC Database. **Obesity (Silver Spring)**, 33, n. 10, p. 1955-1967, Oct 2025.
- LIU, J.; ZHOU, H.; SONG, L.; YANG, Z. *et al.* Anthocyanins: Promising Natural Products with Diverse Pharmacological Activities. **Molecules**, 26, n. 13, Jun 22 2021.
- LIU, X.; SHANGGUAN, N.; ZHANG, F.; DUAN, R. Aronia-derived anthocyanins and metabolites ameliorate TNF α -induced disruption of myogenic differentiation in satellite cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 733, p. 150687, Nov 12 2024.
- LOMBARDO, G. E.; NAVARRA, M.; CREMONINI, E. A flavonoid-rich extract of bergamot juice improves high-fat diet-induced intestinal permeability and associated hepatic damage in mice. **Food Funct**, 15, n. 19, p. 9941-9953, Sep 30 2024.
- LONGO, M.; ZATTERALE, F.; NADERI, J.; PARRILLO, L. *et al.* Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. **Int J Mol Sci**, 20, n. 9, May 13 2019.
- LU, Y.; MA, J.; ZHAO, J.; SONG, Z. *et al.* The Role of MKP-5 in Adipocyte-Macrophage Interactions during Obesity. **Obes Facts**, 13, n. 1, p. 86-101, 2020.
- MA, M.; QUAN, Y.; LI, Y.; HE, X. *et al.* Bidirectional modulation of insulin action by reactive oxygen species in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Med Rep**, 18, n. 1, p. 807-814, Jul 2018.

- MA, Z.; DU, B.; LI, J.; YANG, Y. *et al.* An Insight into Anti-Inflammatory Activities and Inflammation Related Diseases of Anthocyanins: A Review of Both In Vivo and In Vitro Investigations. **Int J Mol Sci**, 22, n. 20, Oct 14 2021.
- MADANI, A. Y.; MAJEED, Y.; ABDESSELEM, H. B.; AGHA, M. V. *et al.* Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Suppresses STAT1/Interferon Signaling Pathway and Inflammation in Senescent Preadipocytes. **Antioxidants (Basel)**, 10, n. 2, Feb 23 2021.
- MANN, E. R.; LAM, Y. K.; UHLIG, H. H. Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. **Nat Rev Immunol**, 24, n. 8, p. 577-595, Aug 2024.
- MATHEUS, V. A.; MONTEIRO, L.; OLIVEIRA, R. B.; MASCHIO, D. A. *et al.* Butyrate reduces high-fat diet-induced metabolic alterations, hepatic steatosis and pancreatic beta cell and intestinal barrier dysfunctions in prediabetic mice. **Exp Biol Med (Maywood)**, 242, n. 12, p. 1214-1226, Jun 2017.
- MATTIOLI, R.; FRANCIOSO, A.; MOSCA, L.; SILVA, P. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, 25, n. 17, Aug 21 2020.
- MENG, C.; ZHOU, L.; HUANG, L.; GU, Q. *et al.* Chlorogenic acid regulates the expression of NPC1L1 and HMGCR through PXR and SREBP2 signaling pathways and their interactions with HSP90 to maintain cholesterol homeostasis. **Phytomedicine**, 123, p. 155271, Jan 2024.
- MERECZ-SADOWSKA, A.; SITAREK, P.; KOWALCZYK, T.; ZAJDEL, K. *et al.* Food Anthocyanins: Malvidin and Its Glycosides as Promising Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents with Potential Health Benefits. **Nutrients**, 15, n. 13, Jul 01 2023.
- MO, J.; NI, J.; ZHANG, M.; XU, Y. *et al.* Mulberry Anthocyanins Ameliorate DSS-Induced Ulcerative Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Modulating Gut Microbiota. **Antioxidants (Basel)**, 11, n. 9, Aug 27 2022.
- MOINI, H.; TIROSH, O.; PARK, Y. C.; CHO, K. J. *et al.* R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor, and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **Arch Biochem Biophys**, 397, n. 2, p. 384-391, Jan 15 2002.
- MOLONIA, M. S.; OCCHIUTO, C.; MUSCARÀ, C.; SPECIALE, A. *et al.* Cyanidin-3-O-glucoside restores insulin signaling and reduces inflammation in hypertrophic adipocytes. **Arch Biochem Biophys**, 691, p. 108488, Sep 30 2020.
- MOON, H. S.; CHUNG, C. S.; LEE, H. G.; KIM, T. G. *et al.* Inhibitory effect of (-)-Epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. **Obesity**, 15, n. 11, p. 2571-2582, 2007.
- MORELLI, M.; SAVOVA, M. V.; QUEIROZ, K.; HARMS, A. C. *et al.* Cytokine-Induced Barrier Dysfunction and Lipid Signaling in a Gut-On-Chip Model. **FASEB J**, 39, n. 19, p. e71059, Oct 15 2025.
- NAGI, M. A.; AHMED, H.; REZQ, M. A. A.; SANGROONGRUANGSRI, S. *et al.* Economic costs of obesity: a systematic review. **Int J Obes (Lond)**, 48, n. 1, p. 33-43, Jan 2024.
- NASCIMENTO, J. C.; MATHEUS, V. A.; OLIVEIRA, R. B.; TADA, S. F. S. *et al.* High-Fat Diet Induces Disruption of the Tight Junction-Mediated Paracellular Barrier in the Proximal Small

