

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Efeitos regulatórios da tangeritina e
heptametoxiflavona em camundongos
alimentados com dieta hiperlipídica**

Marina Nery da Silva

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências
Nutricionais

Orientadora: Prof^a Dr^a Thais Borges
César

Araraquara

2017

Efeitos regulatórios da tangeritina e heptametoxiflavona em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

Marina Nery da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Orientadora: Prof^a Dr^a Thais Borges César

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S586e Silva, Marina Nery da
Efeitos regulatórios da tangeritina e heptametoxiflavona em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Marina Nery da Silva. – Araraquara, 2017.
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição.
Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Ciências Nutricionais.

Orientadora: Thais Borges César.

1. Flavonoides cítricos. 2. Tangeritina. 3. Heptametoxiflavona. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Obesidade.
6. Síndrome metabólica. I. César, Thais Borges, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

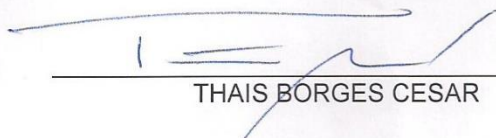
MARINA NERY DA SILVA

Efeitos regulatórios da tangeritina e heptametoxiflavona em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica

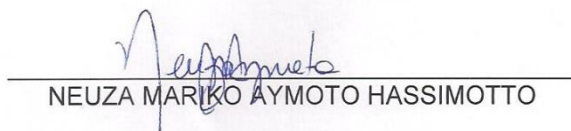
Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição

Araraquara, 06 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA



THAIS BORGES CESAR



NEUZA MARIKO AYMOTO HASSIMOTTO



AMANDA MARTINS BAVIERA

Dedico este trabalho à minha mãe, Isabel, ao meu pai, Manoel, à minha irmã, Ana Clara, ao meu irmão, Francisco e ao meu companheiro, Guilherme. Dedico também a todas as pessoas de minha família, amigas e amigos que me apoiaram nessa trajetória e fizeram dela o mais leve e gratificante possível. E por fim, dedico este trabalho à todas as mulheres que fazem ciência: que usemos sempre adentrar o desconhecido.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Thais Borges César, pela orientação, dedicação e carinho.

À doutoranda Paula Souza Ferreira, pela paciência, companheirismo, ajuda e ensinamentos em toda trajetória do mestrado.

À Carolina B. Ribeiro, Melaine P. Fidelix, Marília Martini, Danielle Gonçalves, Olívia Ponce e Renata Benassi, pela ajuda na execução do experimento e pela amizade.

À estudante de iniciação científica Bruna Rodrigues, pelo auxílio com a manutenção dos animais.

Ao John Manthey, pesquisador da USDA Fort Pierce (USA) e a Dra. Danielle R. Gonçalves (UNESP Araraquara), pelos compostos utilizados no experimento.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidório e ao técnico José Antônio Sampaio Zuanon, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, pelas análises histológicas e pela paciência.

Ao Sérgio Valladão do Laboratório de Análises Clínicas São Lucas (Araraquara, SP), pelas análises bioquímicas e pela ajuda.

À técnica Ana Lúcia Nasser, pela ajuda com as análises de estresse oxidativo.

Às Profa. Dra. Katia Sivieri e técnica Adriana Cristina Marchese Zavarizi, por conceder o laboratório e auxiliar no preparo de materiais utilizados no experimento.

Ao Carlos Alberto Arcaro Filho, doutorando em Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pelas técnicas ensinadas e por toda atenção.

Às professoras integrantes da comissão examinadora, pelas sugestões ao trabalho.

Aos docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição, pelos ensinamentos.

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, pela paciência e disponibilidade.

Aos funcionários e funcionárias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e da UNESP, pela dedicação e disponibilidade.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

“Na vida, nada deve ser temido; deve apenas ser compreendido”

Marie Curie

Resumo

Objetivo: Avaliar efeitos regulatórios da tangeritina e heptametoxiflavona sobre perfil bioquímico, inflamação e estresse oxidativo de camundongos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica. **Métodos:** 50 camundongos C57BL/6J machos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: Controle, alimentados com dieta padrão (n=10); DH, alimentados apenas com dieta hiperlipídica (n=10); TAN, alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com tangeritina (n=15); e HMF, alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com heptametoxiflavona. Nas primeiras quatro semanas foi realizada indução da obesidade e os animais receberam apenas dieta padrão (9,5% kcal gordura) ou dieta hiperlipídica (45% kcal gordura). Após esse período, nas quatro semanas seguintes, os grupos TAN e HMF receberam dieta hiperlipídica com seus respectivos suplementos na dose de 100mg/kg, e os demais grupos continuaram a receber suas referidas dietas. Ao fim da oitava semana, os animais foram eutanasiados por exsanguinação total via punção cardíaca, e foram coletados sangue e órgãos para posteriores análises de perfil bioquímico, citocinas inflamatórias, marcadores de estresse oxidativo e histologia. **Resultados:** Tangeritina e heptametoxiflavona diminuíram os níveis séricos de glicose, leptina e resistina, e do índice HOMA-IR ($p < 0.05$). Os níveis de TBARS também foram menores nos grupos suplementados em comparação ao grupo alimentado com dieta hiperlipídica não suplementada ($p < 0,05$). Em adição, a tangeritina reduziu o tamanho do adipócito ($p < 0.05$) e a heptametoxiflavona diminuiu a acumulação de gordura no tecido hepático ($p < 0,05$). **Conclusão:** A suplementação com tangeritina e heptametoxiflavona indicou potencial efeito protetor de danos metabólicos causados pelo consumo de dieta hiperlipídica, evidenciado pela melhora de parâmetros relacionados a resistência insulínica e estresse oxidativo, podendo auxiliar na prevenção de alterações associadas à obesidade, como o desenvolvimento de diabetes mellitus e síndrome metabólica. **Palavras-chave:** flavonoides cítricos; tangeritina; heptametoxiflavona; dieta hiperlipídica; obesidade; síndrome metabólica.

Abstract

Objective: To evaluate the regulatory effects of tangeretin and heptamethoxyflavone on biochemical profile, inflammation and oxidative stress of mice induced obesity by a high-fat diet. **Methods:** 50 male C57BL / 6J mice were randomly divided into 4 groups: Control, fed standard diet (n = 10); DH, fed only high-fat diet (n = 10); TAN, fed high-fat diet and supplemented with tangeretin (n = 15); HMF, fed high-fat diet and supplemented with heptamethoxyflavone. In the first four weeks, obesity induction was performed and the animals received only standard diet (9.5% kcal fat) or high-fat diet (45% kcal fat). After this period, in the following four weeks, the groups TAN and HMF received high-fat diet with their respective supplements in the dose of 100mg/kg, and the other groups continued to receive their referred diets. At the end of the eighth week, the mice were euthanized by total exsanguination via cardiac puncture, and blood and organs were collected for further analysis of biochemical profile, inflammatory cytokines, oxidative stress markers and histology. **Results:** Tangeretin and heptamethoxyflavone decreased serum levels of glucose, leptin and resistin, and the HOMA-IR index ($p < 0.05$). The TBARS levels were also lower in the supplemented groups compared to the group fed a not supplemented high-fat diet ($p < 0.05$). In addition, tangeretin reduced adipocyte size ($p < 0.05$) and heptamethoxyflavone decreased fat accumulation in hepatic tissue ($p < 0.05$). **Conclusion:** Supplementation with tangeretin and heptamethoxyflavone indicated a potential protective effect of metabolic damages caused by the consumption of high-fat diet, evidenced by the improvement of parameters related to insulin resistance and oxidative stress, and may help to prevent obesity-related alterations such as the development of diabetes mellitus and metabolic syndrome. **Keywords:** citrus flavonoids; tangeretin; heptamethoxyflavone; high-fat diet; obesity; metabolic syndrome

Sumário

	Página
Resumo	VIII
Abstract	IX
Introdução	11
Capítulo	22
Capítulo 1. Tangeretin and heptamethoxyflavone decrease insulin resistance, fat accumulation and oxidative stress in mice fed high-fat diet	23
Resumo	25
Introdução	26
Métodos	27
Resultados	30
Discussão	31
Conclusão	35
Referências	35
Considerações finais	47
Referências	48
Anexos	54

INTRODUÇÃO

Estudos atuais têm mostrado que o consumo de dietas desbalanceadas e muito ricas em gorduras alteram o metabolismo de glicose e lipídeos e, em associação ao sedentarismo, podem levar ao aumento da obesidade em muitas populações^{1,2}. Dentro deste quadro, o excesso de gordura abdominal tem sido relacionado ao desenvolvimento de Síndrome Metabólica, um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência insulínica. De acordo com o US National Heart, Lung and Blood Institute e o American Heart Association (NHLBI/AHA), o conjunto de três ou mais das características cardiometabólicas listadas abaixo caracterizam a Síndrome Metabólica³:

- obesidade abdominal >102cm em homens e >88cm em mulheres
- triglicerídeos >150mg/dL
- HDL-colesterol <40mg/dL em homens e <50mg/dL em mulheres
- pressão sanguínea $\geq 130/\geq 85$ mmHg
- glicemia de jejum >110mg/dL

O desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo II e de doenças cardiovasculares está relacionado a fatores de risco da Síndrome Metabólica, como hiperglicemia e hipertrigliceridemia⁴. A resistência insulínica também é uma das manifestações observadas no diabetes tipo II e na síndrome metabólica. Nesse estado metabólico, a ação da insulina em tecidos alvo é prejudicada, resultando em hiperglicemia⁵.

