



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Matheus Antônio Filiol Belin

**Potencial terapêutico da suplementação com extrato do
fruto de bergamota (*Citrus bergamia*) na prevenção da
disfunção cardíaca induzida pela obesidade: relação com
mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e a
participação de aminas biogênicas**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de
Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Camila Renata Côrrea

**Botucatu
2024**

Matheus Antônio Filiol Belin

Potencial terapêutico da suplementação com extrato do fruto de bergamota (*Citrus bergamia*) na prevenção da disfunção cardíaca induzida pela obesidade: relação com mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e a participação de aminas biogênicas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Camila Renata Côrrea

Botucatu
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Belin, Matheus Antonio Filiol.

Potencial terapêutico da suplementação com extrato do fruto de bergamota (*Citrus bergamia*) na prevenção da disfunção cardíaca induzida pela obesidade: relação com mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e a participação de amins bi / Matheus Antonio Filiol Belin. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Camila Renata Correa

Capes: 20803001

1. Tangerina - Subprodutos. 2. Remodelação ventricular.
3. Hipertensão. 4. Agmatina. 5. Serotonina.

Palavras-chave: agmatina; hipertensão; remodelamento cardíaco; serotonina; subproduto.

Impacto potencial da pesquisa

Título da Dissertação: “Potencial terapêutico da suplementação com extrato do fruto de bergamota (*Citrus bergamia*) na prevenção da disfunção cardíaca induzida pela obesidade: relação com mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e a participação de aminos biogênicas”

Impacto científico esperado: Utilização de um extrato natural de fruta cítrica rico em compostos bioativos, sem efeitos colaterais, na prevenção de doenças cardiovasculares, as maiores causas de morte no mundo atualmente. Em adição, utilizar as aminos biogênicas como novos biomarcadores para doenças cardiovasculares.

Impacto social: Promoção de saúde e bem-estar ao diminuir a prevalência de doenças com o extrato. Melhorar a sustentabilidade da produção da bergamota, por promover o uso integral desta fruta, e não apenas a parte lipofílica, como costumava ser usada anteriormente. O extrato utilizado neste trabalho é considerado um subproduto, pois era descartado. Conseguimos evitar o seu desperdício e utilizá-lo para aplicação na saúde. Auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças cardiovasculares com a avaliação das aminos biogênicas.

Impacto econômico: Melhorar o faturamento dos produtores de bergamota por aumentar o valor agregado da produção. Possível desenvolvimento de novos testes diagnósticos baseado no perfil de aminos biogênicas, dando origem a novos produtos. E, diminuição do gasto dos mais de US\$1 trilhão anuais gerados direto e indiretamente por doenças cardiovasculares.

Mestrando: Matheus Antônio Filiol Belin

Orientadora: Camila Renata Correa

Potential research impact

Dissertation Title: “Therapeutic potential of supplementation with bergamot fruit extract (*Citrus bergamia*) in the prevention of obesity-induced cardiac dysfunction: relationship with inflammatory mediators, oxidative stress and the participation of biogenic amines”

Expected scientific impact: Use of a natural citrus fruit extract rich in bioactive compounds, without side effects, in the prevention of cardiovascular diseases, the biggest causes of death worldwide today. In addition, biogenic amines as new biomarkers for cardiovascular diseases.

Social impact: Promotion of health and well-being by reducing the prevalence of diseases with the extract. Improve the sustainability of bergamot production, by promoting the full use of this fruit, and not just the lipophilic part, as was previously used. The extract used in this work is considered a by-product, as it was discarded. We managed to avoid waste and use it for health applications. Assist in diagnosing and treating cardiovascular diseases with the evaluation of biogenic amines.

Economic impact: Improve the revenue of bergamot producers by increasing the added value of production. Possible development of new diagnostic tests based on the profile of biogenic amines, giving rise to new products. And reduced spending of more than US\$1 trillion annually generated directly and indirectly by cardiovascular diseases.

Master's student: Matheus Antônio Filiol Belin

Advisor: Camila Renata Correa

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MATHEUS ANTÔNIO FILIOL BELIN, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 20 dias do mês de agosto do ano de 2024, às 09:00 horas, no(a) Anfiteatro da Unipex - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MATHEUS

ANTÔNIO FILIOL BELIN, intitulada **Potencial terapêutico da suplementação com extrato do fruto de bergamota (Citrus bergamia) na prevenção da disfunção cardíaca induzida pela obesidade: relação com mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e a participação de aminas biogênicas.** A

Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa Dra CAMILA RENATA CORREA CAMACHO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) - FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA (Participação Presencial) do(a) Depto. de Ciências Químicas e Biológicas / IB/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. FABIO RODRIGUES FERREIRA SEIVA (Participação Presencial) do(a) Depto. de Ciências Químicas e Biológicas / IB/Botucatu - Unesp. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado

_____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa Dra CAMILA RENATA CORREA CAMACHO

Camila Renata Correa Camacho

Dedicatória

Dedico este trabalho, especialmente, a minha família.

Ao meu pai, José Benedito Filiol Belin (*in memoriam*). Ao falecer por doenças cardiovasculares aos 36 anos, quando eu tinha 10 anos, você deu origem ao motivo de eu ter estudado doenças cardiovasculares no mestrado. Você é meu grande exemplo de dedicação ao trabalho e à família. Te amo e te dedico este trabalho.

Ao meu avô, Edson Geraldo da Silva (*in memoriam*). Você semeou e regou a semente do apreço pelo conhecimento na minha vida. Você nem sabia que existia Universidade Pública e agora seu neto está próximo do título de mestre em uma excelente. Você sempre foi um exemplo de trabalho e sucesso. Te amo e te dedico este trabalho.

A minha mãe, Kelli Cristina da Silva Filiol Belin. Você sempre me quis e me amou desde muito antes de eu nascer. Sempre torceu por mim, e mesmo com vários desafios, nunca desistiu. Você é meu grande exemplo de resiliência. E eu puxei muita coisa de você. Te amo e te dedico este trabalho.

A minha avó, Maria Pierini da Silva. Você, minha avó e madrinha, sempre me estimulou a ser corajoso e enfrentar os desafios. E, até hoje, é uma forte base para nossa família. Te amo e te dedico este trabalho.

Aos meus irmãos, Pietra Antônia Filiol Belin e José Antônio Filiol Belin, nós crescemos juntos e amadurecemos juntos. Durante o mestrado, também foi assim, estivemos sempre juntos e enfrentando tudo. Amo vocês e dedico este trabalho a nossa família.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus. O Senhor me iluminou e me orientou durante todo este período. E, se não fosse por isso, sem dúvidas, eu não estaria aqui. Aqui, insiro um trecho de um livro importante e que me acompanhou durante este período: “O SENHOR é o meu pastor; nada me faltará. Ele me faz repousar em pastos verdejantes. Leva-me para junto das águas de descanso; refrigera-me a alma. Guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque tu estás comigo; o teu bordão e o teu cajado me consolam. Preparas-me uma mesa na presença dos meus adversários, unges-me a cabeça com óleo; o meu cálice transborda. Bondade e misericórdia certamente me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na Casa do SENHOR para todo o sempre”, Salmos 23:1-6.

Agradeço, imensamente, a minha família. Meu pai (*in memoriam*) e meu avó (*in memoriam*), minha mãe e minha avó, meus irmãos e meu cunhado. Vocês são grandes exemplos e se esforçaram muito para que eu pudesse chegar aonde estou, me deram muitas forças. Vocês são grande parte disso, obrigado.

Agradeço ao Colégio Universitário de Avaré, Anglo de Avaré, por me contemplarem com uma bolsa de estudos integral durante meu Ensino Fundamental e Ensino Médio. Vocês são parte essencial e indispensável desta jornada.

Agradeço a todos com os quais tive o prazer de compartilhar momentos no Laboratório de Química e Bioquímica Vegetal (LBQV) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) durante minha iniciação científica. Em especial, agradeço à Prof^a. Dr^a. Giuseppina Pace Pereira Lima, nossa querida Fina, e ao Prof. Dr. Igor Otávio Minatel. Considero vocês minha mãe e meu pai na ciência. Grande fonte de inspiração, proporcionaram meus primeiros contatos com a ciência e impulsionaram minha conexão e florescimento nesta área.

Agradeço à equipe do Laboratório RedOx e aos colaboradores da UNIPLEX, especialmente, à Prof^a. Dr^a. Camila Renata Correa, minha orientadora neste período, e ao Prof. Dr. Dijon Henrique Salomé De Campos. Vocês me acolheram, compraram minhas ideias, acreditaram na minha palavra, no meu caráter, na minha capacidade, foram pacientes, me deram liberdade e me permitiram realizar um trabalho digno, ao mesmo tempo em que enfrentavam seus próprios desafios. Agradeço muito a vocês.

Agradeço aos meus amigos Jordan, Seraki Formosa, Gijo, Chumbo e aos alunos de iniciação científica do laboratório. Vocês sempre tornaram tudo mais leve e mais gostoso de ser vivido. Foi e é um prazer e uma satisfação compartilhar momentos com vocês!

Agradeço aos meus cachorros Billy (*in memoriam*), Bob, Byllu, Bola e Peppa. Vocês sempre deram carinho, amor e abrigo nos momentos em que isso foi necessário.

Agradeço aos animais (ratos *Wistar*) que foram utilizados no desenvolvimento desta pesquisa. Vocês foram essenciais para o avanço da ciência.

Agradeço ao meu psicólogo, André, que acompanhou os desafios e vitórias do início e do final deste percurso, contribuindo para meu autoconhecimento, autodesenvolvimento e melhora de meu discernimento, mesmo em períodos turbulentos.

Agradeço os membros da banca examinadora de Qualificação e Defesa, suplentes e titulares, pelo aceite do desafio e pelas importantes considerações que me fizeram evoluir e engrandeceram esta dissertação: Clelia Akiko Hiruma Lima, Jéssica Garcia Leite, Giuseppina Pace Pereira Lima, Igor Otávio Minatel, Aline Nunes, Fabio Rodrigues Ferreira Seiva e Dijon Henrique Salomé De Campos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) por todo apoio, prontidão, auxílio e investimento fornecidos a mim, a meu trabalho, e aos alunos do programa.

Agradeço, por fim, ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo: 2022/01925-7),
indispensável para a realização deste trabalho.

Epígrafe

*“O importante é não parar de questionar; a
curiosidade tem sua própria razão de existir”*

Albert Einstein

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da suplementação do extrato do fruto da bergamota (*Citrus bergamia*) na prevenção da disfunção cardíaca induzida pela obesidade e investigar os efeitos em mediadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Adicionalmente, verificar a relação das aminas biogênicas com disfunção cardíaca. **Materiais e métodos:** 48 ratos *Wistar* foram divididos igualmente em 4 grupos: controle (C), C + Bergamota (B), obeso (O) e O + B. A obesidade foi induzida por dieta rica em açúcar e gordura. O extrato do fruto da bergamota foi administrado por gavagem (250 mg/Kg/dia) durante 20 semanas. A obesidade foi avaliada pelo índice de adiposidade. Foi realizado estudo Doppler-Ecocardiográfico, pletismografia de cauda, *Western Blotting* de proteínas relacionadas a inflamação no músculo cardíaco, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo cardíacos. O perfil de aminas biogênicas (ABs) da fruta e do tecido cardíaco foi mensurado por HPLC ($\mu\text{g/g}$). **Resultados:** A dieta rica em açúcar e gordura gerou obesidade. Os animais obesos tiveram remodelamento e disfunção cardíaca, hipertensão, aumento do perfil inflamatório e estresse oxidativo cardíaco. Os animais obesos que receberam bergamota tiveram menor níveis de pressão arterial, não desenvolveram remodelamento e disfunção cardíaca, estresse oxidativo e inflamação cardíaca. O extrato de fruto de bergamota contém ABs histamina (28), tiramina (6), triptamina (186), putrescina (29), cadaverina (11), espermina (2), serotonina (4), dopamina (2), destacando as antioxidantes espermidina (35) e agmatina (140). 8 ABs foram encontradas no tecido cardíaco. A obesidade aumentou a serotonina e diminuiu agmatina, putrescina, cadaverina e espermidina. **Conclusão:** A suplementação com o extrato do fruto bergamota previne a disfunção cardíaca induzida pela obesidade, controlando os mediadores inflamatórios, e, principalmente, os do estresse oxidativo. Aminas biogênicas como agmatina, putrescina, cadaverina e serotonina podem ser novos biomarcadores para a saúde cardiovascular na obesidade.

Palavras-chave: subproduto, remodelamento cardíaco, hipertensão, agmatina, serotonina.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the effect of supplementation with bergamot fruit extract (*Citrus bergamia*) in preventing obesity-induced cardiac dysfunction and investigate the effects on inflammatory and oxidative stress mediators. Additionally, verify the relationship between biogenic amines and cardiac dysfunction. **Materials and methods:** 48 Wistar rats were divided equally into 4 groups: control (C), C + Bergamot (B), obese (O), and O + B. Obesity was induced by a diet rich in sugar and fat. Bergamot fruit extract was administered by gavage (250 mg/kg/day) for 20 weeks. Obesity was assessed using the adiposity index. A Doppler-Echocardiographic study, tail plethysmography, Western Blotting of proteins related to inflammation in the heart muscle, and inflammatory and cardiac oxidative stress markers were performed. The profile of biogenic amines (BAs) of the fruit and heart tissue was measured by HPLC ($\mu\text{g/g}$). **Results:** The diet rich in sugar and fat led to obesity. Obese animals had cardiac remodeling and dysfunction, hypertension, increased inflammatory profile, and cardiac oxidative stress. Obese animals that received bergamot had lower blood pressure levels and did not develop cardiac remodeling and dysfunction, oxidative stress, and cardiac inflammation. Bergamot fruit extract contains ABs histamine (28), tyramine (6), tryptamine (186), putrescine (29), cadaverine (11), spermine (2), serotonin (4), dopamine (2), highlighting the antioxidants spermidine (35) and agmatine (140). 8 ABs were found in cardiac tissue. Obesity increased serotonin and decreased agmatine, putrescine, cadaverine, and spermidine. **Conclusion:** Supplementation with bergamot fruit extract prevents obesity-induced cardiac dysfunction, controlling inflammatory mediators, and especially oxidative stress. Biogenic amines such as agmatine, putrescine, cadaverine, and serotonin may be new biomarkers for cardiovascular health in obesity.