Intestine Before the Onset of Type 2 Diabetes and Endotoxemia. **Dig Dis Sci**, 66, n. 10, p. 3359-3374, Oct 2021.

NAUDE, C. E.; BRAND, A.; SCHOONEES, A.; NGUYEN, K. A. *et al.* Low-carbohydrate versus balanced-carbohydrate diets for reducing weight and cardiovascular risk. **Cochrane Database Syst Rev**, 1, n. 1, p. CD013334, Jan 28 2022.

NEVES, A. L.; COELHO, J.; COUTO, L.; LEITE-MOREIRA, A. *et al.* Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. **J Mol Endocrinol**, 51, n. 2, p. R51-64, Oct 2013.

NOGAL, A.; VALDES, A. M.; MENNI, C. The role of short-chain fatty acids in the interplay between gut microbiota and diet in cardio-metabolic health. **Gut Microbes**, 13, n. 1, p. 1-24, 2021.

NONOGAKI, K. Editorial: Insights in obesity: 2023. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 15, p. 1489087, 2024.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. *Obesidade e sobrepeso: impactos econômicos globais em 2022.* Washington, D.C.: OPAS, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/>. Acesso em: 04 dez. 2025.

OKUNOGBE, A.; NUGENT, R.; SPENCER, G.; POWIS, J. *et al.* Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for 161 countries. **BMJ Glob Health**, 7, n. 9, Sep 2022.

OLEJNIK, A.; KOWALSKA, K.; KIDÓN, M.; CZAPSKI, J. *et al.* Purple carrot anthocyanins suppress lipopolysaccharide-induced inflammation in the co-culture of intestinal Caco-2 and macrophage RAW264.7 cells. **Food Funct**, 7, n. 1, p. 557-564, Jan 2016.

OLIVEIRA, A. G.; CARVALHO, B. M.; TOBAR, N.; ROPELLE, E. R. *et al.* Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. **Diabetes**, 60, n. 3, p. 784-796, Mar 2011.

ONO, H. Molecular Mechanisms of Hypothalamic Insulin Resistance. **Int J Mol Sci**, 20, n. 6, Mar 15 2019.

OPIO, J.; CROKER, E.; ODONGO, G. S.; ATTIA, J. *et al.* Metabolically healthy overweight/obesity are associated with increased risk of cardiovascular disease in adults, even in the absence of metabolic risk factors: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **Obes Rev**, 21, n. 12, p. e13127, Dec 2020.

PARADA VENEGAS, D.; DE LA FUENTE, M. K.; LANDSKRON, G.; GONZÁLEZ, M. J. *et al.* Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Front Immunol**, 10, p. 277, 2019.

PARK, H. Y.; KUNITAKE, Y.; HIRASAKI, N.; TANAKA, M. *et al.* Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. **Biosci Biotechnol Biochem**, 79, n. 1, p. 130-137, 2015.

PEPE, G.; CORICA, D.; CURRÒ, M.; AVERSA, T. *et al.* Fasting and meal-related zonulin serum levels in a large cohort of obese children and adolescents. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 15, p. 1329363, 2024.

PICON-RUIZ, M.; MORATA-TARIFA, C.; VALLE-GOFFIN, J. J.; FRIEDMAN, E. R. *et al.* Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **CA Cancer J Clin**, 67, n. 5, p. 378-397, Sep 2017.