Em condições normais, os lipídeos provenientes da dieta entram na circulação na forma de quilomícrons, que contêm triglicerídeos (TG). No estado

pós-prandial, quando os níveis de insulina estão elevados, ocorre aumento da atividade da lipase lipoproteica, havendo hidrólise dos TG e liberação de ácidos graxos livres (AGL) das lipoproteínas. Os AGL são capturados pelos adipócitos, sendo estocados na forma de TG no tecido adiposo. No jejum, quando os níveis de insulina diminuem, ocorre lipólise/hidrólise dos TG do tecido adiposo pela lipase hormônio sensível, com consequente liberação de AGL⁵. Na ingestão de dietas ricas em gordura, há excesso de ácidos graxos saturados na circulação, sendo que os altos níveis de ácidos graxos circulantes podem induzir a inflamação e estresse oxidativo, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, a atividade de NFκB e a expressão de COX-2 por meio do TLR-4⁶.

O tecido adiposo é composto principalmente por adipócitos, além de células endoteliais, fibroblastos, leucócitos e macrófagos. Além de funcionar como estoque energético, este tecido é responsável pela produção de diversas citocinas inflamatórias, como TNF-α, interleucinas, leptina, adiponectina, resistina e PAI-1, sendo, portanto, considerado um importante órgão endócrino. Essas citocinas atuam tanto em processos inflamatórios e imunes como na regulação da homeostase energética^{7,8}.

Normalmente, o tecido adiposo é um órgão bem vascularizado e innervado. Entretanto, na obesidade ocorre grande acúmulo de triglicerídeos nas células adiposas, fazendo com que estas se expandam. Essa hipertrofia leva à diminuição do fluxo sanguíneo no tecido adiposo, causando hipóxia tecidual e consequente apoptose de adipócitos. Nestas condições, ocorre secreção de CCL2 e outras quimioquinas, aumentando a infiltração de macrófagos no tecido para sequestrar os detritos celulares. Juntamente com os adipócitos, os macrófagos ativos perpetuam um ciclo vicioso de produção de citocinas pró-

inflamatórias e liberação de ácidos graxos livres. Dessa maneira, a obesidade é considerada uma inflamação crônica sistêmica de baixa intensidade^{7,9}.

A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória produzida pelos adipócitos, que pode aumentar a produção de IL-10 e diminuir a produção de INF- γ . Essa citocina também é considerada anti-aterogênica por inibir a adesão de monócitos no endotélio vascular, prevenindo a formação de placas ateroscleróticas. Em condições normais, a adiponectina está relacionada à oxidação de ácidos graxos no músculo e fígado, e à redução da hiperglicemia pós-prandial. Assim, ela aumenta a sensibilidade à insulina e auxilia na regulação da homeostase energética. No entanto, em indivíduos obesos, a adiponectina é encontrada em níveis reduzidos, pois sua transcrição pode ser suprimida por marcadores pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-6^{7,8,9,10}.

A resistina, por sua vez, é uma citocina pró-inflamatória que tem sido relacionada à obesidade e resistência insulínica. Em roedores, a resistina é produzida pelos adipócitos, enquanto em humanos é secretada predominantemente por macrófagos. Em camundongos com resistência insulínica, observa-se altos níveis de resistina, TNF- α , IL-6 e MCP-1, além de apoptose de células β -pancreáticas. Em animais obesos, a correção dos níveis de resistina melhora a tolerância à glicose e aumenta a sensibilidade à insulina^{11,12,13}.

A leptina é uma citocina responsável pelo controle do apetite e sua secreção pelos adipócitos ocorre em proporção direta ao estoque energético no tecido adiposo. Dessa forma, observa-se um aumento nos níveis de leptina em pacientes obesos. Esse excesso de leptina circulante, em associação ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, diminui a ação efetiva dessa citocina,

podendo acarretar em resistência à leptina e distúrbios relacionados à saciedade. A leptina tem caráter pró-inflamatório e pode aumentar a produção de TNF- α , IL-6 e IL-12. Além disso, a leptina estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos neutrófilos, contribuindo para o estado pró-oxidativo na obesidade^{7, 10}.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma proteína transmembrana liberada principalmente por macrófagos, altamente expressa no tecido adiposo branco, e que está relacionada à inflamação sistêmica e local. O TNF- α pode diminuir a expressão de PPAR- γ , interferindo na expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose. Além disso, o TNF- α pode inibir a atividade do substrato receptor de insulina 1 (IRS-1) no tecido adiposo e músculo, diminuindo a translocação do transportador de glicose GLUT-4, o que pode desencadear resistência insulínica^{5,9,10}.

A interleucina 6 (IL-6) é sintetizada principalmente por adipócitos e é considerada pró-inflamatória. Essa citocina pode inibir a atividade da lipoproteína lipase (LPL) e maturação de pré-adipócitos. Níveis elevados de IL-6 são associados à obesidade e resistência insulínica, e sua neutralização pode reduzir a resistência insulínica em camundongos^{7,10}. Por outro lado, a interleucina 10 (IL-10) é considerada anti-inflamatória, sendo secretada por vários tipos celulares, como macrófagos e células T e B. Juntamente com a adiponectina, a IL-10 pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-2, INF- γ e TNF- α ⁸.

A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) é considerada um marcador de inflamação sistêmica e estresse oxidativo. Altas concentrações de ácidos graxos nos adipócitos aumentam a expressão de MCP-1 e de derivados

da peroxidação lipídica, como o malondialdeído, atraindo macrófagos para o tecido adiposo. A peroxidação lipídica diz respeito à degradação oxidativa de lipídeos e pode ser iniciada por espécies reativas de oxigênio (ROS)¹⁴.

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de radicais livres, como as ROS, e a sua eliminação por sistemas antioxidantes. Na obesidade, o excesso de ácidos graxos livres aumenta a atividade da NADPH oxidase e diminui a atividade de enzimas antioxidantes, aumentando a geração de ROS. Estas espécies reativas, por sua vez, aumentam a expressão de NADPH oxidase, criando um ciclo vicioso de geração de estresse oxidativo a nível local e sistêmico. Esse ambiente oxidativo desregula a produção de citocinas, elevando os níveis de TNF- α , MCP-1 e PAI-1¹⁵. Além disso, o excesso de radicais livres pode prejudicar o recrutamento e diferenciação de células adiposas, impedindo a expansão do tecido adiposo. Isso pode dificultar o armazenamento de triglicerídeos nesse tecido e aumentar a deposição de ácidos graxos em órgãos insulino dependentes, como o fígado e pâncreas¹⁶.

No fígado, o excesso de lipídeos dietéticos pode levar ao desenvolvimento da doença do fígado gorduroso não alcoólico (nonalcoholic fatty liver disease – NAFLD). A NAFLD é caracterizada por um acúmulo de triglicerídeos no fígado, resultando em esteatose e inflamação hepática. Em condições normais, a insulina age no fígado suprimindo a produção de glicose através da inibição da gliconeogênese e glicogenólise, além de promover a síntese de glicogênio e a lipogênese. Dessa maneira, a ação da insulina no fígado é essencial para manter a homeostase energética por meio da regulação do metabolismo de glicose e lipídeos. Entretanto, na resistência insulínica, a insulina perde a capacidade de suprimir a produção de glicose hepática, deixando de regular o metabolismo de

glicose e lipídeos, e acarretando em hiperglicemia, dislipidemias e esteatose hepática. A resistência insulínica ocorre na maior parte dos pacientes com NAFLD e a incidência dessa doença tem crescido juntamente com a pandemia de obesidade e síndrome metabólica^{17,18}.

Enquanto dietas ricas em lipídeos são associadas ao aumento do estresse oxidativo e inflamação, estudos têm mostrado que compostos, como flavonoides, podem diminuir os danos causados pela ingestão excessiva de gordura. Flavonoides são moléculas polifenólicas presentes em frutas e vegetais, divididas em diversas classes, incluindo flavanonas, flavonas e flavonols, que apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O consumo de dietas ricas em flavonoides tem sido associado a prevenção de diabetes tipo II, câncer, desordens neurodegenerativas e osteoporose. Além disso, esses compostos podem diminuir o risco de AVC, demonstrando seu potencial cardioprotetor^{19,20}.

As frutas cítricas estão entre as mais consumidas mundialmente, *in natura* ou em forma de suco, e são ricas em flavonoides cítricos. O consumo de suco de laranja integral tem sido associado à diminuição do risco de obesidade e à melhora de marcadores bioquímicos em humanos e modelos animais²¹. Um estudo recente de nosso grupo mostrou que o consumo de suco de laranja integral em pacientes obesos, associado a uma dieta de restrição alimentar, diminuiu o colesterol total, colesterol LDL, proteína C-reativa ultrasensível (PCR-us), insulina e índice HOMA-IR no soro sanguíneo, prevenindo a resistência insulínica²². Em outro estudo, o suco de laranja foi associado ao aumento da capacidade antioxidante e diminuição da inflamação e colesterol em pacientes com hepatite C, protegendo contra danos causados por essa

doença²³. Foi mostrado ainda que o consumo de suco de laranja vermelha, rico em flavonoides cítricos e licopeno, apresentou efeitos antioxidantes, anti-inflamatórias e hipolipemiantes, podendo prevenir o desenvolvimento de síndrome metabólica em humanos²⁴.