Keywords: byproduct, cardiac remodeling, hypertension, agmatine, serotonin.

Resumo para sociedade

Introdução: O principal objetivo da nossa espécie é sobreviver e, para isso, precisamos comer. Nos tempos dos homens das cavernas, tínhamos que caçar e não tínhamos fácil acesso a alimentos. Então, nosso corpo desenvolveu mecanismos para armazenar energia quando tivéssemos acesso a ela, como depois de matar um grande animal, e sobreviver. Nós armazenamos energia na forma de gordura no nosso tecido adiposo. Mas, os tempos mudaram. Já não precisamos mais caçar, o sedentarismo cresceu e, agora, é só pedir comida no aplicativo que em 30 minutos estará na porta da nossa casa. Além disso, esta comida, geralmente, é rica em açúcar e gordura, deixando os alimentos mais calóricos e menos saudáveis. Ou seja, nós temos fácil acesso a muita energia e não precisamos mais gastá-la. Resultado? Nosso corpo acumula gordura em excesso e nos tornamos obesos. A obesidade aumenta a produção de moléculas que fazem mal ao organismo, aumentando o estresse oxidativo e a inflamação. Quando estas moléculas atingem os órgãos, geram doenças, como as doenças cardiovasculares (DCV). As DCV são a maior causa de morte atualmente, sendo responsáveis por 1 a cada 3 mortes, e geram mais de U\$ 1 bilhão de gastos anualmente. Mas, nem tudo está perdido. Se conseguirmos controlar a inflamação e o estresse oxidativo gerados pela obesidade, talvez possamos prevenir as DCV. As frutas cítricas são promissoras. A Bergamota, que parece um limão siciliano da Itália, tem um suco rico em compostos antioxidantes e anti-inflamatórios. Ao mesmo tempo, se conseguirmos descobrir novas moléculas relacionadas ao desenvolvimento das DCV, poderemos tratá-las mais rápido e de maneira mais assertiva. As aminas biogênicas são moléculas relacionados ao metabolismo de proteínas, e adivinha só? O coração é um órgão proteico, um músculo! Então, também é importante identificar a relação destas moléculas com as DCV. Então, o objetivo deste mestrado foi ver a influência do suco da bergamota nas DCV na obesidade, e entender as relações das DCV com as aminas biogênicas. **Como foi feito:** Ratos foram divididos em 4 grupos para induzirmos a obesidade com uma dieta rica em açúcar e gordura, ou seja, uma dieta não saudável. Eles também receberam suco de bergamota todo dia durante 20 semanas. Nós medimos a pressão arterial dos animais, avaliamos a estrutura e função do coração e medimos marcadores de inflamação e estresse oxidativo cardíacos. Por fim, também vimos perfil de aminas biogênicas no coração. E, é claro, tudo isso foi aprovado por um comitê de ética responsável por avaliar todos os procedimentos e estudos com animais. **Resultados:** Os animais que consumiram a dieta não saudável ficaram obesos, pioraram a estrutura e a função do coração e tiveram hipertensão, ou seja, tiveram DCV. Estes animais obesos também tiveram maior estresse oxidativo e inflamação no coração. Quando os animais receberam o suco da bergamota, eles continuaram obesos, mas tiveram menor pressão arterial, não desenvolveram DCV, estresse oxidativo e nem inflamação no coração. Vimos também que as aminas agmatina e serotonina tem bastante relação com as DCV. **Conclusão:** O suco da bergamota diminuiu as DCV que a obesidade gerou, por controlar o estresse oxidativo e a inflamação no coração. Adicionalmente, agmatina e serotonina, tem forte relação com a saúde do coração e podem ajudar no diagnóstico e tratamento destas doenças no futuro.

Lista de Ilustrações

Capítulo 2

Figure 1. Systolic blood pressure (mmHg) of Wistar rats fed with a high sugar-fat diet and that received bergamot by-product administration.....76

Capítulo 3

Graphical Abstract.....81

Figure 1. Obesity induced in male Wistar rats.....86

Figure 2. Cardiac NF κ B and NF κ B-P expression, normalized by GAPDH, by Western blot, and NF κ B/NF κ B-P expression ratio in cardiac tissue of obese rats supplemented with bergamot.....90

Figure 3. Cardiac NRF2 and KEAP1 expression, normalized by GAPDH, by Western blot and NRF2/ KEAP1 expression ratio in cardiac tissue of obese rats supplemented with bergamot.....91

Figure 4. Cardiac inflammatory markers in cardiac tissue of obese rats supplemented with bergamot.....92

Figure 5. Cardiac oxidative stress markers in cardiac tissue of obese rats supplemented with bergamot.....93

Capítulo 4

Figure 1. Inflammatory (A and B) and oxidative stress (C , D, and E) markers in cardiac tissue of obese rats.....112

Figure 2. Influence of obesity in the cardiac profile of biogenic amines...112

Figure 3. Correlation matrix among obesity, biochemical parameters, cardiovascular parameters, cardiac biogenic amines, cardiac inflammatory and oxidative stress markers.....113

Figure 4. Pearson' s or Spearman' s correlation with simple linear regression between biogenic amines and markers of cardiac remodeling.....113

Figure 5. Pearson' s or Spearman' s correlation with simple linear

regression between biogenic amines, markers of cardiac dysfunction , and hypertension.....115

Figure 6. Principal Component Analysis (PCA) of the obesity, biochemical parameters, cardiovascular parameters, cardiac biogenic amines profile, and cardiac inflammatory and oxidative stress markers normalized by median and after auto-scaling (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable).....116

Graphical Abstract final.....120

Lista de tabelas

Capítulo 2

Table 1. Total phenolic compounds, total flavonoids, total carotenoids, and total antioxidant capacity in bergamot by-product.....75

Table 2. Nutritional profile and cardiac tissue superoxide dismutase activity of Wistar rats fed with a high sugar-fat diet and that received bergamot by-product administration.....76

Table 3. Biogenic amines profile of bergamot by-product.....76

Capítulo 3

Table 1. Doppler echocardiography of obese rats supplemented with bergamot.....89

Capítulo 4

Table 1. Obesity and biochemical parameters.....110

Table 2. Doppler echocardiography and systolic blood pressure study...111

LISTA DE ABREVIATURAS

€	Euros
5-HIAA	5-hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
ABs	Aminas biogênicas
AdipoR1	Receptor de adiponectina 1
AdipoR2	Receptor de adiponectina 2
AGL	Ácidos Graxos Livres
AOS	Apneia obstrutiva do sono
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CCR2	Receptor de quimiocina tipo 2
DCV	Doenças cardiovasculares
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMT	Histamina-N-metiltransferase
HPLC	High-performance liquid chromatography
IKKβ	I κ B Kinase Beta
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IκB	Inibidor de κ B
JNK	C-Jun N-terminal quinase

LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAO	Monoamina oxidase
MAP quinases	Quinases ativadas por mitógeno
MASLD	Hepatite Esteatótica Associada ao Metabolismo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MDA	Malondialdeído
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NRF2	Fator 2 Relacionado ao NF-E2
PAMPs	Padrão molecular associado a patógenos
R\$	Reais
RE	Retículo endoplasmático
SMOX	Espermina oxidase
SOD	Superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
Th1	Células T helper tipo 1
Th17	Células T helper tipo 17
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
Tregs	T Regulatórias
US\$	Dólares americanos

SUMÁRIO

Introdução à dissertação.....	22
Capítulo 1. Revisão de Literatura.....	24
1. História.....	25
2. Obesidade.....	31
2.1 Inflamação.....	32
2.2 Estresse oxidativo.....	41
3. Disfunção cardíaca.....	50
4. Bergamota (<i>Citrus bergamia</i>).....	55
5. Aminas biogênicas e saúde cardiovascular.....	58
5.1 Triptamina e saúde cardiovascular.....	61
5.2 Espermina e saúde cardiovascular.....	62
5.3 Histamina e saúde cardiovascular.....	63
5.4 Serotonina e saúde cardiovascular.....	64
5.5 Putrescina e saúde cardiovascular.....	66
5.6 Cadaverina e saúde cardiovascular.....	67
5.7 Agmatina e saúde cardiovascular.....	68
5.8 Spermidina e saúde cardiovascular.....	69
6. Justificativa e Hipótese.....	70
7. Objetivo geral.....	70
7.1 Objetivos específicos.....	71
Capítulo 2. Artigo científico 1.....	72
<i>Bergamot by-product, a source of biogenic amines, reduces hypertension induced by high sugar-fat diet.....</i>	<i>73</i>
Capítulo 3. Artigo científico 2.....	80
<i>Bergamot supplementation prevents cardiac dysfunction and remodeling in obese rats.....</i>	<i>81</i>
Capítulo 4. Artigo científico 3.....	107
<i>Cardiac biogenic amine profile and its relationship with parameters of cardiovascular disease in obesity.....</i>	<i>108</i>
Conclusão.....	119

Considerações finais.....	120
Realizações no período.....	121
Referências bibliográficas.....	124

Introdução à dissertação

Esta dissertação de Mestrado do aluno Matheus Antônio Filiol Belin, com o título “Potencial terapêutico da suplementação com extrato do fruto de bergamota (*Citrus bergamia*) na prevenção da disfunção cardíaca induzida pela obesidade: relação com mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e a participação de aminas biogênicas”, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Camila Renata Correa, será apresentada em cinco capítulos.

No Capítulo 1, está inserida a Revisão de Literatura. Este tópico contempla uma introdução sobre a humanidade e os mecanismos desenvolvidos para preservação de energia e sobrevivência desta espécie; as mudanças no estilo de vida que culminaram no aumento da prevalência da obesidade; como esta doença gera estresse oxidativo e inflamação; e os mecanismos fisiopatológicos do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a disfunção cardíaca, na obesidade. Adicionalmente, é revisada a bergamota (*Citrus bergamia*) e sua potencial aplicação na prevenção de doenças cardiovasculares; assim como o potencial uso das aminas biogênicas como marcadores das doenças cardiovasculares na obesidade, podendo contribuir tanto para identificação precoce, quanto para aumento da efetividade do tratamento destas doenças.

Após a conexão com os objetivos, no Capítulo 2, é apresentado o artigo “*Bergamot by-product, a source of biogenic amines, reduces hypertension induced by high sugar-fat diet*” publicado na revista *Pharmacological Research - Natural Products* (<https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100022>). No Capítulo 3, é apresentado o artigo “*Bergamot supplementation prevents cardiac dysfunction and remodeling in obese rats*”, submetido à revista *Free Radical Biology and Medicine*. E, no Capítulo 4, encontra-se o artigo “*Cardiac biogenic amine profile and its relationship with parameters of cardiovascular disease in obesity*”, aceito para publicação na revista *Vascular Pharmacology* (<https://doi.org/10.1016/j.vph.2024.107412>).

Por fim, há o Capítulo 5, com as considerações finais desta dissertação, seguido da conclusão e de outras atividades realizadas durante o período do mestrado.

Capítulo 1. Revisão de Literatura

1. História

Os primórdios da humanidade remontam a um período crucial na história evolutiva da espécie. A jornada dos ancestrais humanos começou há milhões de anos, com os primeiros hominídeos surgindo na África durante o Mioceno, há aproximadamente 7 milhões de anos (Brunet *et al.*, 2002). Esses primeiros hominídeos, que incluem espécies como *Sahelanthropus tchadensis* e *Ardipithecus ramidus*, apresentavam características tanto de primatas quanto de humanos modernos, marcando o início de uma longa linha de evolução que levaria ao *Homo sapiens* (Boyle & Wood, 2020).

Durante o Plioceno, há cerca de 4 milhões de anos, surgiram os *Australopithecus*, hominídeos que caminhavam eretos e exibiam uma combinação de traços primitivos e modernos (Ward, 2002). A descoberta de "Lucy", um esqueleto de *Australopithecus afarensis* datado de aproximadamente 3,2 milhões de anos, forneceu evidências significativas sobre a locomoção bípede e a vida dos ancestrais humanos (Sellers *et al.*, 2005). O bipedalismo foi uma adaptação crucial, permitindo uma melhor visão do ambiente, liberação das mãos para o uso de ferramentas e uma maior eficiência energética na locomoção (Lieberman, 2011).

À medida que os hominídeos evoluíam, surgiram espécies mais avançadas, como o *Homo habilis*, há cerca de 2,4 milhões de anos (Kimbel, 2009). O *Homo habilis*, conhecido como "homem habilidoso", foi um dos primeiros a utilizar ferramentas de pedra, marcando o início da Idade da Pedra e uma nova era de inovação tecnológica (Schick & Toth, 1994). A capacidade de criar e usar ferramentas proporcionou vantagens significativas na obtenção de alimentos e na defesa contra predadores, impulsionando a sobrevivência e o desenvolvimento cognitivo (Ko, 2016).

A evolução continuou com o aparecimento do *Homo erectus*, há aproximadamente 1,9 milhões de anos (Antón, 2003). O *Homo erectus* não só aprimorou o uso de ferramentas, mas também demonstrou o controle do fogo, uma conquista monumental que transformou a vida dos hominídeos (Parker *et al.*, 2016). O fogo proporcionou calor, proteção contra predadores

e a capacidade de cozinhar alimentos, aumentando o valor nutritivo e a digestibilidade das dietas (Wrangham & Carmody, 2010). Além disso, o *Homo erectus* foi o primeiro a migrar para fora da África, colonizando regiões da Ásia e da Europa e demonstrando uma capacidade sem precedentes de adaptação a novos ambientes (Bar-Yosef & Belfer-Cohen, 2001).

Finalmente, o surgimento do *Homo sapiens*, há cerca de 300 mil anos, representou o auge da evolução hominídea (Stringer, 2016). Com uma capacidade cognitiva altamente desenvolvida, linguagem complexa e habilidades sociais avançadas, o *Homo sapiens* começou a criar arte, estabelecer culturas e construir sociedades complexas (Sterelny, 2011). A partir da África, os ancestrais hominídeos se espalharam pelo mundo, adaptando-se a uma vasta gama de ecossistemas e desenvolvendo tecnologias e culturas diversas (Kingston, 2007).