- PORRAS, D.; NISTAL, E.; MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; PISONERO-VAQUERO, S. *et al.* Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation. **Free Radic Biol Med**, 102, p. 188-202, Jan 2017.
- PUTRA, I. G. N. E.; DALY, M.; SUTIN, A.; STEPTOE, A. *et al.* Obesity, psychological well-being related measures, and risk of seven non-communicable diseases: evidence from longitudinal studies of UK and US older adults. **Int J Obes (Lond)**, 48, n. 9, p. 1283-1291, Sep 2024.
- RAZA, M. M.; NJIDEAKA-KEVIN, T.; POLO, J.; AZIMUDDIN, K. Long-Term Outcomes of Bariatric Surgery: A Systematic Review. **Cureus**, 15, n. 5, p. e39638, May 2023.
- REMENYIK, J.; BIRÓ, A.; KLUSÓCZKI, Á.; JUHÁSZ, K. Z.; SZENDI-SZATMÁRI, T.; KENESEI, Á.; SZÖLLŐSI, E.; VASVÁRI, G.; STÜNDL, L.; FENYVESI, F.; VÁRADI, J.; MARKOVICS, A. *Comparison of the Modulating Effect of Anthocyanin-Rich Sour Cherry Extract on Occludin and ZO-1 on Caco-2 and HUVEC Cultures. International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 16, p. 9036, 2022. DOI: 10.3390/ijms23169036.
- RIBEIRO, M. G. C.; KRAVCHYCHYN, A. C. P.; BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H. H. M. Adiposity and inflammation markers explain mostly part of the plasma zonulin variation in Brazilian adults with overweight/obesity: A cross-sectional analysis from Brazilian nuts study. **Clin Nutr**, 45, p. 22-30, Feb 2025.
- RIEDEL, S.; PHEIFFER, C.; JOHNSON, R.; LOUW, J. *et al.* Intestinal Barrier Function and Immune Homeostasis Are Missing Links in Obesity and Type 2 Diabetes Development. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 12, p. 833544, 2021.
- ROM, O.; AVIRAM, M. Endogenous or exogenous antioxidants vs. pro-oxidants in macrophage atherogenicity. **Curr Opin Lipidol**, 27, n. 2, p. 204-206, Apr 2016.
- ROSENDO-SILVA, D.; VIANA, S.; CARVALHO, E.; REIS, F. *et al.* Are gut dysbiosis, barrier disruption, and endotoxemia related to adipose tissue dysfunction in metabolic disorders? Overview of the mechanisms involved. **Intern Emerg Med**, 18, n. 5, p. 1287-1302, Aug 2023.
- RUY, C. C.; SANTOS, T. W. D.; PEREIRA, Q. C.; RIBEIRO, M. L. Anthocyanins Modulation of Gut Microbiota to Reverse Obesity-Driven Inflammation and Insulin Resistance. **Nutrients**, 17, n. 23, Nov 27 2025.
- RÉGNIER, M.; VAN HUL, M.; KNAUF, C.; CANI, P. D. Gut microbiome, endocrine control of gut barrier function and metabolic diseases. **J Endocrinol**, 248, n. 2, p. R67-R82, Feb 2021.
- SACHS, J. D.; KARIM, S. S. A.; AKNIN, L.; ALLEN, J. *et al.* The Lancet Commission on lessons for the future from the COVID-19 pandemic. **Lancet**, 400, n. 10359, p. 1224-1280, Oct 08 2022.
- SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, 148, n. 5, p. 852-871, Mar 02 2012.
- SANG, X.; WANG, Q.; NING, Y.; WANG, H. *et al.* Age-Related Mucus Barrier Dysfunction in Mice Is Related to the Changes in Muc2 Mucin in the Colon. **Nutrients**, 15, n. 8, Apr 11 2023.
- SANTOS, J. C.; GOTARDO, E. M.; BRIANTI, M. T.; PIRAE, M. *et al.* Effects of yerba maté, a plant extract formulation ("YGD") and resveratrol in 3T3-L1 adipogenesis. **Molecules**, 19, n. 10, p. 16909-16924, Oct 21 2014.

SASAKI, R.; NISHIMURA, N.; HOSHINO, H.; ISA, Y. *et al.* Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. **Biochem Pharmacol**, 74, n. 11, p. 1619-1627, Dec 03 2007.

SAULITE, L.; JEKABSONS, K.; KLAVINS, M.; MUCENIECE, R. *et al.* Effects of malvidin, cyanidin and delphinidin on human adipose mesenchymal stem cell differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. **Phytomedicine**, 53, p. 86-95, Feb 2019.