Dentre os flavonoides cítricos presentes nas frutas cítricas, as flavanonas são o grupo predominante, e incluem hesperidina, eriocitrina e naringina. Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com hesperidina e eriocitrina apresentaram aumento da capacidade antioxidante e diminuição dos níveis de IL-6, MCP-1 e PCR-us no soro sanguíneo. Assim, esses compostos protegeram contra a inflamação e o estresse oxidativo causados pelo consumo desta dieta²⁵. As flavonas são o segundo maior grupo de flavonoides encontrados nas frutas cítricas, e incluem diosmetina, luteolina e apigenina. A diosmetina tem apresentado atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer, benéficas à saúde humana²⁶.

Por fim, as polimetoxiflavonas (PMFs) são encontradas em quantidades menores que as flavanonas e flavonas, e estão presentes especialmente na casca das frutas cítricas, particularmente da laranja doce (*Citrus sinensis*) e da tangerina (*Citrus reticulata*). O termo PMF designa flavonas que contenham dois ou mais grupos metoxi em seu esqueleto pirona-benzoico básico (15 carbonos, C6-C3-C6) com um grupo carbonil na posição C4. As PMFs mais comuns são nobiletina e tangeritina e sua estrutura química é responsável por diversas propriedades biológicas de interesse farmacológico, como hipoglicêmica, hipolipidêmica e neuroprotetora^{27,28}.

A tangeritina tem sido amplamente estudada por suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes. Sua estrutura química é mostrada na Figura 1.

Estudo em ratos com danos renais mostrou que a tangeritina reduziu o estresse oxidativo por diminuir a formação de lipoperóxidos e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como GSH e GPx. Além disso, essa PMF restaurou níveis de IL-10 e diminuiu a expressão de NF-κB, demonstrando sua ação anti-inflamatória²⁹.

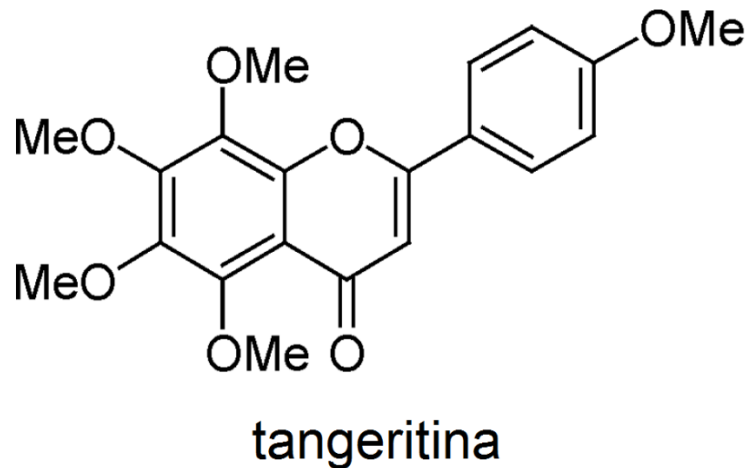
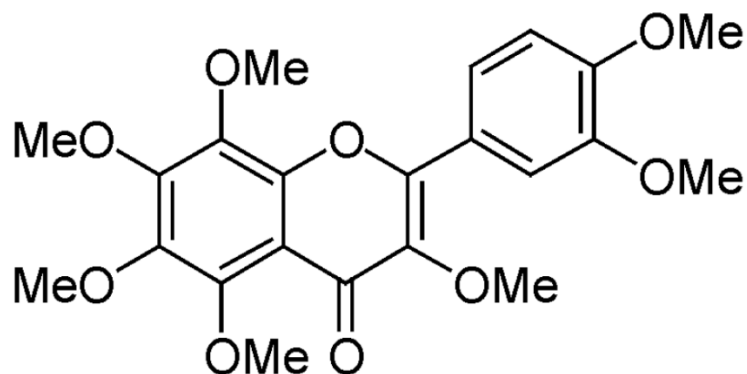


Figura 1. Estrutura química da tangeritina

Estudos tem explorado os benefícios da tangeritina na regulação do metabolismo de lipídeos e glicose. *In vitro*, a tangeritina diminuiu o acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos e facilitou a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, processo importante na formação do tecido adiposo e que evita a deposição lipídica em outros órgãos. Além disso, esse composto foi capaz de aumentar os níveis de adiponectina e diminuir a secreção de MCP-1^{30,31}. Em hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica, a tangeritina reduziu os níveis séricos de LDL e VLDL, sem causar efeitos tóxicos³². O tratamento com tangeritina reduziu ainda os níveis intracelulares de triglicerídeos e colesterol *in vitro*, possivelmente por modular a secreção de apo-B³³.

A tangeritina também tem sido estudada por seus efeitos antidiabéticos. Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, a tangeritina diminuiu o ganho de peso, o colesterol total e a secreção de leptina, resistina e MCP-1, além de aumentar os níveis de adiponectina e melhorar a tolerância a glicose. Ainda, foi mostrado *in vitro* que a tangeritina estimulou a captação de glicose por regular a ativação de AMPK³⁴. Em ratos diabéticos, o tratamento com tangeritina reduziu a glicemia, aumentou os níveis de insulina e normalizou o glicogênio hepático e os níveis de enzimas do metabolismo de carboidratos, como piruvato quinase, glicose-6-fosfatase e glicogênio sintase. Assim, mostrou-se que a tangeritina pode modular a atividade de enzimas hepáticas e melhorar a resistência insulínica associada à diabetes³⁵.

A heptametoxiflavona (HMF) é uma PMF menos explorada, que também possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Sua estrutura química é mostrada na Figura 2. A HMF tem sido estudada na prevenção de danos neurais em modelos animais. O tratamento com essa PMF protegeu contra a perda de memória e morte celular pós-isquemia cerebral em camundongos, e esses benefícios foram atribuídos ao potencial anti-inflamatórios desse composto^{36,37}. Os efeitos anti-inflamatórios da HMF também foram observados em ratos com edema, em que o tratamento com HMF reduziu a produção de TNF- α ³⁸. Um estudo com camundongos mostrou ainda a proteção de HMF contra a inflamação causada por perda óssea, comumente observada em doenças periodontais³⁹.



heptametoxiflavona

Figura 2. Estrutura química da heptametoxiflavona

Foi mostrado *in vitro* que a HMF reduziu a expressão de LDL-oxidado em macrófagos, podendo proteger contra a formação de placas ateroscleróticas⁴⁰. A HMF inibiu a produção de esteróis e óxido nítrico *in vitro* devido a sua ação anti-inflamatória e antioxidante, e em comparação a outras PMFs, foi a que apresentou maior atividade inibitória⁴¹. Outro estudo comparando PMFs também mostrou que a HMF foi o composto com maior atividade anticâncer *in vitro*³¹. No entanto, ainda não estão disponíveis estudos que avaliem os efeitos da heptametoxiflavona no metabolismo de glicose e lipídeos.

Para estudos sobre obesidade e distúrbios associados, camundongos da linhagem C57BL/6J são considerados um dos melhores modelos, pois após algumas semanas alimentados com dieta hiperlipídica estes animais desenvolvem diversas alterações típicas, como hiperglicemia e dislipidemias⁴².

Considerando os potenciais anti-inflamatórios e antioxidantes das polimetoxiflavonas, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos regulatórios da tangeritina e da heptametoxiflavona, separadamente, em camundongos C57BL/6J induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica. Nossa

hipótese foi que os tratamentos com tangeritina e heptametoxiflavona seriam eficientes na redução de danos metabólicos causados pela ingestão de uma dieta rica em lipídeos. Assim, esses compostos poderiam prevenir o desenvolvimento de resistência insulínica e diminuir os níveis de marcadores pró-inflamatórios nestes animais.

CAPÍTULO 1.

Tangeretin and heptamethoxyflavone decrease insulin resistance, fat accumulation, and oxidative stress in mice fed high-fat diet

Food and Function

Tangeretin and heptamethoxyflavone decrease insulin resistance, fat accumulation, and oxidative stress in mice fed high-fat diet

Marina Nery^a, Paula S. Ferreira^a, Danielle R. Gonçalves^a, Luis C. Spolidorio^b, John A. Manthey^c and Thais B. Cesar^{a*}

^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus Araraquara, Departamento de Alimentos e Nutrição, Rodovia Araraquara – Jau, km 1, Araraquara, SP, Brazil, 14802-901.

^bFaculdade de Odontologia, UNESP Univ Estadual Paulista, Campus Araraquara, Departamento de Fisiologia e Patologia, Humaitá 1680, Araraquara, SP, Brazil, 14801903.

^cU.S. Horticultural Research Laboratory, Agricultural Research Service, USDA, 2001 South Rock Road / Fort Pierce, FL 34945, United States.

* Corresponding author

Tel: +55 16 33016927; Fax: +55 16 33220073

E-mail address: tcesar@fctar.unesp.br

Abbreviation list:

PMF: polymethoxyflavones

TAN: tangeretin

HMF: heptamethoxyflavone

Total-C: total cholesterol

HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol

ALT: alanine transaminase

AST: aspartate transaminase

TNF- α : tumor necrosis factor- α

MCP-1: macrophage chemoattractant protein-1

IL-6: interleukin-6

IL-10: interleukin-10

TBARS: thiobarbituric acid reactive substance

MDA: malondialdehyde

ABTS^{•+}: 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity

GLUT: Glucose transporter

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor

AMPK: AMP-activated protein kinase

ABSTRACT

Tangeretin and heptamethoxyflavone were investigated for their ability to repair metabolic damage caused by high-fat diet in C57BL/6J mice. In the first four weeks, induction of obesity was performed and the mice received standard diet (11% kcal from fat) or high-fat diet (45% kcal from fat). After that, in the next four weeks, two groups received supplements (tangeretin or heptamethoxyflavone – dose of 100mg/kg) into the high-fat diet, and the other groups continued to receive their respective diets. Tangeretin and heptamethoxyflavone decreased blood serum levels of glucose, leptin and resistin and the HOMA-IR index. Besides that, blood serum TBARS levels were lower in supplemented groups than in non-supplemented. In addition, tangeretin reduced adipocyte size, and heptamethoxyflavone decreased fat accumulation in the liver. The results show that tangeretin and heptamethoxyflavone have protective effects against insulin resistance and oxidative stress caused by high-fat diet in mice, and may prevent metabolic alterations associated with the development of metabolic syndrome and type 2 diabetes.