Os primórdios da humanidade são, portanto, repletos de adaptação e inovação durante mais de 7 milhões de anos. Desde os primeiros passos eretos dos *Australopithecus* até a expansão global do *Homo sapiens*, cada avanço na evolução humana contribuiu para a sobrevivência e o florescimento da espécie humana. Compreender essa jornada não só ilumina o passado, mas também oferece insights sobre a natureza humana e as forças que moldam destino desta espécie. É importante salientar que os objetivos centrais de todo organismo vivo são sobreviver e reproduzir (Jaques, 2001), e para isso, a espécie humana enfrentou um grande desafio durante todo o período descrito acima: a disponibilidade energética, através do acesso a alimentos (McMichael *et al.*, 2007).

Como os humanos precisavam plantar, caçar ou coletar alimentos para se alimentar, nem sempre havia alimentos disponíveis e, conseqüentemente, aporte energético através da alimentação. Deste modo, os mecanismos de armazenamento de energia no tecido adiposo foram fundamentais para a sobrevivência humana, especialmente em períodos de escassez de alimentos (Norgan, 1997). O tecido adiposo, comumente conhecido como gordura, desempenha um papel crucial na regulação do

balanço energético do corpo humano, servindo como uma reserva vital de energia que pode ser mobilizada quando a ingestão calórica é insuficiente para atender às necessidades metabólicas (Richard *et al.*, 2020).

O processo de armazenamento de energia no tecido adiposo começa com a ingestão de alimentos. Os macronutrientes presentes na dieta, como carboidratos, proteínas e gorduras, são metabolizados e transformados em moléculas menores que podem ser utilizadas pelo corpo. Os carboidratos são convertidos em glicose, que é utilizada imediatamente para produção de energia ou armazenada no fígado e nos músculos na forma de glicogênio (Scanes, 2022). Quando a ingestão calórica excede as necessidades imediatas do corpo, o excesso de glicose é convertido em ácidos graxos e armazenado no tecido adiposo na forma de triglicerídeos (Scanes, 2022).

Os triglicerídeos são a principal forma de armazenamento de energia no tecido adiposo. Eles são compostos por uma molécula de glicerol ligada a três ácidos graxos e são armazenados em células especializadas chamadas adipócitos (Morigny *et al.*, 2021). Esses adipócitos têm a capacidade de expandir seu volume para acomodar grandes quantidades de triglicerídeos, funcionando como uma reserva de energia de longo prazo (Morigny *et al.*, 2021).

Em momentos de falta de calorias provenientes da alimentação, o corpo ativa uma série de mecanismos para mobilizar essa energia armazenada. A principal via metabólica envolvida é a lipólise, um processo pelo qual os triglicerídeos armazenados nos adipócitos são quebrados em ácidos graxos livres e glicerol (Yang & Mottillo, 2020). Esses produtos são liberados na corrente sanguínea e transportados para os tecidos que necessitam de energia (Yang & Mottillo, 2020).

Os ácidos graxos livres podem ser oxidados pelas mitocôndrias das células para produzir Trifosfato de adenosina (ATP), a principal moeda de energia do corpo. Esse processo, conhecido como beta-oxidação, ocorre principalmente no fígado e nos músculos esqueléticos (Merritt *et al.*, 2020). O glicerol, por sua vez, pode ser utilizado pelo fígado para a produção de

glicose através da gliconeogênese, fornecendo uma fonte adicional de energia durante períodos de jejum prolongado ou restrição calórica (Bideyan, *et al.*, 2021).

Além de fornecer energia, o tecido adiposo também desempenha um papel importante na regulação hormonal. Ele secreta adipocinas, como a leptina e a adiponectina, que influenciam o apetite, o metabolismo e a sensibilidade à insulina (Kojta *et al.*, 2020). Durante a escassez de alimentos, os níveis de leptina diminuem, sinalizando ao cérebro a necessidade de aumentar a ingestão calórica (estimulando a busca por alimentos) e diminuir o gasto energético, promovendo a conservação de energia (Kojta *et al.*, 2020).

Ou seja, o tecido adiposo contém uma reserva essencial de energia que permite o corpo humano sobreviver em tempos de escassez de alimentos. Através da lipólise e da mobilização de triglicerídeos, o organismo pode acessar essa energia armazenada para sustentar as funções metabólicas e garantir a sobrevivência. Esses mecanismos evolutivos foram fundamentais para a adaptação humana a ambientes com disponibilidade variável de alimentos e continuam a desempenhar um papel crucial na fisiologia energética.

Olhando novamente para o passado, desde os primórdios da humanidade, os seres humanos foram naturalmente fisicamente ativos, uma condição essencial para sua sobrevivência e reprodução (Lieberman, 2020). Os ancestrais hominídeos, incluindo espécies como o *Homo habilis* e o *Homo erectus*, dependiam da caça, coleta e migração constante para garantir seu sustento (Carrión *et al.*, 2011). Essas atividades exigiam altos níveis de esforço físico, tornando o sedentarismo praticamente inexistente.

A vida dos primeiros humanos era intrinsecamente ligada ao movimento. Caçadores-coletores percorriam grandes distâncias diariamente em busca de alimentos, água e abrigo (Marlowe, 2005). A caça de animais selvagens, a coleta de plantas comestíveis e a construção de ferramentas e abrigos eram tarefas que requeriam força, resistência e agilidade (Marlowe,

2005). Essa necessidade de atividade física moldou não apenas o corpo humano, mas também nossa fisiologia e comportamento.

A atividade física não apenas contribuía para a sobrevivência imediata dos primeiros humanos, mas também promovia benefícios fisiológicos significativos (Malina *et al.*, 2004). Um dos aspectos mais interessantes é a produção hormonal induzida pelo exercício, que tem um impacto profundo no bem-estar e na saúde mental, graças a liberação de uma série de hormônios e neurotransmissores que melhoram o humor e a sensação de bem-estar (Ren & Xiao, 2023).

Entre esses hormônios, as endorfinas merecem destaque. Conhecidas como "hormônios da felicidade", as endorfinas são produzidas pelo sistema nervoso central e pela glândula pituitária em resposta ao exercício (Ali *et al.*, 2021). Elas atuam como analgésicos naturais, aliviando a dor e promovendo uma sensação de euforia (Matei *et al.*, 2023). Esse efeito é um remanescente evolutivo que encorajava os ancestrais hominídeos a se envolverem em atividades físicas intensas, essencial para a obtenção de alimentos e a sobrevivência (Bouchard *et al.*, 2012).

Além das endorfinas, o exercício também estimula a liberação de dopamina, serotonina e norepinefrina, neurotransmissores que desempenham papéis cruciais na regulação do humor, do prazer e da motivação (Esch & Stefano, 2010; Pahlavani, 2023). Esses químicos não apenas ajudam a reduzir os níveis de estresse e ansiedade, mas também melhoram a qualidade do sono e a função cognitiva (Sejbuk *et al.*, 2022; Chellappa & Aeschbach, 2022).

No contexto evolutivo, a atividade física constante também ajudou a manter o equilíbrio energético e a composição corporal saudável. O acúmulo excessivo de gordura corporal, comum no estilo de vida moderno sedentário, era raro entre os caçadores-coletores (Pontzer *et al.*, 2018). O gasto energético elevado e a variabilidade na disponibilidade de alimentos ajudaram a prevenir a obesidade e as doenças metabólicas (Pontzer *et al.*, 2018).

Hoje, no entanto, o estilo de vida moderno contrasta fortemente com o dos ancestrais hominídeos. A Revolução Industrial, que começou no final do século XVIII, trouxe mudanças profundas e abrangentes na sociedade, economia e estilo de vida das populações. Com a mecanização da produção e o surgimento das fábricas, o trabalho manual e artesanal deu lugar ao trabalho em ambientes industriais, transformando radicalmente a forma como as pessoas viviam e trabalhavam. Uma das consequências mais notáveis dessa transformação foi o aumento do sedentarismo, a alteração dos hábitos alimentares e o aumento da prevalência de doenças crônicas, como a obesidade (Egger & Dixon, 2014). Tudo isso aconteceu muito rápido, em cerca de 250 a 300 anos, período muito breve se comparado aos 7 milhões de anos desde o surgimento do ser humano. Com isso, o corpo humano ainda enfrenta alguns desafios para garantir a sobrevivência e reprodução da espécie, entretanto, agora, em um novo cenário de abundância energética e sedentarismo.

Antes da Revolução Industrial, a maioria da população vivia em áreas rurais e estava envolvida em atividades agrícolas, que exigiam altos níveis de esforço físico. O trabalho no campo, a criação de animais e a produção de alimentos proporcionavam uma vida ativa e, em geral, uma alimentação mais saudável, baseada em produtos frescos e não processados. No entanto, com a migração em massa para as cidades em busca de trabalho nas fábricas, o estilo de vida mudou drasticamente (Fardet & Rock, 2020).

O trabalho nas fábricas era muitas vezes repetitivo e exigia longas horas em posições fixas, o que reduzia significativamente a atividade física. As jornadas de trabalho extensas, que podiam durar de 10 a 16 horas diárias, deixavam pouco tempo e energia para atividades físicas recreativas. Além disso, as condições de trabalho eram frequentemente insalubres, contribuindo para a deterioração da saúde dos trabalhadores (Allen, 2017).

A urbanização acelerada também teve um impacto negativo nos hábitos alimentares. Com o aumento da população urbana, houve uma maior demanda por alimentos baratos e de fácil acesso. Isso levou ao crescimento

da indústria alimentícia e à proliferação de alimentos processados, ricos em açúcar, sal e gorduras saturadas (Black, 2016). Esses alimentos, embora convenientes, são nutricionalmente pobres em comparação com a dieta tradicional baseada em alimentos frescos e não processados (Cediel *et al.*, 2021). A combinação de sedentarismo e má alimentação criou um ambiente propício para o aumento da prevalência de doenças crônicas, especialmente a obesidade (Park *et al.*, 2020).

2. Obesidade

A obesidade, definida pelo excesso de gordura corporal (Piché *et al.*, 2020), cresce consistentemente desde 1970 e até 2030 atingirá 30% da população, ou seja, 2,5 bilhões de pessoas (Coker *et al.*, 2023). Esta doença é complexa e decorre da combinação de fatores individuais (genética, estilo de vida, doenças de base, transtorno alimentar, inatividade física) e coletivos (infraestrutura, ultraprocessados, insegurança alimentar, dentre outros) (De Lorenzo *et al.*, 2020). Apesar disso, o fator indispensável para o desenvolvimento e progressão da obesidade é o superavit calórico, ou seja, maior quantidade de calorias ingeridas do que calorias despendidas com sobrevivência, atividades diárias, digestão e metabolização e atividade física (Hall, 2023), o que é facilmente atingido através do consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura, extremamente calóricos. Logo, entende-se que o fator necessário para o controle da obesidade é o déficit calórico, despender mais calorias do que são consumidas (Johnson *et al.*, 2022). Porém, como visto acima, esta doença é complexa, e diversos são os desafios para atingir e sustentar um déficit calórico de maneira longitudinal. Sendo assim, a obesidade continua crescendo juntamente com suas repercussões negativas à saúde da população.

Em condições de superávit calórico, o excesso calórico pode ser estocado sob a forma de triacilglicerol no tecido adiposo, gerando expansão desse órgão através de adaptações celulares como, hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos (Kawai *et al.*, 2021). Embora esses processos sejam

fisiologicamente necessários, a sobrecarga de gordura no citoplasma dessas células estimula a produção exacerbada de diversas substâncias conhecidas como adipocinas (Ahmed *et al.*, 2021). O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e a interleucina-1 beta (IL-1 β) recebem atenção especial por promover grande impacto na migração de células do sistema imunológico para o tecido adiposo, intensificando o processo inflamatório (Liu *et al.*, 2021). Todavia, quando esse evento se torna crônico, as citocinas atingem níveis sistêmicos, alcançam os órgãos e desenvolvem inflamação local, que pode levar à disfunção e falência dos órgãos e doenças, como resistência insulínica e disfunção endotelial, síndrome metabólica, esteatose hepática, doença renal e doenças cardiovasculares (Wu & Ballantyne, 2020; Lemieux & Després, 2020; Luo & Lin, 2021; Wang *et al.*, 2022; Powell-Wiley *et al.*, 2021).

2.1 Inflamação

Existe um cenário pró-inflamatório gerado pela obesidade. O tecido adiposo, como um órgão endócrino ativo, secreta uma variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias, conhecidas como adipocinas (Balistreri *et al.*, 2010). Na obesidade, o adipócito se torna disfuncional. Estas células sofrem alterações estruturais (hipertrofia e hiperplasia) e funcionais que contribuem para a liberação aumentada de adipocinas pró-inflamatórias e para a resistência à insulina, ampliando o estado inflamatório (Balistreri *et al.*, 2010). A disfunção do adipócito também está intimamente ligada à resistência à insulina, um fenômeno caracterizado pela incapacidade das células-alvo de responder adequadamente à insulina (Al-Mansoori *et al.*, 2022). Em indivíduos obesos, adipócitos disfuncionais têm menor capacidade de armazenar lipídios de forma eficiente, levando a um aumento de ácidos graxos livres (AGL) circulantes (Ahmed *et al.*, 2021). Os altos níveis de AGL interferem na sinalização da insulina em outros tecidos, como músculo esquelético e fígado, exacerbando a resistência à insulina (Ahmed *et al.*, 2021). A sobrecarga lipídica nos adipócitos de

indivíduos obesos também pode levar à disfunção mitocondrial, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e contribuindo para o estresse oxidativo celular (Prasun, 2020). Isso não apenas danifica as células adiposas, mas também amplifica a inflamação local. A obesidade também pode gerar mudanças epigenéticas nos adipócitos, como a metilação do DNA e modificações pós-translacionais de histonas, que podem alterar a expressão gênica associada à inflamação e à resistência à insulina (Castellano-Castillo *et al.*, 2020). Essas modificações são influenciadas por fatores ambientais, incluindo dieta e níveis de atividade física, e podem perpetuar a disfunção adipocitária ao longo do tempo (Ramos-Lopez *et al.*, 2021).