SCAZZOCCHIO, B.; VARI, R.; FILESI, C.; D'ARCHIVIO, M. *et al.* Cyanidin-3-O- β -glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPAR γ activity in human omental adipocytes. **Diabetes**, 60, n. 9, p. 2234-2244, Sep 2011.

SCHETHAUER, T. P. M.; RAMPANELLI, E.; NIEUWDORP, M.; VALLANCE, B. A. *et al.* Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. **Front Immunol**, 11, p. 571731, 2020.

SCHULZE, M. B.; STEFAN, N. Metabolically healthy obesity: from epidemiology and mechanisms to clinical implications. **Nat Rev Endocrinol**, 20, n. 11, p. 633-646, Nov 2024.

SEO, K.; SEO, J.; YEUN, J.; CHOI, H. *et al.* The role of mucosal barriers in human gut health. **Arch Pharm Res**, 44, n. 4, p. 325-341, Apr 2021.

SHEIKH, M. Y.; YOUNUS, M. F.; SHERGILL, A.; HASAN, M. N. Diet and Lifestyle Interventions in Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: A Comprehensive Review. **Int J Mol Sci**, 26, n. 19, Oct 02 2025.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 2006. DOI: 10.1172/JCI28898.

SHEPHERD, P. R.; KAHN, B. B. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **N Engl J Med**, 341, n. 4, p. 248-257, Jul 22 1999.

SINGH, V.; SUN, J.; CHENG, S.; KWAN, A. C. *et al.* Obesity as a Chronic Disease: A Narrative Review of Evolving Definitions, Management Strategies, and Cardiometabolic Prioritization. **Adv Ther**, 42, n. 11, p. 5341-5364, Nov 2025.

SIVAMARUTHI, B. S.; KESIKA, P.; CHAIYASUT, C. The Influence of Supplementation of Anthocyanins on Obesity-Associated Comorbidities: A Concise Review. **Foods**, 9, n. 6, May 26 2020.

SONG, W.; YUAN, Q.; WANG, Y.; MAI, M. *et al.* Anthocyanin supplementation improves obesity-related inflammatory characteristics: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutr Res**, 116, p. 1-11, Aug 2023.

SONG, W.; YUAN, Q.; WANG, Y.; MAI, M. *et al.* Corrigendum to "Anthocyanin supplementation improves obesity-related inflammatory characteristics: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials" [Nutrition Research 2023;116:1-11]. **Nutr Res**, 123, p. 1-3, Mar 2024.

SONG, Y.; ZHOU, Y.; FENG, X.; FU, J. *et al.* The global death and disability burden associated with a high BMI in children and adolescents, 1990-2019. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 15, p. 1463002, 2024.

- SPECIALE, A.; MOLONIA, M. S.; MUSCARÀ, C.; CRISTANI, M. *et al.* An overview on the cellular mechanisms of anthocyanins in maintaining intestinal integrity and function. **Fitoterapia**, 175, p. 105953, Jun 2024.
- STULL, A. J.; CASH, K. C.; JOHNSON, W. D.; CHAMPAGNE, C. M. *et al.* Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. **J Nutr**, 140, n. 10, p. 1764-1768, Oct 2010.
- TAN, J.; LI, Y.; HOU, D. X.; WU, S. The Effects and Mechanisms of Cyanidin-3-Glucoside and Its Phenolic Metabolites in Maintaining Intestinal Integrity. **Antioxidants (Basel)**, 8, n. 10, Oct 12 2019.
- TANG, J.; XU, L.; ZENG, Y.; GONG, F. Effect of gut microbiota on LPS-induced acute lung injury by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Int Immunopharmacol**, 91, p. 107272, Feb 2021.
- TENDA, E. D.; HENRINA, J.; SETIADHARMA, A.; FELIX, I. *et al.* The impact of body mass index on mortality in COPD: an updated dose-response meta-analysis. **Eur Respir Rev**, 33, n. 174, Oct 2024.
- THILAVECH, T.; ADISAKWATTANA, S. Cyanidin-3-rutinoside acts as a natural inhibitor of intestinal lipid digestion and absorption. **BMC Complement Altern Med**, 19, n. 1, p. 242, Sep 5 2019.
- TIAN, B.; ZHAO, J.; ZHANG, M.; CHEN, Z. *et al.* Lycium ruthenicum Anthocyanins Attenuate High-Fat Diet-Induced Colonic Barrier Dysfunction and Inflammation in Mice by Modulating the Gut Microbiota. **Mol Nutr Food Res**, 65, n. 8, p. e2000745, Apr 2021.
- TIAN, L.; NING, H.; SHAO, W.; SONG, Z. *et al.* Dietary Cyanidin-3-Glucoside Attenuates High-Fat-Diet-Induced Body-Weight Gain and Impairment of Glucose Tolerance in Mice via Effects on the Hepatic Hormone FGF21. **J Nutr**, 150, n. 8, p. 2101-2111, Aug 01 2020.
- TILG, H.; ZMORA, N.; ADOLPH, T. E.; ELINAV, E. The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 1, p. 40-54, Jan 2020.
- TIMOFTE, D. V.; TUDOR, R. C.; MOCANU, V.; LABUSCA, L. Obesity, Osteoarthritis, and Myokines: Balancing Weight Management Strategies, Myokine Regulation, and Muscle Health. **Nutrients**, 16, n. 23, Dec 07 2024.
- TONG, B.; ZHANG, Z.; LI, X.; LIU, J. *et al.* FUNDC1 modulates mitochondrial defects and pancreatic β -cell dysfunction under lipotoxicity. **Biochem Biophys Res Commun**, 672, p. 54-64, Sep 10 2023.
- TSUDA, T. Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. **J Agric Food Chem**, 56, n. 3, p. 642-646, Feb 13 2008.
- VALDEZ, J. C.; BOLLING, B. W. Anthocyanins and intestinal barrier function: a review. *Journal of Food Bioactives*, v. 5, p. 18–30, 2019. DOI: 10.31665/JFB.2019.5175.
- VALENTI, L.; RISO, P.; MAZZOCCHI, A.; PORRINI, M. *et al.* Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. **Oxid Med Cell Longev**, 2013, p. 145421, 2013.
- VAN DE WOUW, M.; SCHELLEKENS, H.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite. **J Nutr**, 147, n. 5, p. 727-745, May 2017.