Keywords: citrus flavonoids; tangeretin; heptamethoxyflavone; high-fat diet; metabolic syndrome; obesity; inflammation; oxidative stress; C57BL/6J mice

Introduction

A dietary pattern based on the consumption of saturated fats and foods rich in calories is associated with the occurrence of cardiometabolic risk factors, such as abdominal obesity, dyslipidemia, hyperglycemia and high blood pressure. These factors contribute to the development of metabolic syndrome and type 2 diabetes *mellitus*¹, intimately linked to inflammation and oxidative stress. In contrast, a healthy diet rich in fruits and vegetables is associated with an improvement in inflammatory and oxidant profile related to obesity and metabolic syndrome^{2,3,4}. This has been attributed to bioactive compounds found in these foods, and in the case of citrus, include a class of flavonoids termed polymethoxyflavones (PMFs). Tangeretin (4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone) (TAN) and heptamethoxyflavone (3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone) (HMF) are among the PMFs that have known anti-inflammatory and antioxidant properties^{5,6,7,8}.

Some studies have associated TAN with an improvement in cardiometabolic risk factors. For example, in obese mice treated with TAN there was a reduction in body weight, glucose intolerance, and inflammatory markers⁹. TAN also corrected the activity of key enzymes related to carbohydrate metabolism and reduced glycosylated hemoglobin in diabetic rats¹⁰. Besides, HMF has stood out by the anticancer activity in colon tumor and by hypolipidemic activity *in vitro*^{11,12}. Also, HMF may decrease brain ischemia damage in rats, by its anti-inflammatory activity¹³. However, there are no studies in rodents or other experimental models with metabolic disorders treated with this compound.

Based on the literature data, this research was designed to evaluate the regulatory effects of TAN and HMF on risk factors of metabolic syndrome. Mice

C57BL/6J previously fed high-fat diet for four weeks, which developed clinical signs of metabolic syndrome, were treated with TAN or HMF for four additional weeks. Our goal was to test whether these PMFs might reverse cardiometabolic risk factors, such as abdominal obesity and high glycaemia, and ameliorated of biochemical and inflammatory markers.

Materials and methods

Animals and dietary treatment

Six-week-old male C57BL/6J mice (São Paulo University, Ribeirão Preto, SP, Brazil) were maintained in an isolated system at $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ with a 12h light/12h dark cycle and free access to food and water. After one week of adaptation, the mice were randomly divided into four groups with similar body weight distribution: Control (C, n=10) (fed standard diet); high-fat diet (HFD, n=10); high-fat diet supplemented with tangeretin (TAN, n=15); and high-fat diet supplemented with heptamethoxyflavone (HMF, n=15). The mice body weight was monitored weekly and the food intake was monitored daily, always at the same time of the day. The composition of standard diet (11% of lipids) and high-fat diet (45% of lipids) is shown in Table 1. From the 1st to 4th week it was performed a dietary induction of obesity, in which time the animals received high-fat diet without supplements (HFD, TAN and HMF groups) or standard diet (Control group). After the induction of obesity, the TAN and HMF groups received the flavonoid supplementation during the 5th to 8th weeks, while the other groups continued with their respective diets. At the end of the 8th week, mice were anesthetized (xylazine/ketamine; 16/60mg per g of body weight) *via i.p.* injection and euthanized by cardiac puncture (Figure 1). Blood sera obtained by centrifugation and the organs were

stored at -80°C until analysis. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, SP, Brazil (Protocol CEUA/FCF/CAr nº 54/2015).

Supplementation

Based on previous experiences in our laboratory, considering effective and non-toxic doses of polymethoxyflavones, TAN and HMF were given at a dose of 100mg per kg of body weight. In previous murine feeding trials, no toxicity has been observed at these dose levels¹⁴. To prepare the supplemented diet, the high-fat diet was mashed, the supplements were mixed into it, and the diet was remodeled into pellets. To ensure the intake of supplements at the indicated dose, the diet offered was based on the amount ingested the previous day (grams of food / day), with an additional of 10%. Thus, daily supplement ingestion was >95% of the calculated dose. TAN and HMF were isolated from vacuum-distilled orange oil residues, and purified to greater than 95% and 98% for TAN and HMF, respectively¹⁵.

Blood serum analyses

Fasting (12h) levels of glucose, triglycerides, total cholesterol (total-C), HDL-cholesterol (HDL-C), alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were evaluated by enzymatic colorimetric assay, using commercial kits (Labtest, MG, Brazil). Non-HDL cholesterol was calculated by the difference between total-C and HDL-C. The levels of insulin and the inflammatory cytokines TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-10, adiponectin, resistin and leptin were

determined by Multiplex Luminex MAP detection method (Merck KGaA Darmstadt, Germany).

Oxidative stress parameters

Blood serum oxidative stress were measured by lipid peroxidation using thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and quantified in μM MDA¹⁶. Total antioxidant capacity in blood serum was evaluated by ABTS assay¹⁷. The absorbance was measured at 734nm to verify the formation of ABTS^{•+} and, to prepare calibration curve, Trolox (Sigma) was used as a standard. The antioxidant capacity was determined as Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (CAET).

Organs histology

Immediately after euthanasia, blocks of intra-abdominal adipose tissue and the left lobe of liver were carefully dissected from the animals, rinsed in saline 0,9%, fixed in buffered formalin for 48 hours and kept in 80% ethanol until histological preparations. The tissues were submitted to routine processing for paraffin embedding, sectioned to 4-6 micrometer of thickness and stained with haematoxylin & eosin and Masson's trichromic. Histological images were obtained using a digital camera on an optical microscope under 100x magnification, and areas of ≥ 40 adipocytes was measured in each photo, using computerized software (UTHSCSA ImageTool, Version 3.0). A pathologist blind to the study analyzed the tissues by optical microscopy to recognize any morphologic alteration between the treatments.

Statistical analysis

All results were expressed as mean \pm standard deviation of the means. The normality of the data was tested, and the variation between the groups was measured by one-way ANOVA followed by post-hoc analysis (Tukey test), to evaluate the effects caused by high-fat diet and/or the supplements, with significance level $p < 0.05$ (Sigma Stat Software, USA).

Results

Effects of TAN and HMF on dietary intake, body weight gain and organs

The body weight of HFD, TAN and HMF groups had the same growth rate over time, and they were higher than control after fourth week ($p < 0.05$) (Figure 2). HFD, TAN and HMF groups had lower dietary intake and showed heavier intra-abdominal adipose tissue than control group ($p < 0.05$). TAN and HMF showed heavier kidneys in comparison to control ($p < 0.05$), while HFD had heavier pancreas in comparison to TAN, HMF and control ($p < 0.05$). Liver, spleen and heart weight were similar between groups (Table 2).

Histopathological evaluation of adipocytes and hepatic tissue

HFD and HMF groups showed larger adipocytes in comparison to control ($p < 0.05$). On the other hand, the areas of adipocytes of TAN were smaller than HFD and HMF groups ($p < 0.05$) (Table 2 and Figure 3). HFD and TAN groups exhibited granular cytoplasm and diffused distribution of macro vesicular fat depots, without alterations in hepatocytes and sinusoids, and were diagnosed with liver steatosis (Figures 4 II B and 4 II C, respectively). Although the high-fat diet induces the development of steatosis, HMF group showed smaller fat depots

and steatosis was attenuated in these animals (Figure 4 II D). The control group exhibited typical morphology with normal microvesicular fat depots (Figure 4 II A).

Biochemical profile in the blood serum and liver

HFD group showed higher values of blood glucose levels and HOMA-IR index in comparison to control group, whereas TAN and HMF groups presented intermediate values ($p < 0.05$). The non-HDL cholesterol increased in HFD, TAN and HMF groups compared to control ($p < 0.05$). The serum levels of insulin, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, ALT and AST were not altered by high-fat diet or the supplements (Table 3). Liver triglycerides levels of HFD, TAN and HMF groups were higher than control ($p < 0.05$), while liver cholesterol was not different among groups (Table 3).

Inflammatory and oxidative stress biomarkers

The blood serum leptin and resistin levels were elevated in the HFD group compared with control. On the other hand, supplementation with TAN or HMF decreased the serum leptin and resistin levels in comparison with HFD ($p < 0.05$). Adiponectin, MCP-1, TNF- α , IL-6 and IL-10 did not differ between groups (Table 4). Lipid peroxidation in the blood serum was twice higher in HFD group in comparison to control, but it was similar among TAN, HMF and control groups ($p < 0.05$). Serum antioxidant capacity was not altered by high-fat diet, supplemented or not (Table 4).

Discussion

In this study it was verified that oral supplementation with TAN and HMF improved the metabolic parameters altered by the ingestion of high-fat diet in C57BL/6J mice. The main results were: (1) reduction of fasting blood glycaemia and HOMA-IR index, (2) reduction of resistin and leptin levels in the blood serum, and (3) decreased lipid peroxidation in the blood serum. In addition, (4) TAN was able to prevent the increase of adipocyte size caused by the high-fat diet, while (5) HMF attenuated the process of hepatic steatosis triggered by consumption of high-fat diet.