Em indivíduos obesos, a alteração na secreção de adipocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β e MCP-1, leptina, resistina e adiponectina, influencia diretamente a resposta imune e a inflamação (Kirichenko *et al.*, 2022). Estas adipocinas atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina para regular processos metabólicos e imunológicos (Kirichenko *et al.*, 2022). O TNF- α é uma citocina chave na inflamação associada à obesidade. Ela é produzida por macrófagos infiltrados no tecido adiposo e por adipócitos estimulados pelo aumento do tecido adiposo, e promove a inflamação local ao induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e MCP-1 (Herrada *et al.*, 2021). Além disso, contribui para a resistência à insulina, interferindo na sinalização da insulina em células adiposas e musculares (Khalid *et al.*, 2021). Também afeta o fígado (induzindo a produção de proteínas de fase aguda), músculo esquelético (interferindo no metabolismo de lipídios e glicose) e células endoteliais (promovendo a inflamação vascular) (de Oliveira dos Santos *et al.*, 2021). A IL-6 é produzida tanto por adipócitos quanto por células imunes em resposta ao estresse metabólico (Michailidou *et al.*, 2022). Ela desempenha papéis complexos na regulação da inflamação e do metabolismo, podendo ser considerada uma citocina multifuncional que desempenha papéis tanto pró-inflamatórios quanto anti-inflamatórios, dependendo do contexto (Aliyu

et al., 2022). IL-6 estimula a produção hepática de proteínas de fase aguda e promove a diferenciação de células T pró-inflamatórias (Ehlting *et al.*, 2021). Em indivíduos obesos, IL-6 está associada à resistência à insulina, dislipidemia e inflamação vascular, contribuindo para o risco aumentado de doenças cardiovasculares (Battineni *et al.*, 2021). Já a MCP-1 atua como um quimiotactante para atrair monócitos e macrófagos para o tecido adiposo inflamado (Singh *et al.*, 2021). Produzida por adipócitos e células estromais em resposta ao estresse metabólico, MCP-1 desempenha um papel crucial na inflamação do tecido adiposo e na formação de células de espuma no contexto da aterosclerose (Malekmohammad *et al.*, 2021). Sistemicamente, MCP-1 está associada à inflamação vascular e à progressão das doenças cardiovasculares, conectando a inflamação do tecido adiposo com complicações sistêmicas (Kawai *et al.*, 2021). A IL-1 β , uma citocina inflamatória potente e importante na resposta imune e inflamatória, é secretada por macrófagos ativados (Cavalli *et al.*, 2021). Em obesos, ela aumenta a inflamação crônica local e sistêmica, contribuindo com a patogênese de doenças metabólicas e cardiovasculares associadas à obesidade (Varra *et al.*, 2024). Já a resistina é uma adipocina pró-inflamatória associada à resistência à insulina e inflamação (Shin *et al.*, 2022). Ela é secretada principalmente por adipócitos e contribui para a inflamação do tecido adiposo através da ativação de vias inflamatórias, como a via do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) (Ren *et al.*, 2022). Sistemicamente, está implicada na resistência à insulina, disfunção endotelial e inflamação vascular, contribuindo para a patogênese de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Askin *et al.*, 2022). A leptina é uma adipocina crucial na regulação do apetite e do metabolismo energético (Kiernan & MacIver, 2021). Em indivíduos obesos, os níveis de leptina estão frequentemente elevados devido à resistência à leptina (Obradovic *et al.*, 2021). Além de seu papel na regulação do apetite, a leptina também tem propriedades pró-inflamatórias, promovendo a ativação de células T e a produção de

citocinas inflamatórias (Kiernan & MacIver, 2021). Sistemicamente, a leptina pode contribuir para a inflamação e está associada à resistência à insulina e à disfunção cardiovascular em indivíduos obesos (Poetsch *et al.*, 2020). Além de suas funções no tecido adiposo, como visto, estas adipocinas pró-inflamatórias têm efeitos sistêmicos significativos que contribuem para as complicações associadas à obesidade, incluindo resistência à insulina, disfunção endotelial, inflamação vascular e aumento do risco de doenças cardiovasculares e metabólicas. Compreender estes mecanismos é crucial para o desenvolvimento de terapias direcionadas que possam modular a resposta inflamatória e melhorar os desfechos clínicos em indivíduos obesos. Entretanto, nem todas as citocinas provenientes do tecido adiposo são pró-inflamatórias. A adiponectina é uma adipocina com propriedades anti-inflamatórias (Jung & Jung, 2021), mas está reduzida na obesidade, contribuindo para o desequilíbrio pró-inflamatório (Choi *et al.*, 2020). A adiponectina é uma proteína de alto peso molecular que pertence à família das proteínas de complemento tipo C1q (Ye *et al.*, 2020). Ela possui uma estrutura complexa com um domínio N-terminal globular e um domínio C-terminal colagenoso que se conecta a cinco unidades de adiponectina em sua forma hexamérica ou trimerizada (Khoramipour *et al.*, 2021). Esta adipocina exerce seus efeitos principalmente através da ligação a receptores específicos, como o receptor de adiponectina 1 (AdipoR1) e o receptor de adiponectina 2 (AdipoR2), presentes em diversos tecidos, incluindo o fígado, músculo esquelético, coração e células do sistema imunológico. Sua expressão é influenciada por vários fatores, como insulina, ácidos graxos livres, citocinas e hormônios sexuais (Khoramipour *et al.*, 2021). Em condições de obesidade, ocorre uma redução na expressão e secreção de adiponectina, principalmente devido à disfunção do tecido adiposo e à inflamação crônica associada (Kawai *et al.*, 2021). Na obesidade, ainda existem alterações epigenéticas, como a metilação do DNA e a modificação das histonas, que podem afetar a expressão gênica da adiponectina,

contribuindo para sua diminuição (Un Nisa & Reza, 2020). Funcionalmente, esta adipocina tem a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e MCP-1, em células inflamatórias e tecidos adiposos, auxiliando na modulação da resposta inflamatória e na redução do estado inflamatório associado à obesidade (Luo & Liu, 2022). A adiponectina também melhora a sensibilidade à insulina, aumentando a captação de glicose e a oxidação de ácidos graxos nos músculos esqueléticos e no fígado, o que é crucial para a homeostase energética e metabólica (Choi *et al.*, 2020). Porém, como dito, encontra-se diminuída na obesidade e estes efeitos não são exercidos.

Outro mecanismo que corrobora para o aumento da inflamação é na obesidade é a alteração da resposta imune, tanto a imune adaptativa e inata. As células T, por exemplo, são moduladas pelo ambiente inflamatório induzido pela obesidade, afetando a homeostase imunológica e promovendo inflamação de baixo grau (Park & Shastri, 2022). A obesidade altera o ambiente local e sistêmico das células T, afetando sua diferenciação e função (Park & Shastri, 2022). Há um aumento na proporção de células T helper tipo 1 (Th1) e células T helper tipo 17 (Th17), que são associadas a respostas pró-inflamatórias (Park & Shastri, 2022). A resposta das células T a antígenos também pode ser comprometida em indivíduos obesos, devido a uma redução na diversidade do repertório de células T e a uma resposta imune menos eficaz (Shirakawa & Sano, 2021). Em adição, existe prejuízo das células T Regulatórias (Tregs). As Tregs desempenham um papel crucial na manutenção da tolerância imunológica e na supressão da resposta inflamatória (Alvarez *et al.*, 2020). Em indivíduos obesos, há uma diminuição na função supressora das Tregs, o que contribui para a inflamação crônica (Liu *et al.*, 2021). A obesidade também pode levar a uma perda da tolerância imunológica, onde o sistema imunológico não reconhece corretamente as próprias células e tecidos como "não perigosos", contribuindo para o desenvolvimento de doenças autoimunes (Tsigalou *et al.*, 2020). Em relação ao impacto na resposta

imune inata, destacam-se os efeitos sobre os macrófagos e células Natural Killer (NK). Na obesidade, os macrófagos no tecido adiposo de indivíduos obesos tendem a se polarizar para um fenótipo pró-inflamatório (M1), secretando citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, perpetuando a inflamação local e sistêmica (Gendre *et al.*, 2021). Ao mesmo tempo, as células NK, que desempenham um papel na defesa contra células tumorais e células infectadas, podem ter sua função comprometida pela obesidade, devido à exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias (Bähr *et al.*, 2020). Ainda estão presentes mecanismos de sinalização intracelular, como a ativação do fator de transcrição NF- κ B e da c-Jun N-terminal quinase (JNK), que medeiam a resposta inflamatória exacerbada em condições de obesidade. Essas vias são frequentemente ativadas em resposta ao estresse oxidativo, a TNF- α e a IL-6, e à presença de ácidos graxos livres no tecido adiposo; e promovem a produção de mais citocinas pró-inflamatórias e a perpetuação do estado inflamatório (Grosso *et al.*, 2022).

Como citado anteriormente, a obesidade também pode gerar modulação epigenética, como metilação do DNA e modificações pós-translacionais de histonas, influenciando a expressão gênica associada à inflamação e à resposta imune, exacerbando os efeitos da obesidade na saúde metabólica (Zatterale, 2022). A metilação do DNA é um processo epigenético que envolve a adição de grupos metil (CH₃) aos resíduos de citosina nas regiões promotoras ou *enhancer* dos genes (Acharjee *et al.*, 2023). Quando a metilação de histonas ocorre em resíduos de lisina ou arginina e pode estar associada tanto à ativação quanto ao silenciamento gênico, dependendo do local específico da modificação (Vanzan *et al.*, 2023). Em condições de obesidade, padrões anormais de metilação de histonas podem favorecer a expressão de genes que promovem a inflamação crônica e a disfunção metabólica (Zatterale *et al.*, 2022). A obesidade também pode gerar modificações pós-translacionais de histonas (Li *et al.*, 2022). As histonas são proteínas ao redor das quais o

DNA se enrola para formar a estrutura da cromatina (Maeshima *et al.*, 2021). Modificações pós-traducionais dessas histonas, como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, alteram a estrutura da cromatina e, consequentemente, a acessibilidade aos genes (Ramazi *et al.*, 2020). Em contextos de obesidade, essas modificações podem levar à ativação ou silenciamento de genes envolvidos na inflamação e na resposta imune (Budroni & Versteeg, 2021). Dentro da epigenética, a acetilação das histonas está geralmente associada a uma cromatina mais relaxada e à ativação da transcrição gênica (Fang *et al.*, 2022). Em indivíduos obesos, a acetilação de histonas específicas pode promover a expressão aumentada de genes pró-inflamatórios em células adiposas e em células imunes infiltradas no tecido adiposo (Jung & Kang, 2021).

As alterações epigenéticas também podem ter impactos na saúde metabólica. Modificações epigenéticas que aumentam a expressão de genes pró-inflamatórios e que interferem na sinalização da insulina podem contribuir diretamente para a resistência à insulina, um precursor comum do diabetes tipo 2 (Zatterale *et al.*, 2022). Em adição, a inflamação crônica mediada por modificações epigenéticas pode afetar a função endotelial, aumentando o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como aterosclerose e hipertensão (Pacinella *et al.*, 2022). Também existe uma predisposição a doenças autoimunes, pois alterações epigenéticas podem influenciar a regulação da resposta imune, aumentando a susceptibilidade a doenças autoimunes em indivíduos obesos (Zheng *et al.*, 2023). Ou seja, na obesidade, o cenário pró-inflamatório é extremamente amplificado por diversos mecanismos.

Os fatores de transcrição NF- κ B, c-Jun N-terminal quinase JNK e I κ B Kinase Beta (IKK β) são exemplos de fatores ativados em resposta ao estresse celular e que regulam a expressão de genes inflamatórios em células adiposas e imunes na obesidade. NF- κ B é um fator de transcrição crucial na regulação da resposta inflamatória (Rius-Pérez *et al.*, 2020). Em condições normais, está inativado no citoplasma por meio de interações

com inibidores, como o inibidor de κB (I κB) (Prescott *et al.*, 2021). No entanto, em condições de obesidade, a ativação de receptores de membrana, como receptores de citocinas (por exemplo, TNF- α) e receptores de padrão molecular associado a patógenos (PAMPs), desencadeia a fosforilação e degradação do I κB , permitindo a translocação do NF- κB para o núcleo (Szukiewicz, 2023). No núcleo celular, o NF- κB promove a transcrição de genes para citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1 e outras moléculas pró-inflamatórias (Babkina *et al.*, 2021). Como visto, em indivíduos obesos, o tecido adiposo frequentemente apresenta um estado de inflamação crônica de baixo grau. Macrófagos e outras células imunes infiltradas nesse tecido são estimuladas a secretar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α . A presença dessas citocinas ativa NF- κB nas células adiposas e outras células presentes no tecido adiposo, desencadeando uma cascata de eventos que amplifica a resposta inflamatória (Moraes *et al.*, 2022). Isso inclui a produção aumentada de mais citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão que recrutam mais células imunes para o tecido adiposo, perpetuando o ciclo inflamatório (Moraes *et al.*, 2022). A JNK é uma proteína quinase, da família das MAP quinases (quinases ativadas por mitógeno), ativada por estresse celular, incluindo estresse oxidativo, inflamação e resposta a danos no DNA (Yue & López, 2020). Ele está envolvido na regulação da expressão gênica através da fosforilação de proteínas-alvo, incluindo fatores de transcrição como c-Jun (Yung & Giacca, 2020). Em contextos inflamatórios, JNK é ativado por diversas vias, incluindo a sinalização de receptores de citocinas e estresse celular (Yung & Giacca, 2020). Em adipócitos e outras células do tecido adiposo, a ativação de JNK está associada à resistência à insulina, um marcador comum em indivíduos obesos (Yung & Giacca, 2020). JNK influencia diretamente a via de sinalização da insulina, inibindo a fosforilação do IRS (substrato do receptor de insulina), e interferindo na sinalização normal da insulina e na captação de glicose (Yung & Giacca, 2020). Além disso, JNK

promove a expressão de genes pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-6, que exacerbam a inflamação e contribuem para a disfunção metabólica observada na obesidade (Yung & Giacca, 2020). JNK também pode modular a expressão de genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico, que também está alterado na obesidade (Yung & Giacca, 2020). O IKK β faz parte do complexo IKK, que é responsável pela fosforilação do I κ B, marcando-o para degradação e, portanto, permitindo a translocação do NF- κ B para o núcleo (Prescott *et al.*, 2022). A ativação do IKK β é essencial para a ativação do NF- κ B e, conseqüentemente, para a indução da resposta inflamatória no tecido adiposo de indivíduos obesos (Prescott *et al.*, 2022). Somado a isso, alguns receptores, como o receptor de quimiocina tipo 2 (CCR2), são fundamentais para a migração de macrófagos e outras células imunes para o tecido adiposo inflamado (Xu *et al.*, 2022). O CCR2 é o receptor específico para MCP-1 e desempenha um papel central na sinalização celular mediada por MCP-1 (Singh *et al.*, 2021). Em resposta à ligação de MCP-1, CCR2 ativa vias de sinalização intracelular que promovem a adesão e a migração de monócitos e macrófagos para o local da inflamação no tecido adiposo (Moadab *et al.*, 2021). Células que expressam CCR2, como monócitos circulantes, são atraídas pelo gradiente de MCP-1, migrando do sangue para o tecido adiposo onde podem se diferenciar em macrófagos ativados (Yerra & Advani, 2021). Além CCR2, outros receptores de quimiocinas desempenham papéis importantes na migração celular e na modulação da inflamação no tecido adiposo, como CCR5 e CX3CR1. O CCR5 é expresso em células imunes, incluindo macrófagos, e é ativado por quimiocinas como CCL3, CCL4 e CCL5 (Aldinucci *et al.*, 2020). Ele também está implicado na migração de células imunes para tecidos inflamados (Aldinucci *et al.*, 2020), embora seu papel específico no contexto da obesidade precise ser mais estudado. Já CX3CR1 é um receptor é sensível à quimiocina CX3CL1 (fractalquina) e desempenha um papel na adesão e migração de células mononucleares, como monócitos e células

NK (Szukiewicz, 2024). A fractalquina é expressa em tecidos adiposos e está envolvida na regulação da resposta imune local (Friston *et al.*, 2020). Compreender as quimiocinas e seus receptores é fundamental para desenvolver estratégias terapêuticas direcionadas ao tratamento da inflamação associada à obesidade e suas comorbidades, como resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Adicionalmente ao cenário inflamatório gerado pela obesidade, nesta doença também existe outro importante fator que contribui para desenvolvimento de complicações sistêmicas, o estresse oxidativo, também conhecido como desequilíbrio do sistema redox (Čolak & Pap, 2021).