- VEREDIANO, T. A.; STAMPINI DUARTE MARTINO, H.; DIAS PAES, M. C.; TAKO, E. Effects of Anthocyanin on Intestinal Health: A Systematic Review. **Nutrients**, 13, n. 4, Apr 17 2021.
- VIRDIS, A. Endothelial Dysfunction in Obesity: Role of Inflammation. **High Blood Press Cardiovasc Prev**, 23, n. 2, p. 83-85, Jun 2016.
- VIRDIS, A.; COLUCCI, R.; BERNARDINI, N.; BLANDIZZI, C. *et al.* Microvascular Endothelial Dysfunction in Human Obesity: Role of TNF- α . **J Clin Endocrinol Metab**, 104, n. 2, p. 341-348, Feb 01 2019.
- WANG, H. Y.; WANG, H.; WANG, J. H.; WANG, Q. *et al.* Protocatechuic Acid Inhibits Inflammatory Responses in LPS-Stimulated BV2 Microglia via NF- κ B and MAPKs Signaling Pathways. **Neurochem Res**, 40, n. 8, p. 1655-1660, Aug 2015.
- WANG, L.; WANG, Q.; XIONG, Y.; SHI, W. *et al.* Obesity and Its Comorbidities: Current Treatment Options, Emerging Biological Mechanisms, Future Perspectives and Challenges. **Diabetes Metab Syndr Obes**, 18, p. 3427-3445, 2025.
- WANG, R.; LIN, Z.; HE, M.; LIAO, Y. *et al.* The role of gut microbiota in Tirzepatide-mediated alleviation of high-fat diet-induced obesity. **Eur J Pharmacol**, 1002, p. 177827, Sep 05 2025.
- WEI, D.; GONZÁLEZ-MARRACHELLI, V.; MELGAREJO, J. D.; LIAO, C. T. *et al.* Cardiovascular risk of metabolically healthy obesity in two european populations: Prevention potential from a metabolomic study. **Cardiovasc Diabetol**, 22, n. 1, p. 82, Apr 07 2023.
- WU, X. X.; HUANG, X. L.; CHEN, R. R.; LI, T. *et al.* Paeoniflorin Prevents Intestinal Barrier Disruption and Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Caco-2 Cell Monolayers. **Inflammation**, 42, n. 6, p. 2215-2225, Dec 2019.
- XIAO, J.; DONG, L. W.; LIU, S.; MENG, F. H. *et al.* Bile acids-mediated intracellular cholesterol transport promotes intestinal cholesterol absorption and NPC1L1 recycling. **Nat Commun**, 14, n. 1, p. 6469, Oct 13 2023.
- XU, L.; YAN, X.; ZHAO, Y.; WANG, J. *et al.* Macrophage Polarization Mediated by Mitochondrial Dysfunction Induces Adipose Tissue Inflammation in Obesity. **Int J Mol Sci**, 23, n. 16, Aug 17 2022.
- YAMADA, T.; KIMURA-KOYANAGI, M.; SAKAGUCHI, K.; OGAWA, W. *et al.* Obesity and risk for its comorbidities diabetes, hypertension, and dyslipidemia in Japanese individuals aged 65 years. **Sci Rep**, 13, n. 1, p. 2346, Feb 09 2023.
- YILDIZ, E.; GULDAS, M.; *et al.* Obesity-associated pathways of anthocyanins. *Food Science and Technology* (ou periódico equivalente indexado), 2020.
- YE, L.; LIANG, S.; GUO, C.; YU, X. *et al.* Inhibition of M1 macrophage activation in adipose tissue by berberine improves insulin resistance. **Life Sci**, 166, p. 82-91, Dec 01 2016.
- YOUNOSSI, Z. M.; KALLIGEROS, M.; HENRY, L. Epidemiology of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. **Clin Mol Hepatol**, 31, n. Suppl, p. S32-S50, Feb 2025.
- YU, S.; ZHU, X.; ZHAO, X.; LI, Y. *et al.* Improvement of chronic metabolic inflammation and regulation of gut homeostasis: Tea as a potential therapy. **Pharmacol Ther**, 269, p. 108828, May 2025.