Through adipose tissue histology, our results showed that TAN treatment reduced the size of adipocytes of mice fed high-fat diet, as shown in a similar earlier study⁹. Others authors suggested that citrus extracts can promote lipolysis and enhance fatty acid β -oxidation in adipocytes by the activation of AMPK and hormone-sensitive lipase (HSL)^{18,19,20}.

In addition it was observed that high-fat diet consumption induced hepatic steatosis in mice, however HMF was able to lower this effect. Others authors showed that dietary sources of antioxidants, as orange juice and isolated citrus flavonoids, prevent liver injuries in mice and human^{21,22}. Indeed, our study was the first to observe that HMF attenuated hepatic damage caused by high-fat diet, in association with reduction of inflammation and oxidative stress parameters. According to others, PMFs may protect against hepatic damages by reducing lipid peroxidation, enhancing antioxidant capacity and inhibiting lipogenic enzymes in the liver^{19,23,24}.

Previous studies have shown that polyphenols, citrus flavonoids and PMFs may help regulate metabolic disorders due to hypoglycemic and hypolipidemic properties^{25,26}. Our results showed a decrease in the blood glucose and HOMA-

IR index of animals fed high-fat diet supplemented with TAN or HMF. Prior study showed that TAN improved glucose tolerance and decreased fat accumulation in obese mice, while increased glucose uptake in association with AMPK activation *in vitro*⁹. Another study showed that TAN and nobiletin increased glucose uptake in adipocytes in dose-dependent manners. According to the authors, this anti-diabetic effect on the adipocytes was dependent on the activation of GLUT1 and GLUT4²⁷. Our findings reinforce these actions regarded to TAN, but according to our knowledge, it is the first time that the effect of HMF on glucose metabolism is described.

Resistin, a pro-inflammatory adipokine produced by adipocytes, has increased levels in obese mice²⁸. High levels of resistin has been linked to the development of insulin resistance. A study in rodents showed that exogenous resistin decreased insulin sensitivity; however, the inhibition of this adipokine enhanced insulin sensitivity on target tissues²⁹. In our study, supplementation with TAN and HMF lowered levels of resistin in mice fed a high-fat diet. Reductions in resistin and blood glucose levels resulting from TAN supplementation have been reported previously^{9,10}, and corroborate our results. However, the reducing effect of HMF over levels of resistin is newly reported for this compound.

Leptin is another adipokine secreted by adipocytes proportionally to the amount of adipose tissue. Leptin regulates dietary intake and energy expenditure, and under normal levels it avoids excess of fat deposition in liver, muscle and pancreas^{28,30}. In addition, insulin stimulates leptin synthesis, while leptin inhibits insulin secretion, preventing insulin resistance. In metabolic syndrome, levels of insulin and leptin are increase, what may cause resistance to both hormones³¹.

On the other hand, it was previously shown that treatment with citrus extract or TAN reduced leptin and glucose levels in mice^{9,32}. Similarly, our study showed a decrease of leptin and glucose levels in mice fed high-fat diet after TAN and HMF supplementation. Previous research suggested that lemon polyphenols also may improve insulin and leptin resistance due to increased β -oxidation of fatty acids and activation of PPAR γ expression in mice liver²⁶. In addition, citrus flavonoids may stimulate glucose uptake by increased GLUT4 expression in diabetic mice³³.

The supplementation with TAN or HMF in our study was able to prevent the increase of lipid peroxidation (TBARS) in the blood serum caused by the intake of high-fat diet. Lipid-rich diets increase systemic oxidative stress due to higher production of reactive oxygen species (ROS) and reduction of antioxidants enzymes, as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), increasing inflammatory cytokines^{30,34,35}. On the other hand, dietary sources of antioxidants, as orange juice and citrus flavanones, decrease lipid peroxidation in humans and mice^{21,36}.

A previous study showed that TAN reduced lipid peroxidation and enhanced SOD, CAT and GPx in the blood of rats with cancer³⁷. Another study showed that TAN decreased the formation of lipoperoxides and nitric oxide in the kidneys of rats with renal injury, increasing the levels of GSH and GPx⁷. In addition, HMF, due their antioxidant properties, prevented damages caused by brain ischemia in rats^{13,38}. Considering these facts, we suggest that TAN and HMF may have lowered oxidative stress due to an increase or maintenance of endogenous antioxidant enzymes. Although there are many evidences that TAN and HMF may positively modulate the glucose and lipid metabolism, there are

few studies focusing on the pharmacological potential of these compounds on the obesity related disorders, as the risk factors of metabolic syndrome.

Conclusion

The major findings of in this research were the decrease of glycaemia, pro-inflammatory adipokines and oxidative stress, which led to the prevention of hepatic damage and reduction of lipid accumulation in adipose tissue. In conclusion, we showed that dietary supplementation with tangeretin and heptamethoxyflavone was effective to protect against metabolic syndrome development. Further studies are needed to verify specific effects in metabolic markers of diabetes mellitus and cardiovascular diseases.

Conflict of interest

None of the authors have any conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank financial support of “Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas” at UNESP (PADC/FCFAR) and Citrosuco S.A. The authors also thank “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” for grant scholarship to Marina Nery.

References

1. S. M. Grundy, J. I. Cleeman, S. R. Daniels, K. A. Donato, R. H. Eckel, B. A. Franklin, D. J. Gordon, R. M. Krauss, P. J. Savage, S. C. Smith, J. A. Spertus and F. Costa, *Circulation*, 2005, **112**, 2735-2752.

2. A. Cassidy, E. B. Rimm, E. J. O'Reilly, G. Logroscino, C. Kay, S. E. Chiuve and K. M. Rexrode, *Stroke*, 2012, **43**, 946-951.
3. F. Eichelmann, L. Schwingshackl, V. Fedirko and K. Aleksandrova, *Obes Rev.*, 2016, **17**, 1067-1079.
4. F. Jannasch, J. Kröger and M. B. Schulze, *J Nutr.*, 2017, **147**, 1174-1182.
5. C. S. Lai, M. H. Ho, M. L. Tsai, S. Li, V. Badmaev, C. T. Ho and M. H. Pan, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 10320–10328.
6. J. M. Assini, E. E. Mulvihill and M. W. Huff, *Curr Opin Lipidol.*, 2013, **24**, 34–40.
7. H. H. Arab, W. R. Mohamed, B. M. Barakat and E. A. Arafa, *Chem Biol Interact.*, 2016, **258**, 205-213.
8. J. A. Manthey and P. Bendele, *J Agric Food Chem.*, 2008, **56**, 9399-9403.
9. M. S. Kim, H. J. Hur, D. Y. Kwon and J-T Hwang, *Mol Cell Endocrinol*, 2012, **358**, 127–134.
10. R. Sundaram, P. Shanthib and P. Sachdanandama, *Phytomedicine*, 2014, **21**, 793–799.
11. T. Hirata, M. Fujii, K. Akita, N. Yanaka, K. Ogawa, M. Kuroyanagi and D. Hongo, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 25–28.
12. M.C. Kou, S.H. Fu, J.H. Yen, C.Y. Weng, S. Li, C.T. Ho and M.J. Wu, *Food Funct.*, 2013, **4**, 602-609.
13. S. Okuyama, M. Morita, K. Miyoshi, Y. Nishigawa, M. Kaji, A. Sawamoto, T. Terugo, N. Toyoda, N. Makihata, Y. Amakura, M. Yoshimura, M. Nakajima and Y. Furukawa, *Neurochem Int.*, 2014, **70**, 30–38.
14. Delaney, K. Phillips, D. Buswell, B. Mowry, D. Nickels, D. Cox, H. B. Wang and J. Manthey, *Food Chem Toxicol*, 2001, **39**, 1087-1094.

15. J. A. Manthey, T. B. Cesar, E. Jackson and S. Mertens-Talcott, *J. Agric. Food Chem.* 2011, **59**, 145–151.
16. K. Yagi, *Methods Mol Biol.*, 1998, **108**, 101-106.
17. A. Janaszewska and G. Bartosz, *Scand J Clin Lab Invest.*, 2002, **62**, 231-236.
18. C. Dallas, A. Gerbi, G. Tenca, F. Juchaux and F. X. Bernard, *Phytomedicine*, 2008, **15**, 783-792.
19. S. I. Kang, H. S. Shin, H. M. Kim, Y. S. Hong, S. A. Yoon, S. W. Kang, J. H. Kim, M. H. Kim, H. C. Ko and S. J. Kim, *Biol Pharm Bull*, 2012, **35**, 223-230.
20. S. I. Kang, H. S. Shin, H. C. Ko and S. J. Kim, *Phytoter Res.*, 2013, **27**, 131-134.
21. P. S. Ferreira, L. C. Spolidorio, J. A. Manthey and T. B. Cesar, *Food Funct*, 2016, **7**, 2675-2681.
22. D. Gonçalves, C. Lima, P. Ferreira, P. Costa, A. Costa, W. Figueiredo and T. Cesar, *Food Nutr Res*, 2017, **61**, 1296675.
23. H. J. Park, U. J. Jung, S. J. Cho, H. K. Jung, S. Shim and M. S. Choi, *J. Nutr Biochem*, 2013, **24**, 419-427.
24. B. K. Choi, T. W. Kim, D. R. Lee, W. H. Jung, J. H. Lim, J. Y. Jung, S. H. Yang and J. W. Suh, *Phytoter Res.*, 2015, **29**, 1577-1584.
25. V. Mollace, I. Sacco, E. Janda, C. Malara, D. Ventrice, C. Colica, V. Visalli, S. Muscoli, S. Ragusa, C. Muscoli, D. Rotiroti and F. Romeo, *Fitoterapia*, 2011, **82**, 309–316.
26. Y. Fukuchi, M. Hiramitsu, M. Okada, S. Hayashi, Y. Nabeno, T. Osawa and M. Naito, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2008, **43**, 201–209.
27. K. Onda, N. Horike, T. S. and T. Hirano, *Phytother. Res*, 2012, **27**, 312-316.