2.2 Estresse oxidativo

As EROs existem naturalmente em baixas concentrações nas células e tecidos, exercendo papel crucial na regulação de funções fisiológicas como os efeitos microbicidas desempenhado especificamente pelas células do sistema imunológico (Lam *et al.*, 2020). No entanto, quando as EROs são produzidas em excesso, sobrepondo as capacidades de defesas antioxidantes, acarretam o desequilíbrio do sistema redox (Kuczyńska *et al.*, 2022). Em condição de obesidade, o excesso de produção de EROs é consequência de alguns fatores como, sobrecarga mitocondrial do adipócito (Baldini *et al.*, 2021) e infiltração leucocitária decorrente da necrose do tecido adiposo (Kawai *et al.*, 2021).

O desequilíbrio do sistema redox é uma condição que, quando crônica, acarreta danos celulares e oxidação de biomoléculas como, lipídios e açúcares gerando, respectivamente, os produtos de lipoxidação e glicação, como malondialdeído, glioxal, acroleína, 4-hidroxinonenal, glioxal e metilglioxal, respectivamente (Engwa *et al.*, 2022). Todas essas substâncias, conhecidas como espécies carbonil, geram danos irreversíveis ao organismo por possuírem afinidade química com o grupamento amino dos aminoácidos, gerando proteínas carboniladas (Akagawa, 2021). Essa ligação promove mudança na estrutura proteica acarretando disfunção e falência dos órgãos

(Griendling *et al.*, 2016).

Nos indivíduos obesos, o tecido adiposo é uma fonte significativa de EROs devido à hiperativação dos adipócitos e ao aumento da atividade de macrófagos infiltrantes (Zatterale *et al.*, 2022). Com a hipertrofia e hiperplasia adipocitária, existe um aumento do metabolismo de ácidos graxos e subsequente produção de EROs como subproduto (De Fano *et al.*, 2022). As EROs, incluindo o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-), são moléculas altamente reativas que podem causar danos oxidativos às biomoléculas celulares, como proteínas, lipídios e DNA (Juan *et al.*, 2021). A superprodução de EROs nos adipócitos ocorre devido à sobrecarga mitocondrial e ao aumento da oxidação de ácidos graxos, especialmente quando a capacidade antioxidante celular é insuficiente para neutralizá-las (Taherkhani *et al.*, 2021). O aumento de EROs nos adipócitos contribui para a oxidação lipídica não controlada, resultando na formação de metabólitos lipídicos tóxicos, como ceramidas e ácidos graxos livres não esterificados (Ahmed *et al.*, 2021). Esses metabólitos, por sua vez, induzem lipotoxicidade, que é caracterizada pelo estresse oxidativo e pelo dano celular devido à acumulação excessiva de lipídios e à produção aumentada de EROs (Wasilewska & Lebensztejn, 2021). Além disso, a lipotoxicidade no tecido adiposo pode levar à disfunção na secreção de adipocinas, como adiponectina e leptina, que são importantes na regulação do metabolismo energético e na resposta inflamatória (Zhao *et al.*, 2021). Além dos adipócitos, a superprodução de EROs pode ocorrer nas células imunes residentes, como macrófagos, potencializando o estresse oxidativo no tecido adiposo (Ahmed *et al.*, 2021). Os macrófagos infiltrantes são componentes essenciais do tecido adiposo em condições de obesidade (Herrada *et al.*, 2021). Essas células imunes residentes são ativadas em resposta à inflamação crônica induzida pelo tecido adiposo disfuncional (Herrada *et al.*, 2021). Os macrófagos ativados não apenas secretam citocinas pró-inflamatórias, como $TNF-\alpha$ e IL-6, que contribuem para o

estado inflamatório, mas também aumentam a produção de EROs através da ativação de NADPH oxidase e outras vias enzimáticas (Canton *et al.*, 2021). A NADPH oxidase é responsável pela geração de superóxido (O_2^-), que pode ser convertido em outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), contribuindo para um ciclo de dano oxidativo e para a perpetuação do estado inflamatório (Knaus, 2021). Entretanto, o aumento do estresse oxidativo na obesidade não ocorre apenas pela disfunção adipocitária.

A obesidade também está associada à disfunção mitocondrial em diversos tecidos, como o músculo esquelético e fígado (Prasun, 2020). A disfunção mitocondrial resulta em uma menor eficiência da fosforilação oxidativa e em uma maior geração de EROs como subproduto (Ho & Shirakawa, 2022). Além disso, a disfunção mitocondrial contribui para o acúmulo de lipídios tóxicos, induzindo lipotoxicidade e exacerbando o estresse oxidativo (Ge *et al.*, 2020). No músculo esquelético de indivíduos obesos, a disfunção mitocondrial compromete a capacidade contrátil e a homeostase metabólica das fibras musculares (Tallis *et al.*, 2021). A redução na eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial limita a produção de ATP durante a contração muscular, resultando em fadiga precoce e redução da capacidade de exercício (MacDougall *et al.*, 2022). Além disso, a maior produção de EROs devido à disfunção mitocondrial no músculo esquelético contribui para o estresse oxidativo, resultando em danos oxidativos às proteínas, lipídios e DNA celular (Wang *et al.*, 2021). A acumulação de lipídios tóxicos no músculo esquelético, como triglicerídeos intramiocelulares e ácidos graxos livres, interfere na sinalização celular, levando à resistência à insulina e à disfunção metabólica (Park & Seo, 2020). Esses lipídios tóxicos podem ativar vias de estresse celular, como o estresse de retículo endoplasmático, exacerbando ainda mais a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo (Park & Seo, 2020). No fígado, a disfunção mitocondrial associada à obesidade está diretamente ligada à Hepatite Esteatótica Associada ao

Metabolismo (MASLD), uma condição caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado (esteatose) seguido de inflamação e lesão hepática (Schwärzler *et al.*, 2024). A acumulação de ácidos graxos livres no fígado devido à resistência à insulina e ao aumento da lipólise contribui para a sobrecarga mitocondrial e a produção aumentada de ERO (Geng *et al.*, 2021). Os hepatócitos respondem a esse estresse oxidativo aumentando a produção de antioxidantes endógenos, como glutatona e enzimas antioxidantes, na tentativa de neutralizar os EROs (Vairetti *et al.*, 2021). No entanto, em condições de obesidade prolongada, a capacidade antioxidante pode ser sobrecarregada, levando ao dano oxidativo das células hepáticas e à progressão para MASLD (Sokal-Dembowska *et al.*, 2024). Além disso, a disfunção mitocondrial no fígado está associada à alteração no metabolismo de lipídios, incluindo a síntese aumentada de ácidos graxos e a diminuição da oxidação de ácidos graxos, o que contribui para o acúmulo de lipídios tóxicos e à lipotoxicidade hepática (Geng *et al.*, 2021).

A lipotoxicidade prejudica o retículo endoplasmático (RE) por meio de diferentes mecanismos. O acúmulo excessivo de AGL no RE pode interferir na função das proteínas chaperonas que facilitam a dobragem correta das proteínas recém-sintetizadas, resultando em acumulação de proteínas mal dobradas no RE (Lemmer *et al.* 2021). Também por isso, pode haver prejuízo da resposta ao estresse do RE. Esta resposta ao estresse do RE é mediada por três vias principais: a via PERK, que inibe a tradução de proteínas (Zheng *et al.*, 2022); a via IRE1, que promove a degradação de mRNA específico (Jaud *et al.*, 2020); e a via ATF6, que ativa a expressão de genes que aumentam a capacidade de empacotamento/enovelamento das proteínas e a degradação de proteínas mal empacotadas/enoveladas (Ghemrawi & Khair, 2020). Por fim, durante o estresse de RE, a acumulação de proteínas mal dobradas pode levar à geração aumentada de EROs no RE e no citosol (Ghemrawi & Khair, 2020). Isso contribui para o estresse oxidativo celular, exacerbando os

danos às estruturas celulares e promovendo a progressão das doenças associadas à obesidade (Ghemrawi & Khair, 2020).

O estresse oxidativo pode ocorrer tanto pelo excesso de EROs, quanto pela deficiência de antioxidantes endógenos ou exógenos. O organismo possui um sistema antioxidante intrínseco composto por enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Demirci-Cekic *et al.*, 2022). Essas enzimas desempenham um papel crucial na neutralização de EROs e na proteção contra danos oxidativos. Em condições de obesidade, a capacidade antioxidante dessas enzimas pode ser comprometida devido à sobrecarga de ERO e à redução dos cofatores antioxidantes necessários para sua atividade, como o tripeptídeo glutathione (Sharifi-Rad *et al.*, 2020). A SOD, com isoformas localizadas em diferentes compartimentos celulares, como a SOD1 no citoplasma e a SOD2 na mitocôndria, é uma enzima chave que catalisa a conversão do superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Maurya & Namdeo, 2021). Esta conversão é crucial para reduzir a toxicidade do superóxido e preparar o H_2O_2 para neutralização posterior (Maurya & Namdeo, 2021). A CAT é uma enzima que converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma ERO intermediária, em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Duca & Travin, 2020). É especialmente abundante nos peroxissomos celulares e desempenha um papel crucial na proteção contra o acúmulo de H_2O_2 , que pode causar danos oxidativos significativos às células (Garcia-Caparrós *et al.*, 2021). A GPx é uma família de enzimas que utiliza glutathione reduzida (GSH) como cofator para reduzir H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos em água (Pei *et al.*, 2023). A glutathione peroxidase desempenha um papel crítico na proteção contra danos oxidativos nas células, especialmente na presença de estresse oxidativo elevado (Pei *et al.*, 2023). A glutathione é um tripeptídeo composto por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina. Ela desempenha múltiplos papéis na defesa antioxidante (Pei *et al.*, 2023). A forma reduzida de glutathione (GSH) atua diretamente na neutralização de EROs,

especialmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outras espécies reativas, convertendo-as em formas menos reativas (Sarıkaya & Doğan, 2020). A glutathione peroxidase utiliza GSH como cofator para reduzir H_2O_2 em água, protegendo as células contra danos oxidativos (Pei *et al.*, 2023). A glutathione também é essencial para a regeneração de outras moléculas antioxidantes, como a vitamina C e a vitamina E, tornando-se um componente crítico do sistema antioxidante (Averill-Bates, 2023). Em condições de obesidade, além da maior produção de ERO, pode ocorrer uma redução da capacidade antioxidante (Pérez-Torres *et al.*, 2021). A demanda aumentada por antioxidantes para neutralizar EROs pode levar a uma redução dos níveis de glutathione e outros cofatores antioxidantes no organismo (Corkey, 2023). Isso ocorre porque o metabolismo oxidativo elevado pode esgotar os estoques intracelulares de GSH, comprometendo a capacidade das enzimas antioxidantes de funcionarem adequadamente (Korac *et al.*, 2021). A inflamação crônica gerada pela obesidade também pode prejudicar a recuperação e a função da glutathione (Gasmi *et al.*, 2021). Somado a isso, a obesidade também está associada ao estresse do RE, que pode interferir na síntese e na dobragem adequada de proteínas, afetando indiretamente a função das enzimas antioxidantes (Menikdiwela *et al.*, 2021).

Além da glutathione, antioxidantes exógenos têm sido estudados por suas propriedades antioxidantes e potenciais benefícios na redução do estresse oxidativo associado à obesidade. A vitamina C (ácido ascórbico) é um antioxidante hidrossolúvel que atua principalmente na neutralização de ERO no citoplasma e no plasma (Gęgotek & Skrzydlewska, 2023). A vitamina C também regenera a forma reduzida da vitamina E, potencializando seu efeito antioxidante (Higgins *et al.*, 2020). A vitamina E, ou seja, tocoferóis e tocotrienóis, são antioxidantes lipossolúveis que protegem as membranas celulares contra a peroxidação lipídica induzida por EROs (Ciarcià *et al.*, 2022). A vitamina E também pode modular a atividade de genes envolvidos na resposta antioxidante (Ciarcià *et al.*,

2022). Compostos polifenólicos presentes em frutas e vegetais, como flavonoides, resveratrol, curcumina e outras substâncias bioativas, demonstraram propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Sobhani *et al.*, 2021). Esses compostos podem reduzir o estresse oxidativo e a inflamação associados à obesidade, além de oferecer outros benefícios à saúde (Sobhani *et al.*, 2021). Entretanto, condições de obesidade são associadas a maus hábitos alimentares, com baixo ou inexistente consumo de frutas e vegetais. Logo, além do aumento de EROs e prejuízo na síntese/regeneração de antioxidantes endógenos, antioxidantes exógenos também estão escassos.