- ZECHNER, R.; STRAUSS, J.; FRANK, S.; WAGNER, E. *et al.* The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 24 Suppl 4, p. S53-56, Nov 2000.
- ZEMBIC, A.; ECKEL, N.; STEFAN, N.; BAUDRY, J. *et al.* An Empirically Derived Definition of Metabolically Healthy Obesity Based on Risk of Cardiovascular and Total Mortality. **JAMA Netw Open**, 4, n. 5, p. e218505, May 03 2021.
- ZHANG, R.; LIU, W.; ZENG, J.; MENG, J. *et al.* Niemann-Pick C1-Like 1 inhibitors for reducing cholesterol absorption. **Eur J Med Chem**, 230, p. 114111, Feb 15 2022.
- ZHANG, X.; LIU, J.; NI, Y.; YI, C. *et al.* Global Prevalence of Overweight and Obesity in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-Analysis. **JAMA Pediatr**, 178, n. 8, p. 800-813, Aug 01 2024.
- ZHANG, X.; YE, Q.; GONG, D.; LV, Y. *et al.* Apelin-13 inhibits lipoprotein lipase expression via the APJ/PKC α /miR-361-5p signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 49, n. 6, p. 530-540, Jun 01 2017.
- ZHANG, X.; ZHU, J.; KIM, J. H.; SUMERLIN, T. S. *et al.* Metabolic health and adiposity transitions and risks of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: a systematic review and meta-analysis. **Diabetol Metab Syndr**, 15, n. 1, p. 60, Mar 28 2023.
- ZHANG, Y.; CHANG, H.; SHAO, S.; ZHAO, L. *et al.* Anthocyanins from. **Biology (Basel)**, 11, n. 10, Oct 14 2022.
- ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Res**, 30, n. 6, p. 492-506, Jun 2020.
- ZHENG, H.; SECHI, L. A.; NAVARESE, E. P.; CASU, G. *et al.* Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and cardiovascular risk: a comprehensive review. **Cardiovasc Diabetol**, 23, n. 1, p. 346, Sep 28 2024.
- ZHOU, Z.; MACPHERSON, J.; GRAY, S. R.; GILL, J. M. R. *et al.* Are people with metabolically healthy obesity really healthy? A prospective cohort study of 381,363 UK Biobank participants. **Diabetologia**, 64, n. 9, p. 1963-1972, Sep 2021.
- ZORRAQUÍN-PEÑA, I.; TALADRID, D.; TAMARGO, A.; SILVA, M. *et al.* Effects of Wine and Its Microbial-Derived Metabolites on Intestinal Permeability Using Simulated Gastrointestinal Digestion/Colonic Fermentation and Caco-2 Intestinal Cell Models. **Microorganisms**, 9, n. 7, Jun 24 2021.
- ZUNIGA, M. C.; RAGHURAMAN, G.; HITCHNER, E.; WEYAND, C. *et al.* PKC-epsilon and TLR4 synergistically regulate resistin-mediated inflammation in human macrophages. **Atherosclerosis**, 259, p. 51-59, Apr 2017.