28. H. Tilg and A. R. Moschen, *Nature*, 2006, **6**, 772-783.
29. D. R. Schwartz and M. A. Lazar, *Trends Endocrinol Metab.*, 2011, **22**, 259-265.
30. A. Fernández-Sánchez, E. Madrigal-Santillán, M. Bautista, J. Esquivel-Soto, A. Morales-González, C. Esquivel-Chirino, I. Durante-Montiel, G. Sánchez-Rivera, C. Valadez-Veja and J. A. Morales-González, *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, **12**, 3117-3132.
31. M. H. Fonseca-Alaniz, J. Takada, M. I. C. Alonso-Vale and F. B. Lima, *J. Pediatr.*, 2007, **83**, 192-203.
32. Y. Lee, B. Cha, K. Saito, S. Choi, X. X. Wang, B. Choi, T. Yonezawa, T. Teruya, K. Nagai and J. Woo, *Phytomedicine*, 2011, **18**, 648–654.
33. U. J. Jung, M. K. Lee, Y. B. Park, M. A. Kang and M. S. Choi, *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, **38**, 1134-1145.
34. G. R. Hajer, T. W. van Haeften and F. L. J. Visseren, *European Heart Journal*, 2008, **29**, 2959–2971.
35. J. Kuryszko, P. Sławuta and G. Sapikowski, *Pol J Vet Sci*, 2016, **19**, 441–446.
36. C. Ribeiro, G. Dourado and T. Cesar, *Nutrition*, 2017, **38**, 13-19.
37. A. Lakshmi and S. Subramanian, *Biochimie*, 2014, **99**, 96-109.
38. S. Okuyama, N. Shimada, M. Kaji, M. Morita, K. Miyoshi, S. Minami, Y. Amakura, M. Yoshimura, T. Yoshida, S. Watanabe, M. Nakajima and Y. Furukawa, *Neurosci Lett.*, 2012, **528**, 190– 195.

Figure Contents

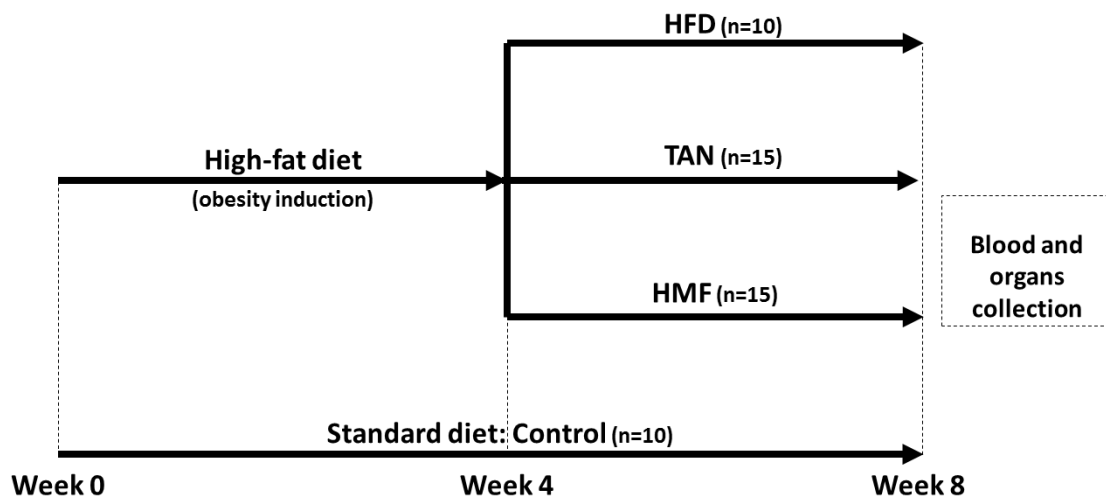


Figure 1. Experimental design. To obesity induction, high-fat diet was given for 4 weeks. After that, HFD group continued to receive only high-fat diet, and TAN and HMF groups received high-fat diet supplemented with tangeretin and heptamethoxyflavone (100mg/kg), respectively. Control group received standard diet during 8 weeks.

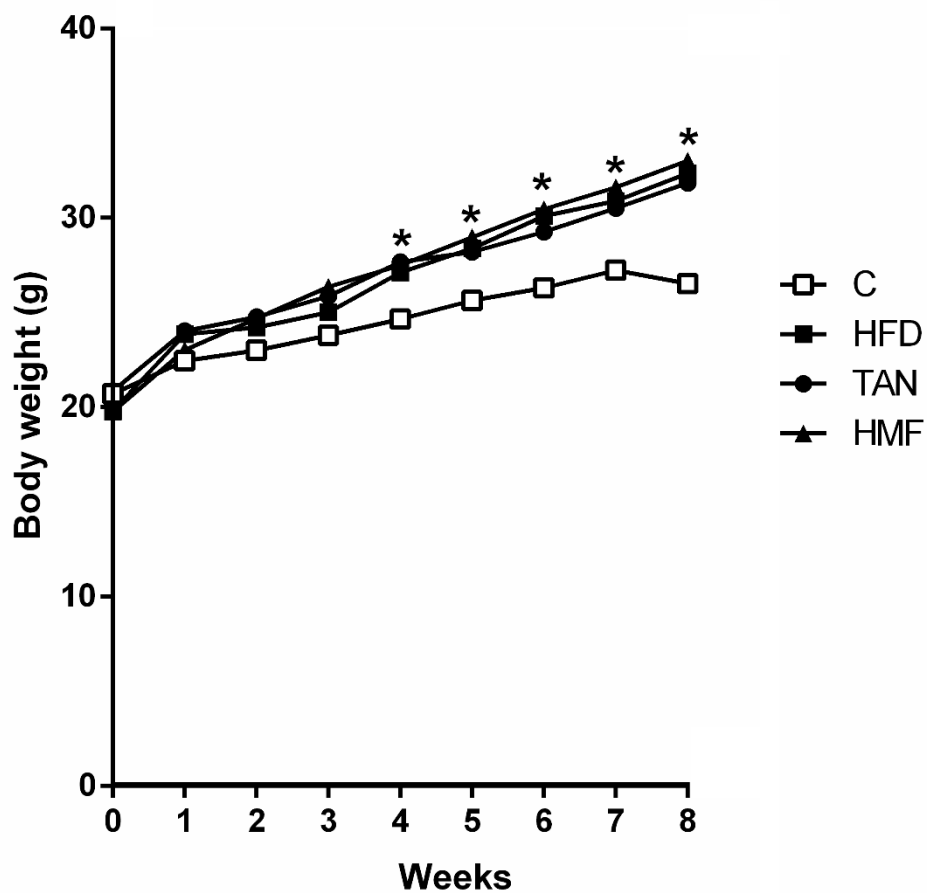


Figure 2. Body weight of male C57BL/6J mice fed with standard diet (C), high-fat diet (HFD), or high-fat diet supplemented with tangeretin (TAN) or heptamethoxyflavone (HMF). * $p < 0.05$ for HFD, TAN and HMF groups in comparison to the control.