Além da produção de EROs, a obesidade também pode aumentar a geração de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO-) (Abot *et al.*, 2022). A interação entre EROs e ERNs pode resultar na formação de espécies reativas ainda mais danosas, exacerbando o estresse oxidativo e contribuindo para danos celulares adicionais (Zarkovic, 2020). O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora essencial no organismo, envolvida em várias funções fisiológicas, como a regulação do tônus vascular, a função imunológica e a neurotransmissão (Ally *et al.*, 2020). Em condições normais, o NO é produzido a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Wu *et al.*, 2021). No entanto, em condições de estresse oxidativo, como na obesidade, a produção de NO pode aumentar devido à ativação de NOS induzível (iNOS) em células inflamatórias, como macrófagos e células endoteliais ativadas (Shaito *et al.*, 2022). O ONOO- é formado pela reação entre o óxido nítrico (NO) e o radical superóxido (O₂⁻) (Piacenza *et al.*, 2022). Esta reação é catalisada pela proximidade física dessas espécies reativas em condições de alta produção de EROs e NO (Piacenza *et al.*, 2022). O peroxinitrito é uma espécie reativa altamente reativa e danosa que pode causar danos diretos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos dentro das células (Abalenikhina *et al.*, 2022). Em condições de estresse oxidativo, como visto na obesidade, há um aumento

na produção de O_2^- nos tecidos, especialmente no tecido adiposo inflamado e no fígado (Taherkhani *et al.*, 2021). O O_2^- produzido pode reagir rapidamente com o NO, formando ONOO⁻. O ONOO⁻ é uma espécie reativa altamente oxidante e nitrante, capaz de induzir danos oxidativos e nitrativos significativos em biomoléculas dentro das células (Jomova *et al.*, 2023). As ERNs desencadeiam uma série de danos. O ONOO⁻ pode oxidar lipídios na membrana celular, levando à peroxidação lipídica e comprometendo a integridade estrutural e funcional da membrana (Jena *et al.*, 2023). O ONOO⁻ pode nitrar resíduos de tirosina em proteínas, modificando sua estrutura e função (Campolo *et al.*, 2020). Essa modificação pós-traducional pode afetar a atividade enzimática, a sinalização celular e a estabilidade das proteínas (Campolo *et al.*, 2020). A reação do ONOO⁻ com o DNA pode levar à nitração de bases nitrogenadas, como a guanina, resultando em danos no material genético e potencialmente contribuindo para mutações genéticas e instabilidade genômica (Gorska-Ponikowska *et al.*, 2020). Reconhecendo os impactos negativos do estresse oxidativo, é importante avaliá-lo e evitá-lo a fim de manter a saúde. Com este fim, podem ser avaliados alguns biomarcadores.

Biomarcadores como malondialdeído (MDA), 8-isoprostanos, nitrotyrosina e marcadores de danos ao DNA são frequentemente utilizados para avaliar a intensidade do estresse oxidativo em indivíduos obesos. A presença elevada desses biomarcadores está correlacionada com a gravidade da disfunção metabólica, inflamação sistêmica e risco aumentado de desenvolvimento de doenças crônicas, destacando a importância de sua monitorização clínica (Daiber *et al.*, 2021). O MDA é um produto da peroxidação lipídica, processo pelo qual os lipídios insaturados são oxidados por EROs (Mas-Bargues *et al.*, 2021). Em condições de estresse oxidativo, a produção de MDA aumenta, refletindo a oxidação lipídica e o dano celular associado (Mas-Bargues *et al.*, 2021). Em indivíduos obesos, a elevação dos níveis de MDA está frequentemente

correlacionada com o aumento da adiposidade e a presença de comorbidades metabólicas como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Świątkiewicz *et al.*, 2023). Além de ser um biomarcador de estresse oxidativo, o MDA também pode desencadear respostas inflamatórias exacerbando o estado pró-inflamatório crônico observado na obesidade (Menzel *et al.*, 2021). Os 8-isoprostanos são produtos da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados pela ação de EROs (Wroński & Wójcik, 2022). Eles são altamente estáveis e refletem de forma precisa o grau de peroxidação lipídica e estresse oxidativo no organismo (Shoman *et al.*, 2020). Em indivíduos obesos, os níveis elevados de 8-isoprostanos estão associados à disfunção endotelial, aumento do risco de doenças cardiovasculares e deterioração da função renal (Dounousi *et al.*, 2021). A monitorização dos 8-isoprostanos pode fornecer insights importantes sobre a eficácia das intervenções antioxidantes e terapêuticas na redução do estresse oxidativo em pacientes obesos (Henning & Weber, 2021). A nitrotirosina é formada pela nitração de resíduos de tirosina em proteínas, resultante da interação entre EROs e NO superproduzido (Corpas *et al.*, 2021). A presença elevada de nitrotirosina indica um estado de estresse oxidativo crônico e inflamação sistêmica, características frequentemente observadas na obesidade (Panic *et al.*, 2022). A nitrotirosina não apenas serve como um biomarcador de dano oxidativo proteico, mas também está implicada na patogênese de doenças crônicas como aterosclerose, doenças neurodegenerativas e câncer, todas associadas à obesidade e ao desequilíbrio redox (Scioli *et al.*, 2020). Os danos ao DNA são uma consequência direta da exposição a EROs e ERNs, resultando em mutações genéticas e instabilidade cromossômica (Carusillo & Mussolino, 2020). Em indivíduos obesos, os marcadores de danos ao DNA, como a presença de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), são frequentemente detectados em células de tecidos como o tecido adiposo e o fígado (Urbaniak *et al.*, 2020). Esses danos genéticos podem predispor ao desenvolvimento de câncer, além de contribuir para o

envelhecimento celular acelerado e deterioração da função orgânica (Nilsson & Liu, 2020).

A inflamação e o estresse oxidativo estão intimamente interconectados na fisiopatologia da obesidade (Aimo *et al.*, 2020). As citocinas pró-inflamatórias secretadas pelos adipócitos ativam vias intracelulares que promovem a produção de EROs, aumentando assim o estresse oxidativo no tecido adiposo e em outros órgãos (Ahmed *et al.*, 2021). Por sua vez, os EROs podem ativar vias de sinalização inflamatória, como NF- κ B, JNK e IKK β , criando um ciclo vicioso de inflamação e estresse oxidativo (Checa & Aran, 2020). Além disso, a inflamação e o estresse oxidativo podem potencializar um ao outro, exacerbando os danos celulares e os distúrbios metabólicos associados à obesidade (Čolak & Pap, 2021), como resistência insulínica e a disfunção cardíaca.

3. Disfunção cardíaca

A obesidade e seu aumento inflamação e estresse oxidativo são algumas das principais causas do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), como hipertensão, remodelamento e disfunção cardíaca (Tutor *et al.*, 2023).

As DCV são a principal causa de morte atualmente, gerando mais de 17,8 milhões de mortes por ano (Jagannathan *et al.*, 2019), e um gigantesco impacto econômico. Os custos diretos de tratamento médico para DCV incluem consultas médicas, exames de diagnóstico, medicamentos e procedimentos cirúrgicos. Nos Estados Unidos, estima-se que os custos médicos diretos das doenças cardiovasculares excedam US \$ 500 bilhões anualmente (Ekinci, 2023). No Brasil, os custos diretos também são significativos, com estimativas superando R\$ 35 bilhões por ano (de Araújo *et al.*, 2022). Como custos indiretos, temos perda de produtividade, cuidados informais por familiares, transporte para consultas médicas, modificação do estilo de vida e ainda podemos ter custos sociais das DCV, impactando famílias, comunidades e os sistema de saúde (Páez Esteban *et al.*, 2020).

Somando custos diretos e indiretos, os custos das DCV ultrapassam US \$ 1 trilhão por ano (Ekinci, 2023).

A diminuição da função cardíaca é comum nas DCV, sendo uma condição complexa que abrange uma ampla gama de distúrbios e alterações no funcionamento do coração, que podem ser causados por uma variedade de fatores, incluindo doenças cardiovasculares, problemas estruturais do coração, condições médicas subjacentes e estilo de vida (Powell-Wiley *et al.*, 2021).

O coração é um órgão muscular vital que funciona como uma bomba para circular o sangue pelo corpo. Ele possui quatro câmaras principais: dois átrios, localizados na parte superior, e dois ventrículos, na parte inferior. Essas câmaras se contraem e relaxam em sincronia para impulsionar o sangue através dos vasos sanguíneos, garantindo que ele chegue a todos os tecidos e órgãos do corpo. As válvulas cardíacas controlam o fluxo sanguíneo unidirecional através do coração, abrindo e fechando para garantir que o sangue flua na direção correta (Boselli *et al.*, 2015).

Uma série de condições pode interferir no funcionamento normal do coração, levando à disfunção cardíaca. Doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e arritmias, são algumas das principais causas de disfunção cardíaca (Shao *et al.*, 2020). Além disso, condições médicas subjacentes, incluindo diabetes, doenças renais e pulmonares, e distúrbios endócrinos, podem contribuir para o desenvolvimento da disfunção cardíaca (Wang *et al.*, 2022; Podkowińska & Formanowicz, 2020; Paschou *et al.*, 2022). Fatores de risco modificáveis, como tabagismo, dieta pouco saudável, falta de exercício físico e estresse, também desempenham um papel importante no desenvolvimento dessa condição (Tokgozoglu *et al.*, 2020; Popovic *et al.*, 2022).

Os mecanismos fisiopatológicos do desenvolvimento de DCV na obesidade envolvem resistência à insulina e Diabetes *Mellitus* tipo 2, dislipidemia, inflamação crônica de baixo grau, disfunção endotelial, hipertensão arterial, apneia do sono, estresse oxidativo, ativação do sistema

nervoso simpático, desequilíbrio hormonal e de adipocinas e hipertrofia cardíaca. A obesidade, especialmente a obesidade central (acúmulo de gordura visceral), está fortemente associada à resistência à insulina (Mocciaro & Gastaldelli, 2022). A resistência à insulina aumenta os níveis de glicose no sangue, levando ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Mocciaro & Gastaldelli, 2022). A hiperglicemia crônica e a hiperinsulinemia contribuem para a disfunção endotelial, um precursor importante das doenças cardiovasculares (Ahmed *et al.*, 2021). A obesidade também está frequentemente associada a um perfil lipídico aterogênico, caracterizado por níveis elevados de triglicerídeos, níveis reduzidos de HDL (lipoproteína de alta densidade) e aumento de pequenas partículas de LDL (lipoproteína de baixa densidade) (Stadler & Marsche, 2020). Esse perfil lipídico aumenta o risco de aterosclerose, que é a formação de placas nas artérias, levando à doença arterial coronariana e outras DCV (Henning, 2021). Concomitantemente, o tecido adiposo, especialmente o tecido adiposo visceral, secreta uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-6 e MCP-1) e adipocinas (como leptina e adiponectina) que promovem a inflamação sistêmica crônica de baixo grau, que contribui para a disfunção endotelial, desenvolvimento de aterosclerose e outras complicações cardiovasculares (Ren *et al.*, 2022). Adicionalmente, a resistência à insulina, a hiperglicemia, a dislipidemia e a inflamação crônica promovem a disfunção endotelial (Beverly & Budoff, 2020). A disfunção endotelial é caracterizada pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, aumento do estresse oxidativo e aumento da permeabilidade endotelial, todos contribuindo para a aterosclerose (Theofilis *et al.*, 2021). Ao mesmo tempo, a obesidade contribui para a hipertensão através de vários mecanismos, incluindo a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Tanaka, 2020), aumento da atividade do sistema nervoso simpático e retenção de sódio e água (Valensi, 2021), sendo um fator de risco independente para diversas DCV, como doença coronariana, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (Cleven *et al.*, 2020). A obesidade também está associada à apneia

obstrutiva do sono (AOS), uma condição em que a respiração é interrompida repetidamente durante o sono (Salzano *et al.*, 2021). A AOS aumenta o risco de hipertensão, arritmias cardíacas, insuficiência cardíaca e outras DCV devido à hipóxia intermitente, aumento da pressão intratorácica e ativação do sistema nervoso simpático (Li & Ren, 2022). Como descrito anteriormente, o excesso de tecido adiposo também leva ao aumento da produção de EROs, contribuindo para o estresse oxidativo. O estresse oxidativo danifica as células endoteliais, promove a inflamação e a aterogênese, e está envolvido no desenvolvimento de diversas DCV (Donia & Khamis, 2021). Na obesidade, de maneira concomitante, existe um aumento da atividade do sistema nervoso simpático, contribuindo para a hipertensão, aumento da frequência cardíaca e resistência vascular periférica (Limberg *et al.*, 2022). A hiperatividade simpática é um fator importante no desenvolvimento de DCV associadas à obesidade (Shah *et al.*, 2023). Como também mencionado acima, a obesidade gera um desequilíbrio de adipocinas, como leptina e adiponectina, que regulam a homeostase energética e a função cardiovascular. A leptina elevada na obesidade pode aumentar a atividade simpática e a pressão arterial, enquanto a adiponectina, que está reduzida, está associada a efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos, contribuindo para a resistência à insulina, inflamação e disfunção endotelial (Kwaifa *et al.*, 2020). Por fim, a obesidade também aumenta o tamanho do coração. A obesidade leva à sobrecarga hemodinâmica e ao aumento da demanda metabólica, resultando em hipertrofia ventricular esquerda, um grande fator de risco para insuficiência cardíaca, arritmias e outras DCV (Ren *et al.*, 2021).

Existem vários tipos de disfunção cardíaca, cada um com suas próprias características e manifestações. A insuficiência cardíaca, por exemplo, ocorre quando o coração não consegue bombear sangue suficiente para atender às demandas do corpo (Lopaschuk *et al.*, 2021). A cardiomiopatia é uma doença do músculo cardíaco que pode levar à disfunção sistólica, onde o coração não se contrai adequadamente, ou

diastólica, onde o coração não relaxa adequadamente entre os batimentos cardíacos (Prandi *et al.*, 2023). Outros tipos incluem doença arterial coronariana, arritmias e doenças das válvulas cardíacas.

Os sintomas da disfunção cardíaca podem variar, mas geralmente incluem dispneia (falta de ar) durante atividade física ou em repouso, fadiga crônica e fraqueza, inchaço nas pernas, tornozelos e abdômen devido à retenção de líquidos, palpitações cardíacas, batimentos cardíacos rápidos ou irregulares, e dor no peito, pressão ou desconforto (Govender *et al.*, 2022; Rabadia *et al.*, 2024; El-Radhi & El-Radhi, 2021; Albus & Haass, 2022). O diagnóstico da disfunção cardíaca geralmente envolve uma combinação de exames físicos, testes laboratoriais e testes de imagem (Udelson & Stevenson, 2016). Exames como o eletrocardiograma (ECG) e o ecocardiograma (ECO) são comumente usados para avaliar o ritmo cardíaco, a função contrátil e a anatomia do coração e são aplicáveis em humanos e modelos animais (Drane *et al.*, 2020; Ware *et al.*, 2021).

O tratamento da disfunção cardíaca é desafiador devido à complexidade das condições subjacentes, presença de comorbidades, adesão ao tratamento, necessidade de polifarmácia, possibilidade de progressão da doença, custo do tratamento, e acesso limitado aos cuidados de saúde especializados (Triposkiadis *et al.*, 2022; Jarjour *et al.*, 2020; Saritha, 2021; Maddox *et al.*, 2021; White-Williams *et al.*, 2020). Estes desafios exigem uma abordagem multidisciplinar e colaborativa entre médicos, pacientes e outros profissionais de saúde, como nutricionistas, enfermeiros, fisioterapeutas, enfatizando a importância do monitoramento contínuo, ajustes no plano de tratamento e promoção de mudanças no estilo de vida para garantir o melhor manejo possível da condição cardíaca (Kamiya *et al.*, 2020; Suen *et al.*, 2020). Apesar de muito dinheiro, tempo e esforços serem voltados ao tratamento de DCV, a prevalência destas doenças é crescente e continuam sendo a principal causa de morte no mundo há anos. Desta maneira, ao mesmo tempo em que são necessários estudos intervencionais para controlar a inflamação e estresse oxidativo

promotores das DCV, também é importante aprofundar o estudo do músculo cardíaco, identificando novos mecanismos fisiopatológicos, possíveis novos biomarcadores e/ou alvos terapêuticos.

Frutas cítricas, são reconhecidas por seus compostos antioxidantes e anti-inflamatórios (Saini *et al.*, 2022) e podem ser promissoras no tratamento de DCV (Deng *et al.*, 2022). Logo, é promissor aprofundar os estudos com frutas cítricas visando a diminuição das DCV e os mecanismos responsáveis por isso.

4. Bergamota (*Citrus bergamia*)

A bergamota (*Citrus bergamia*) é uma fruta com efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e com efeitos benéficos no combate às DCV (Adorisio *et al.*, 2023; Lamiquiz-Moneo *et al.*, 2020; Maiuolo *et al.*, 2021). A bergamota tem raízes profundas na cultura e história da Itália, especialmente na região da Calábria. Por séculos, a bergamota tem sido um símbolo de identidade e orgulho para os calabreses, refletindo-se em festivais locais, como a *Festa della Bergamotta* em *Reggio di Calabria*. Além disso, a bergamota é frequentemente mencionada na literatura e arte italiana, destacando sua relevância cultural (Valussi *et al.*, 2021).

O cultivo da bergamota é uma tradição agrícola de longa data na Calábria, transmitida de geração em geração (Valussi *et al.*, 2021). A região possui condições climáticas e geográficas ideais para o cultivo da fruta, com solos férteis, clima mediterrâneo e exposição ao sol (Maiuolo *et al.*, 2022). Os pomares de bergamota são cuidadosamente cultivados e mantidos pelos agricultores locais, muitas vezes em pequenas propriedades familiares (Gullo *et al.*, 2020; Gattuso *et al.*, 2024), mas atingem grandes quantidades em conjunto, gerando 25 mil toneladas de bergamota/ano (Rudra *et al.*, 2015).

A principal finalidade comercial da bergamota está na produção de óleo essencial, que é extraído das cascas dos frutos através de métodos de prensagem a frio (Valussi *et al.*, 2021). O óleo essencial de bergamota

é altamente valorizado na indústria de perfumes, cosméticos e aromaterapia devido à sua fragrância cítrica única e propriedades terapêuticas. Esta indústria gera € 25 bilhões por ano (Sharmeen *et al.*, 2021). Além disso, a casca de bergamota é utilizada na indústria alimentícia para aromatizar uma variedade de produtos, como chás, licores, doces e sorvetes (Brud, 2020).

Apesar de sua longa tradição e importância econômica, a produção de bergamota enfrenta desafios significativos, incluindo questões relacionadas à sustentabilidade agrícola, mudanças climáticas e concorrência global (Cautela *et al.*, 2021). No entanto, há oportunidades para a inovação e diversificação, como o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado, a expansão para novos mercados e a adoção de práticas agrícolas sustentáveis e tecnologias modernas (Agregán *et al.*, 2024). Além disso, a valorização crescente dos produtos naturais e a demanda por ingredientes de qualidade podem impulsionar o crescimento futuro da indústria da bergamota (Sharmeen *et al.*, 2021).

Como dito anteriormente, o foco da produção de bergamota é a indústria de óleos essenciais, ou seja, utilizar a parte lipofílica desta fruta. Entretanto, o suco e a polpa, que representam a parte hidrofílica da bergamota, possuem características ácidas e podem ser classificadas subprodutos industriais. Estes subprodutos, principalmente o suco, são uma importante fonte de compostos bioativos hidrofílicos, como os compostos fenólicos, e podem gerar benefícios à saúde humana devido a seu potencial antioxidante e anti-inflamatório (Della Vedova *et al.*, 2023; Russo *et al.*, 2024). Deste modo, é possível agregar um alto valor à bergamota, melhorar a saúde da população e promover/ampliar o futuro da indústria da bergamota.

A porção hidrofílica da bergamota é fonte de compostos fenólicos, flavonoides e possui capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Dentre os compostos fenólicos e flavonoides, destaca-se a presença de naringenina, naringina e hesperidina (Baron *et al.*, 2021). Estes três compostos são

fortemente reconhecidos como terapêuticos e protegem contra DCV (Du *et al.*, 2021; Adetunji *et al.*, 2023; Moghaddam *et al.*, 2020). A fração hidrofílica da bergamota pode prevenir o desenvolvimento de síndrome metabólica e suas doenças relacionadas (Carresi *et al.*, 2020). Entretanto, ainda não foram estudados os efeitos desta porção da bergamota nas DCV geradas pela obesidade.

A inclusão de frutas cítricas na dieta aumenta a ingestão de compostos antioxidantes, como compostos fenólicos, carotenóides e ABs. Essas moléculas atuam como captadores de radicais e, direta ou indiretamente, podem ajudar a controlar diversas doenças, reduzindo a infiltração de células inflamatórias, o estresse oxidativo e as concentrações de lipídios plasmáticos, melhorando a função mitocondrial e a biodisponibilidade do óxido nítrico (Hossein Maleki *et al.*, 2022; Borges *et al.*, 2022; Basílio *et al.*, 2022). A ingestão de flavonoides foi associada a um menor risco de acidente vascular cerebral isquêmico (Maleki *et al.*, 2019) e pode ajudar a reduzir a pressão arterial (por exemplo, luteolina, quercetina, hesperidina e naringenina) (Su *et al.*, 2015; Salehi *et al.*, 2020; Clarck *et al.*, 2015). As frutas cítricas contêm grandes quantidades de compostos fenólicos. Na laranja ‘umbigo Washington’, Multari *et al.* (2020) descreveram os maiores teores de compostos fenólicos no albedo ($10910 \pm 320 \text{ mg kg}^{-1}$), enquanto Elkhatim *et al.* (2018) encontraram valores mais baixos em partes desperdiçadas de laranja, limão e toranja. Pode ocorrer variação no teor desses bioativos dependendo do tecido analisado, bem como da época de colheita e de outros fatores de cultivo e pós-colheita.

Os carotenoides, compostos bioativos fundamentalmente lipofílicos, mas com alguns anfipáticos, também são capazes de manter a pressão arterial normal dentro da faixa normal, conforme descrito por Wolak *et al.* (2019) usando 15 ou 30 mg de licopeno extraído de tomate. Em contraste, o licopeno sintético não apresentou efeito semelhante. No flavedo de frutas cítricas em estágio totalmente maduro, o teor de carotenoides totais chega a 12,6 mg/100 g de peso fresco, enquanto na

polpa o teor é de 1,4 mg/100 g (Multari *et al.*, 2020). Por ser uma substância onipresente, os ABs ocorrem nos citros em quantidades variáveis dependendo do cultivo, colheita e tratamentos pós-colheita. No suco de laranja, Preti *et al.* (2016) detectaram putrescina como amina predominante (45,5 mg/L) e espermidina e espermina, além de serotonina e histamina. A putrescina é a amina que ocorre em concentrações mais elevadas, enquanto a histamina apresenta níveis mais baixos (até 0,26 mg/L) (Basheer *et al.*, 2011). Bergamota já demonstrou efeitos *in vitro* de inibição da expressão do Fator Nuclear Kappa B (NF-KB), relacionado ao aumento da inflamação; e aumento da expressão do Fator 2 Relacionado ao NF-E2 (NRF2), relacionado ao aumento da resposta anti-inflamatória (Baron *et al.*, 2021). Considerando a gama de compostos bioativos presentes, ou potencialmente presentes, na porção hidrofílica da bergamota e os benefícios à saúde associados a estes, faz sentido hipotetizar que a suplementação deste subproduto pode ter efeitos nas DCV decorrentes da obesidade.

Ao mesmo tempo em que é necessário controlar a inflamação e o estresse oxidativo gerados pela obesidade e, conseqüentemente, as DCV, é importante aprofundar os estudos a respeito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos das as DCV na obesidade, visando identificar novos biomarcadores e/ou alvos terapêuticos. O coração é um músculo, ou seja, um órgão proteico. Logo, faz sentido o aprofundamento em componentes e/ou metabólitos do metabolismo proteico neste órgão, como as aminas biogênicas.

5. Aminas biogênicas e saúde cardiovascular

Aminas biogênicas (ABs) são compostos orgânicos nitrogenados formados principalmente pela descarboxilação de aminoácidos. Como exemplo, as ABs histamina, cadaverina, tiramina, putrescina e espermidina são formadas a partir de histidina, lisina, tirosina, ornitina e putrescina, respectivamente (Özogul & Özogul, 2019).

As ABs podem ter efeitos no metabolismo muscular, incluindo o músculo cardíaco e a musculatura vascular. Além disso, estas moléculas podem se ligar facilmente a biomoléculas, incluindo DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios, modulando, em muitos casos, suas funções. Consequentemente, muitos processos bioquímicos e celulares podem ser afetados positiva ou negativamente pelas ABs, incluindo tradução, transcrição, transdução de sinais, proliferação e diferenciação celular, apoptose ou resposta ao estresse celular (Ramos-Molina *et al.*, 2019). E podem ter relação com o desenvolvimento, prognóstico e tratamento das DCV.

Durante um estudo piloto do atual trabalho, foram identificadas as seguintes aminos no tecido cardíaco: triptamina, espermina, histamina, serotonina, putrescina, cadaverina, agmatina e espermidina. A triptamina é originada a partir da descarboxilação do triptofano pela enzima L-aminoácido descarboxilase (Han & Shin, 2022). Esta amina pode ser oxidada pela monoamina oxidase (MAO), resultando em indol-3-acetaldeído, que pode ser posteriormente oxidado a ácido indol-3-acético (Negri *et al.*, 2021). A triptamina pode ser metabolizada em vários compostos, incluindo serotonina através da ação de triptofano hidroxilase e descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos (Han & Shin, 2022). Já a espermina, outra AB, é sintetizada a partir da espermidina pela enzima espermidina sintetase, que adiciona um grupo aminopropil (Hasan *et al.*, 2021). Esta amina é catabolizada pela espermina oxidase (SMOX), que converte espermina em espermidina, produzindo H₂O₂ e 3-aminopropanal (Zahedi *et al.*, 2022). A espermina também pode ser convertida em outras poliaminas, como a espermidina e putrescina, e desempenha um papel importante na estabilização do DNA e regulação do crescimento celular (Sagar *et al.*, 2021). Outra AB, a histamina, é sintetizada a partir da histidina pela ação da enzima histidina descarboxilase (Moriguchi & Takai, 2020). A histamina é catabolizada principalmente pela histamina-N-metiltransferase (HMT), que a converte em N-metil-histamina, seguida

pela oxidação pela MAO-B em ácido N-metilimidazol acético (Comas-Basté *et al.*, 2020). Também pode ser catabolizada pela diamina oxidase (DAO) (Comas-Basté *et al.*, 2020). A histamina é armazenada em mastócitos e basófilos e liberada durante reações alérgicas e inflamatórias, atuando em receptores H1, H2, H3 e H4 (Panula, 2021). Em outro processo, o triptofano é hidroxilado pela triptofano hidroxilase para formar 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que é então descarboxilado pela descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos para formar serotonina (5-HT) (Wang *et al.*, 2023). Esta AB é catabolizada pela MAO-A para formar 5-hidroxiindolacetaldeído, que é oxidado pela aldeído desidrogenase para formar ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Kalinichenko *et al.*, 2024). A serotonina é um neurotransmissor importante no sistema nervoso central e periférico, regulando humor, sono e apetite (Kanova & Kohout, 2021). Outra AB, a putrescina, é sintetizada a partir da ornitina pela ação da ornitina descarboxilase (Bao *et al.*, 2021). Esta AB pode ser convertida em espermidina e espermina ou ser oxidada pela diamina oxidase para formar γ -aminobutiraldeído, que é posteriormente oxidado a ácido gama-aminobutírico (GABA) (Bao *et al.*, 2021). A putrescina é um precursor essencial na biossíntese de poliaminas, que são importantes para o crescimento e diferenciação celular (Heby, 2021). Já a AB cadaverina é sintetizada pela descarboxilação da lisina pela enzima lisina descarboxilase (Liu *et al.*, 2020). Esta AB pode ser oxidada pela diamina oxidase para formar Δ^1 -piperideína, que é hidrolisada a ácido aminovalérico (Luengo & Olivera, 2020). A cadaverina é encontrada em tecidos em decomposição e pode ser convertida em outras aminas biogênicas ou ser eliminada do organismo (Wisor, 2021). Outra AB, a agmatina, é sintetizada pela descarboxilação da arginina pela arginina descarboxilase (Hyvönen *et al.*, 2020). Esta AB pode ser hidrolisada pela agmatinase para formar putrescina e ureia (Maturana *et al.*, 2021). A agmatina atua como um neurotransmissor modulador e tem efeitos em vários sistemas de sinalização celular (Hassanshahi *et al.*, 2023). Por fim,

outra AB, a espermidina, é sintetizada pela adição de um grupo aminopropil à putrescina pela espermidina sintetase (Islam *et al.*, 2020). Esta AB pode ser oxidada pela espermidina oxidase, resultando em putrescina, H₂O₂ e 1,3-diaminopropano (Islam *et al.*, 2020). A espermidina é importante para a modulação da função celular, crescimento e proliferação (Wei *et al.*, 2022). Essas vias são essenciais para a regulação de muitos processos fisiológicos e patológicos, e qualquer disfunção nelas pode levar a várias condições de saúde. A seguir, serão revisadas as relações entre triptamina, espermina, histamina, serotonina, putrescina, cadaverina, agmatina e espermidina e a saúde cardiovascular.