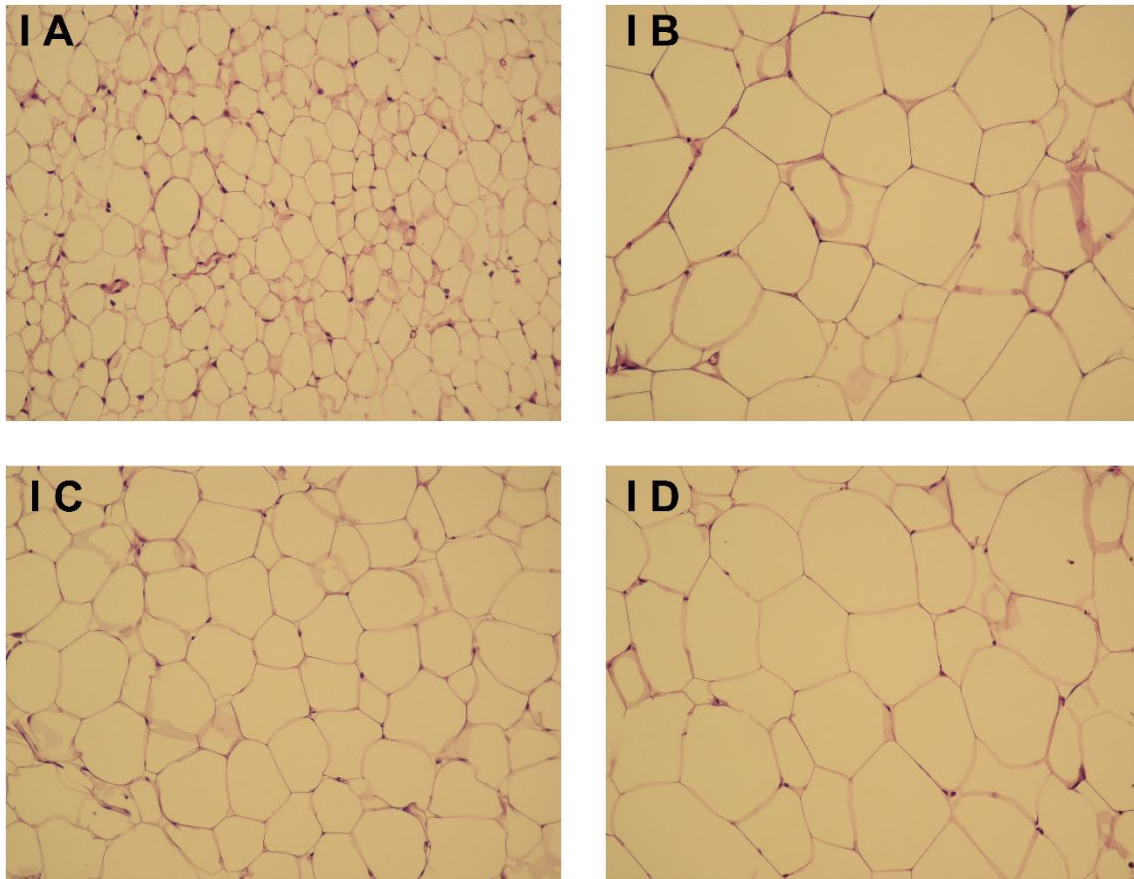


Figure 3. Histological sections of intra-abdominal adipose tissue of mice fed with standard diet (IA), high-fat diet (IB), high-fat diet supplemented with tangeretin (IC) or heptamethoxyflavone (ID) (100x magnification)

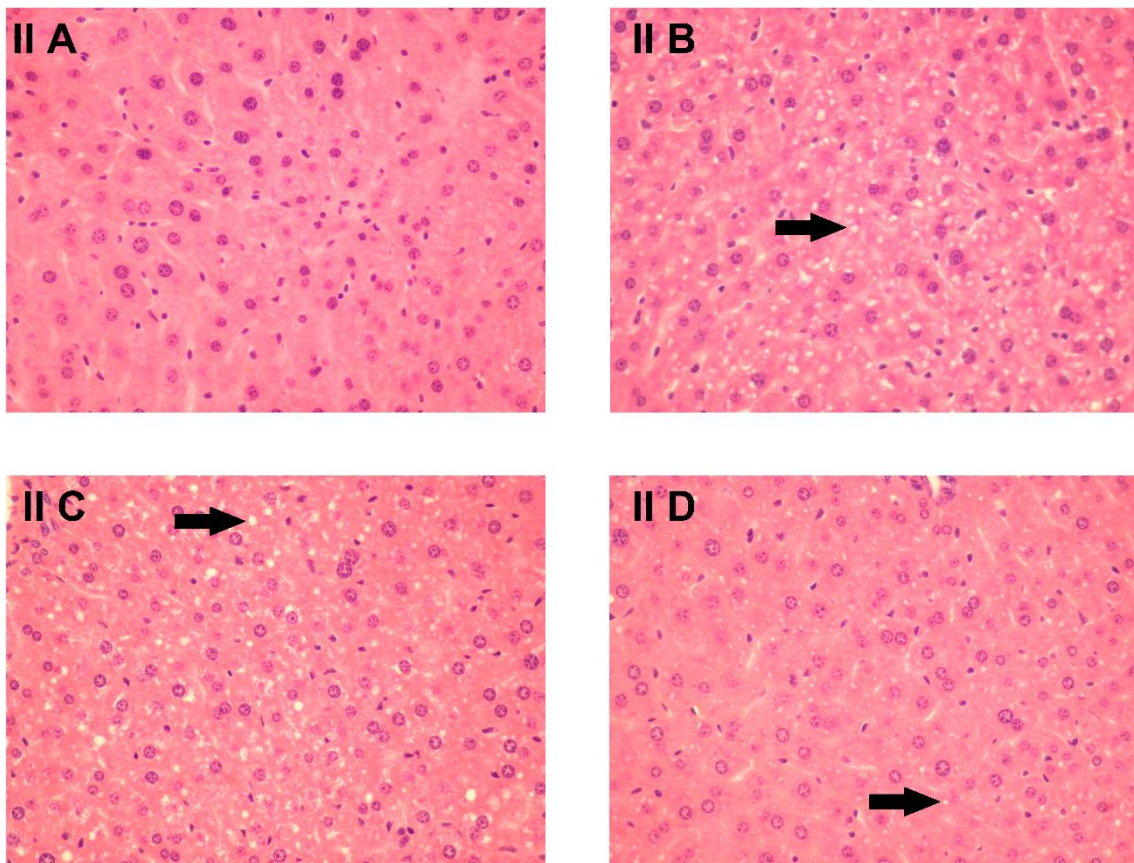


Figure 4. Histological sections of liver tissue of mice fed with standard diet (IIA), high-fat diet (IIB), high-fat diet supplemented with tangeretin (IIC) or heptamethoxyflavone (IID) (400x magnification)

Table contents

Table 1. Composition of standard diet and high-fat diet.

Diet	Standard	High-fat
Energy (kcal/g)	4.27	5.35
Protein (% kcal)	14.6	20.8
Carbohydrates (% kcal)	73.9	33.8
Lipids (% kcal)	11.5	45.30
Composition	g/100g	
Corn starch	46.6	7.8
Casein	14.0	24.0
L-Cistein	0.2	0.4
Maltodextrin	15.5	11.7
Sucrose	10.0	20.1
Fiber	4.0	5.8
Soybean oil	5.0	2.9
Lard	-	20.7
Mineral mix	3.5	5.2
Vitamin mix	1.0	1.2
Choline bitartrate	0.3	0.2
Total	100.0	100.0

Table 2. Organs weight and adipocyte size of male C57BL/6J mice fed with standard diet (Control), high-fat diet (HFD), or high fat diet supplemented with tangeretin (TAN) or heptamethoxyflavone (HMF).

Variables	Control	HFD	TAN	HMF
Energy intake (kcal)	15.4 ± 0.4 ^b	14.0 ± 1.1 ^a	14.5 ± 1.0 ^a	14.2 ± 0.7 ^a
Liver (g)	1.24 ± 0.09	1.19 ± 0.17	1.21 ± 0.12	1.18 ± 0.09
Kidney (g)	0.34 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.03 ^{ab}	0.38 ± 0.03 ^b	0.38 ± 0.04 ^b
Pancreas (g)	0.16 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.05 ^b	0.16 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
Spleen (g)	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Heart (g)	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Adipose tissue * (g)	0.38 ± 0.08 ^a	2.11 ± 1.05 ^b	1.48 ± 0.73 ^b	1.87 ± 0.66 ^b
Adipocyte area (µm ²)	13.6 ± 1.6 ^a	45.0 ± 7.1 ^b	37.05 ± 7.5 ^{ab}	46.5 ± 6.4 ^b

Results are presented as mean ± SD. Data analyzed by 1-factor ANOVA, followed by Tukey's test. Mean in a row followed by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

*Intra-abdominal adipose tissue

Table 3. Biochemical profile and liver lipids of male C57BL/6J mice fed with standard diet (Control), high-fat diet (HFD), or high fat diet supplemented with tangeretin (TAN) or heptamethoxyflavone (HMF).

Variables	Control	HFD	TAN	HMF
<i>Biochemical profile</i>				
Glucose (mg/dL)	241 ± 20 ^a	343 ± 63 ^b	285 ± 78 ^{ab}	317 ± 36 ^{ab}
Insulin (pg/mL)	74 ± 16	130 ± 61	129 ± 51	109 ± 19
HOMA-IR	1.27 ± 0.27 ^a	2.73 ± 1.19 ^b	2.43 ± 1.06 ^{ab}	2.45 ± 0.47 ^{ab}
Triglycerides (mg/dL)	75 ± 6	71 ± 13	76 ± 10	76 ± 11
Total cholesterol (mg/dL)	88 ± 7	100 ± 10	101 ± 15	107 ± 16
HDL cholesterol (mg/dL)	50 ± 7	50 ± 5	53 ± 10	55 ± 6
Non-HDL chol. (mg/dL)	38 ± 5 ^a	49 ± 6 ^b	48 ± 7 ^{ab}	49 ± 7 ^b
ALT (mg/dL)	49 ± 20	69 ± 20	66 ± 27	46 ± 19
AST (mg/dL)	279 ± 121	326 ± 125	256 ± 92	247 ± 76
<i>Liver lipids</i>				
Triacylglycerol (mg/dL)	114 ± 25 ^a	217 ± 62 ^b	204 ± 40 ^b	219 ± 55 ^b
Cholesterol (mg/dL)	20 ± 1.4	22 ± 4.2	23 ± 2.5	21 ± 1.8

Results are presented as mean ± SD. Data analyzed by 1-factor ANOVA, followed by Tukey's test. Mean in a row followed by different letters differ significantly ($p \leq 0.05$).

Table 4. Inflammatory and oxidative stress biomarkers of male C57BL/6J mice fed with standard diet (Control), high-fat diet (HFD), or high fat diet supplemented with tangeretin (TAN) or heptamethoxyflavone (HMF).

Variables	Control	HFD	TAN	HMF
Adiponectin (mg/L)	3.20 ± 0.54	3.18 ± 0.84	2.77 ± 0.66	3.58 ± 0.78
Leptin (pg/mL)	353 ± 150 ^a	10247 ± 6477 ^b	4757 ± 2287 ^{ab}	6094 ± 3315 ^{ab}
Resistin (pg/mL)	1479 ± 324 ^a	2201 ± 136 ^b	1707 ± 383 ^{ab}	1730 ± 387 ^{ab}
MCP-1 (pg/mL)	37.7 ± 8.0	36.6 ± 6.4	38.8 ± 6.4	38.6 ± 10.3
TNF-α (pg/mL)	2.79 ± 0.45	3.16 ± 0.67	3.32 ± 0.58	3.26 ± 0.67
IL-6 (pg/mL)	1.74 ± 0.59	2.91 ± 0.87	2.12 ± 0.64	1.83 ± 0.56
IL-10 (pg/mL)	2.02 ± 0.98	1.65 ± 0.73	2.01 ± 0.69	3.37 ± 1.55
TBARS (μM)	6.43 ± 0.87 ^a	12.55 ± 3.06 ^b	7.37 ± 1.27 ^a	8.75 ± 1.56 ^a
ABTS (mMeq Trolox)	1.40 ± 0.04	1.41 ± 0.06	1.38 ± 0.06	1.44 ± 0.03

Results are presented as mean ± SD. Data analyzed by 1-factor ANOVA, followed by Tukey's test. Mean in a row followed by different letters differ significantly (p≤0.05).

Considerações finais

A suplementação com tangeritina e heptametoxiflavona melhorou parâmetros relacionados a resistência insulínica (glicemia, índice HOMA-IR, resistina e leptina) e ao estresse oxidativo (TBARS). Além disso, a tangeritina reduziu a acumulação lipídica no tecido adiposo, enquanto a heptametoxiflavona diminuiu os danos hepáticos causados pela dieta rica em gordura. Pela primeira vez foram apresentados os benefícios da heptametoxiflavona na regulação do metabolismo de camundongos induzidos à obesidade.

Estes resultados sugerem que a tangeritina e a heptametoxiflavona podem ser úteis para reduzir as desordens metabólicas causadas pela ingestão de dieta hiperlipídica, prevenindo o desenvolvimento de síndrome metabólica e diabetes *mellitus* tipo II.

REFERÊNCIAS

1. WHO: Global Health Observatory (GHO) data. Obesity: situation and trends, 2015.
2. Mello MM. Obesity – personal choice or public health issue? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Jan;4(1):2-3.
3. U S National Heart, Lung and Blood Institute. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National High Blood Pressure Education Program. <http://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/jnc7full.pdf>. Acesso: 03/2017.
4. Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2017 Jul;22(4):365-367
5. Velez M, Kohli S, Sabbah HN. Animal models of insulin resistance and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2014 Jan;19(1):1-13.
6. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001; 276:16683-9.
7. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:772–83.
8. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 15;323(2):630-5.
9. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3117-32.

10. Paniagua JA. Nutrition, insulin resistance and dysfunctional adipose tissue determine the different components of metabolic syndrome. *World J Diabetes*. 2016 Nov 15;7(19):483-514.
11. Park HK, Kwak MK, Kim HJ, Ahima RS. Linking resistin, inflammation, and cardiometabolic diseases. *Korean J Intern Med*. 2017 Mar;32(2):239-247.
12. Schwartz DR, Lazar MA. Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Jul;22(7):259-65.
13. Filková M1, Haluzík M, Gay S, Senolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol*. 2009 Nov;133(2):157-70.
14. Tateya S, Tamori Y, Kawaguchi T, Kanda H, Kasuga M. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. *Endocrinology*. 2010 Mar;151(3):971-9.
15. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;114:1752-61.
16. Murdolo G, Piroddi M, Luchetti F, Tortoioli C, Canonico B, Zerbinati C, Galli F, Iuliano L. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. *Biochimie*. 2013;95:585-94.
17. Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 24;14(11):21240-57.

18. Lonardo A, Ballestri S, Marchesini G, Angulo P, Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 2015 Mar;47(3):181-90.
19. Assini, JM, Mulvihill, EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24:34-40.
20. Cassidy A, Rimm EB, O'Reilly EJ, Logroscino G, Kay C, Chiuve SE, Rexrode KM. Dietary flavonoids and risk of stroke in women. *Stroke.* 2012; 43:946–951.
21. O'Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL III. 100% orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003–2006. *Nutr J.* 2012;11:107.
22. Ribeiro C, Dourado G, Cesar T. Orange juice allied to a reduced-calorie diet results in weight loss and ameliorates obesity-related biomarkers: A randomized controlled trial. *Nutrition.* 2017 Jun;38:13-19.
23. Gonçalves D, Lima C, Ferreira P, Costa P, Costa A, Figueiredo W, Cesar T. Orange juice as dietary source of antioxidants for patients with hepatitis C under antiviral therapy. *Food Nutr Res.* 2017 Mar 22;61(1):1296675.
24. Silveira JQ, Dourado GK, Cesar TB. Red-fleshed sweet orange juice improves the risk factors for metabolic syndrome. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(7):830-6.
25. Ferreira PS, Spolidorio LC, Manthey JA, Cesar TB. Citrus flavanones prevent systemic inflammation and ameliorate oxidative stress in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Food Funct.* 2016 Jun 15;7(6):2675-81.

26. Patel K, Gadewar M, Tahilyani V, Patel DK. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: a concise report. *Chin J Integr Med.* 2013 Oct;19(10):792-800.
27. Li RW, Theriault AG, Au K, Douglas TD, Casaschi A, Kurowska EM, Mukherjee R. Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. *Life Sci.* 2006 Jun 20;79(4):365-73.
28. Yi L, Ma S, Ren D. Phytochemistry and bioactivity of Citrus flavonoids: a focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities. *Phytochem Rev.* 2017 Jun; 16: 479-511.
29. Arab HH, Mohamed WR, Barakat BM, Arafa el-SA. Tangeretin attenuates cisplatin-induced renal injury in rats: Impact on the inflammatory cascade and oxidative perturbations. *Chem Biol Interact.* 2016 Oct 25;258:205-13.
30. Miyata Y, Tanaka H, Shimada A, Sato T, Ito A, Yamanouchi T, Kosano H. Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin. *Life Sci.* 2011 Mar 28;88(13-14):613-8.
31. Hirata T, Fujii M, Akita K, Yanaka N, Ogawa K, Kuroyanagi M, Hongo D. Identification and physiological evaluation of the components from citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorg Med Chem.* 2009 Jan 1;17(1):25-8.
32. Kurowska E. M., Manthey J.A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *J Agric Food Chem.*, 2004;52(10):2879-86.

33. Kurowska E .M., Manthey J. A., Casaschi A., Theriault A. G. Modulation of HepG2 cell net apolipoprotein B secretion by the citrus polymethoxyflavone, tangeretin. *Lipids*. 2004;39(2):143-51.
34. Kim MS, Hur HJ, Kwon DY, Hwang JT. Tangeretin stimulates glucose uptake via regulation of AMPK signaling pathways in C2C12 myotubes and improves glucose tolerance in high-fat diet-induced obese mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jul 6;358(1):127-34.
35. Sundaram R, Shanthi P, Sachdanandam P. Effect of tangeretin, a polymethoxylated flavone on glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 2014 May 15;21(6):793-9.
36. Okuyama S, Shimada N, Kaji M, Morita M, Miyoshi K, Minami S, Amakura Y, Yoshimura M, Yoshida T, Watanabe S, Nakajima M, Furukawa Y. Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, enhances brain-derived neurotrophic factor production and neurogenesis in the hippocampus following cerebral global ischemia in mice. *Neurosci Lett*. 2012 Oct 24;528(2):190-5.
37. Okuyama S, Morita M, Miyoshi K, Nishigawa Y, Kaji M, Sawamoto A, Terugo T, Toyoda N, Makihata N, Amakura Y, Yoshimura M, Nakajima M, Furukawa Y. 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia mouse model. *Neurochem Int*. 2014 May;70:30-8.
38. Manthey JA, Bendele P. Anti-inflammatory activity of an orange peel polymethoxylated flavone, 3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone, in the rat carrageenan/paw edema and mouse lipopolysaccharide-challenge assays. *J Agric Food Chem*. 2008 Oct 22;56(20):9399-403.

39. Matsumoto C, Inoue H, Tominari T, Watanabe K, Hirata M, Miyaura C, Inada M. Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, suppresses inflammatory osteoclastogenesis and alveolar bone resorption. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015;79(1):155-8.
40. Kou MC, Fu SH, Yen JH, Weng CY, Li S, Ho CT, Wu MJ. Effects of citrus flavonoids, 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone and 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, on the activities of macrophage scavenger receptors and the hepatic LDL receptor. *Food Funct.* 2013 Apr 25;4(4):602-9.
41. Duan L., Dou L.L., Yu K.Y., Guo L., Bai-Zhong C., Li P., Liu E. H. Polymethoxyflavones in peel of *Citrus reticulata* 'Chachi' and their biological activities. *Food Chem.*, 2017;234:254-61.
42. Chu DT, Malinowska E, Jura M, Kozak LP. C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity. *Physiol Rep.* 2017 Apr;5(7):1-20.

ANEXO 1 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 54/2015

Interessada: MARINA NERY DA SILVA

Orientadora: Profa. Dra. Thais Borges César

Projeto: Efeito da tangeritina e heptametoxiflavona no metabolismo lipídico e resistência insulínica de camundongos obesos

Parecer nº 99/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 18 de novembro de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Efeito da tangeritina e heptametoxiflavona no metabolismo lipídico e resistência insulínica de camundongos obesos”, apresentado pela Pós-graduanda MARINA NERY DA SILVA, sob orientação da Professora Doutora Thais Borges César, do Departamento de Alimentos e Nutrição desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução. O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em AGOSTO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 25 de novembro de 2015.


Profa Dra ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Vice-coordenadora da CEUA