5.1 Triptamina e saúde cardiovascular

A triptamina, AB com presença de um anel de triptofano (Qiao *et al.*, 2022), é encontrada em uma variedade de organismos, incluindo plantas, animais e seres humanos. A triptamina possui semelhanças estruturais com a serotonina, permitindo sua interação com receptores de serotonina, como os receptores 5-HT (Sarkar *et al.*, 2021). A triptamina pode modular a função cardíaca, afetando a frequência cardíaca e a contratilidade cardíaca por meio da ativação desses receptores (Jragh *et al.*, 2023; Ciucă-Anghel *et al.*, 2023; Neumann *et al.*, 2023). No entanto, os efeitos específicos e a relevância clínica desses efeitos ainda estão sendo investigados e podem variar com base em fatores como concentração e sensibilidade dos receptores (Comai *et al.*, 2020; Paeslack *et al.*, 2022; Duan *et al.*, 2023).

Além disso, a influência da triptamina na musculatura vascular também é objeto de interesse na pesquisa cardiovascular, podendo induzir vasoconstrição, reduzir o diâmetro dos vasos sanguíneos e aumentar a resistência vascular, podendo afetar a pressão sanguínea (Martin-Martin *et al.*, 2021; Paeslack *et al.*, 2022; Shah *et al.*, 2023). Além disso, a triptamina pode desempenhar um papel na modulação da resposta inflamatória nos vasos sanguíneos (Agista *et al.*, 2022). No entanto, a

compreensão completa dos mecanismos de ação e do impacto na saúde cardiovascular ainda está em evolução.

5.2 Espermina e saúde cardiovascular

A espermina é uma poliamina com unidades de amina ligadas covalentemente, amplamente distribuída na natureza em plantas, animais e micro-organismos (Özogul & Özogul, 2019). Ela possui uma cadeia longa e flexível que permite interações com outras moléculas celulares devido à presença de grupos amino carregados positivamente. Suas funções biológicas incluem a estabilização do DNA, regulação da expressão gênica, síntese de proteínas, modulação de enzimas e equilíbrio iônico (Choudhary *et al.*, 2023).

Na musculatura cardíaca, a espermina desempenha um papel na estabilização do DNA, que é crucial para a replicação celular e a manutenção do tecido cardíaco (Oh *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021). Além disso, pode estar envolvida na regulação da expressão gênica, afetando a atividade de genes nas células cardíacas, embora os mecanismos precisos permaneçam pouco definidos (Parkhitko *et al.*, 2019). Quanto à contratilidade cardíaca, a influência direta da espermina é desconhecida e requer mais estudos.

Na musculatura vascular, a espermina modula o tônus vascular, levando a efeitos vasodilatadores que reduzem a resistência vascular e a pressão arterial sistêmica (Boguslavskyi *et al.*, 2021; Man *et al.*, 2023). Além disso, melhora a função endotelial, estimulando a liberação de óxido nítrico, importante vasodilatador (Wu *et al.*, 2021; Hughes *et al.*, 2020). As propriedades anti-inflamatórias da espermina também podem ser benéficas à saúde vascular (Ni & Liu, 2021).

A pesquisa sobre a influência da espermina na musculatura cardíaca e vascular ainda está em estágio inicial, com muitos aspectos a serem esclarecidos. A compreensão completa de seus efeitos e mecanismos requer investigações adicionais.

5.3 Histamina e saúde cardiovascular

A histamina, uma AB, é uma molécula essencial em diversas funções fisiológicas no corpo humano e no sistema imunológico (Fiorani *et al.*, 2023). Sua produção ocorre principalmente em mastócitos e basófilos, desempenhando um papel significativo na resposta imunológica e processos inflamatórios (Smolinska *et al.*, 2022). Estruturalmente, a histamina possui um anel de imidazol e um grupo funcional amina, permitindo interações com receptores específicos devido à sua carga positiva. A histamina é armazenada em grânulos intracelulares e liberada em resposta a estímulos alérgicos, inflamações e outros desencadeantes (Elieh Ali Komi *et al.*, 2020; Baran *et al.*, 2023).

Existem quatro principais tipos de receptores de histamina (H1, H2, H3 e H4) distribuídos em diversos tecidos e órgãos, desempenhando papéis específicos na mediação das respostas fisiológicas (Shulpekova *et al.*, 2021). A histamina influencia a vasodilatação, permeabilidade vascular, secreção de ácido gástrico, regulação do ciclo sono-vigília, reações alérgicas e inflamatórias (Murala *et al.*, 2022).

Em relação à musculatura cardíaca, a histamina geralmente não afeta diretamente a contratilidade cardíaca, sendo seu principal impacto na regulação da frequência cardíaca, vasodilatação e vasoconstrição, principalmente por meio da ativação de receptores H2 no coração (Saheera *et al.*, 2022). O efeito direto da histamina na contratilidade cardíaca é considerado insignificante em comparação com outros reguladores cardíacos, como neurotransmissores, hormônios e íons. Perturbações nos níveis de histamina podem contribuir para condições como alergias, úlceras gástricas e distúrbios do sono, tornando a regulação adequada dos níveis de histamina fundamental para a saúde cardiovascular (Smolinska *et al.*, 2022; Abdulrazzaq *et al.*, 2022).

Na musculatura vascular, a histamina desempenha um papel crucial na modulação do tônus vascular (Ferretti *et al.*, 2023). Ela promove

vasodilatação através da ativação dos receptores H1, reduzindo a pressão arterial e melhorando o fluxo sanguíneo (Gao *et al.*, 2022). Além disso, aumenta a permeabilidade vascular em processos alérgicos e inflamatórios, facilitando a migração de células do sistema imunológico (Gao *et al.*, 2022; Elieh Ali Komi *et al.*, 2020). A histamina também regula o fluxo sanguíneo local e, em casos graves de reações alérgicas, pode causar vasodilatação generalizada, levando a choque anafilático (Nguyen *et al.*, 2021).

Em resumo, a histamina desempenha um papel multifacetado no corpo humano, com impacto direto na musculatura vascular, principalmente na regulação do tônus vascular, e na frequência cardíaca, mas com um efeito limitado na contratilidade cardíaca. Seus efeitos têm implicações significativas na pressão arterial, no fluxo sanguíneo e nas respostas do organismo a estímulos alérgicos e inflamatórios. A regulação adequada dos níveis de histamina é essencial para a saúde cardiovascular (Neumann *et al.*, 2021).

5.4 Serotonina e saúde cardiovascular

A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é um neurotransmissor vital encontrado no corpo humano e em outros organismos, desempenhando um papel fundamental nos sistemas nervoso central e entérico (Liu *et al.*, 2021). Sua função abrange a regulação de diversas funções fisiológicas e comportamentais, incluindo o humor, sono, apetite, cognição e comportamento sexual (Jones *et al.*, 2020). A estrutura química da serotonina é caracterizada por um anel de triptofano e grupos funcionais amina e hidroxila, essenciais para suas atividades biológicas (Kanova & Kohout, 2021).

No sistema nervoso central, a serotonina é um neurotransmissor crucial associado à regulação do humor e do bem-estar, sendo frequentemente chamada de "hormônio da felicidade" (Murawska-Ciałowicz *et al.*, 2021). Ela está intrinsecamente ligada à regulação do

humor, ansiedade e depressão, e é alvo de tratamentos com antidepressivos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (Filcek, 2022).

No sistema nervoso entérico, a serotonina desempenha um papel relevante na regulação da motilidade gastrointestinal, secreção de ácido gástrico e função intestinal (Guzel & Mirowska-Guzel, 2022; Najjar *et al.*, 2023). Existem diversos subtipos de receptores de serotonina (receptores 5-HT) distribuídos em diferentes áreas do corpo, medeiam os efeitos da serotonina de maneira específica (Sharp & Barnes, 2020).

Em relação à musculatura cardíaca, a serotonina exerce uma influência relativamente limitada em comparação com outros neurotransmissores e hormônios associados à regulação cardíaca. Seus efeitos incluem a influência na frequência cardíaca, o tônus vascular e a modulação da condução elétrica cardíaca (Graessler *et al.*, 2021; Siepmann *et al.*, 2022). No entanto, outros neurotransmissores, como a noradrenalina e a acetilcolina, bem como hormônios como a adrenalina, desempenham papéis mais proeminentes na modulação da contratilidade cardíaca, frequência cardíaca e ritmo cardíaco (Gorain *et al.*, 2020).

A serotonina exerce um papel significativo na musculatura vascular, induzindo vasoconstrição, regulando o fluxo sanguíneo em resposta às demandas metabólicas, influenciando a resposta inflamatória e imunológica, participando da coagulação sanguínea e interferindo na percepção da dor (Najjar *et al.*, 2023; Sharp & Barnes, 2020; Graessler *et al.*, 2021; Siepmann *et al.*, 2022). Seus efeitos na musculatura vascular são mediados por diferentes subtipos de receptores 5-HT e podem variar de acordo com as circunstâncias.

Desequilíbrios nos níveis de serotonina, seja por distúrbios metabólicos ou uso de medicamentos, podem afetar significativamente a função cardiovascular e a pressão arterial (Dai *et al.*, 2023). Portanto, a regulação adequada dos níveis de serotonina e a compreensão abrangente de seus efeitos são cruciais para manter a saúde

cardiovascular e a homeostase vascular (Soslau, 2022).

5.5 Putrescina e saúde cardiovascular

A putrescina é uma poliamina orgânica caracterizada por possuir duas extremidades com grupos amina, enquadrando-a na classe das poliaminas (Lima *et al.*, 2023). Essa molécula é amplamente distribuída na natureza, encontrando-se em diversos tecidos e organismos, incluindo plantas, animais e bactérias (Sarasa *et al.*, 2020). Do ponto de vista estrutural, a putrescina possui uma cadeia de carbono linear com quatro átomos de carbono, característica típica das poliaminas. Sua carga positiva em pH fisiológico é atribuída aos grupos amina, sendo crucial para suas interações biológicas (Almeida *et al.*, 2022).

No contexto das funções biológicas, a putrescina desempenha papéis essenciais, como a regulação da expressão gênica, a influência na estrutura do DNA e suas interações com proteínas (Huang *et al.*, 2023). Além disso, a putrescina atua como precursora na síntese de poliaminas mais complexas, como espermina e espermidina, que desempenham funções importantes na estabilização do DNA e em processos celulares (Halloran *et al.*, 2021). A putrescina também funciona como cofator para algumas enzimas, afetando sua atividade catalítica (Liang *et al.*, 2022; de Souza Vandenberghe *et al.*, 2020). Em situações de estresse celular, como danos ao DNA ou inflamação, os níveis de putrescina podem aumentar como parte da resposta adaptativa (Lu *et al.*, 2023; Holbert *et al.*, 2022).

É fundamental destacar que a regulação adequada dos níveis de putrescina e outras poliaminas é crucial para a homeostase celular e o funcionamento normal do organismo. Qualquer desequilíbrio nos níveis de putrescina pode ter implicações negativas na saúde celular (Islam *et al.*, 2022). Portanto, a compreensão dos papéis e da regulação dessa molécula é de grande importância para a saúde humana.

No que diz respeito à musculatura cardíaca, o impacto direto da

putrescina na contratilidade cardíaca é limitado, não sendo considerada um regulador significativo desse processo, apesar de poder ser metabolizada em espermidina, composto com grande importância na saúde cardiovascular (Cho *et al.*, 2024). Quanto à musculatura vascular, a putrescina exerce diferentes influências. Ela atua como precursora na síntese de poliaminas mais complexas, influencia a homeostase do cálcio intracelular, regula a expressão gênica e afeta a síntese de componentes da matriz extracelular, como o colágeno (Susser & Rayner, 2022). No entanto, é importante ressaltar que os efeitos da putrescina na musculatura vascular são mediados principalmente por seus metabólitos e por sua influência indireta nas vias metabólicas celulares (Tabas & Bornfeldt, 2020). A putrescina faz parte de um sistema complexo de regulação celular que afeta a função vascular de maneira multifacetada (Choudhary *et al.*, 2023).

Em resumo, a putrescina é uma poliamina com funções cruciais na regulação celular e em processos biológicos, desempenhando papéis importantes na musculatura vascular, mas tendo um impacto limitado na contratilidade cardíaca (Islam *et al.*, 2022). Seu papel específico na saúde cardiovascular e em condições patológicas requer uma investigação contínua.

5.6 Cadaverina e saúde cardiovascular

A cadaverina é uma poliamina com múltiplos grupos amina em sua estrutura, sendo estes fundamentais para suas funções biológicas (Özogul & Özogul, 2019). Ela está presente em diversos tecidos e organismos, mas seu impacto direto na musculatura cardíaca e vascular na literatura científica é escasso. Na musculatura cardíaca, a cadaverina não é considerada um regulador significativo da função contrátil. A regulação cardíaca é amplamente governada por íons, hormônios e neurotransmissores, como cálcio, adrenalina, noradrenalina e acetilcolina, que desempenham papéis críticos na modulação da contratilidade

cardíaca e ritmo cardíaco (Severino *et al.*, 2020).

Da mesma forma, na musculatura vascular, composta principalmente por células musculares lisas que controlam o diâmetro dos vasos sanguíneos, o papel direto da cadaverina não foi amplamente documentado. A regulação do tônus vascular é predominantemente influenciada por fatores como cálcio, neurotransmissores (por exemplo, noradrenalina) e hormônios (por exemplo, angiotensina II) (Xavier, 2020).

Embora a cadaverina desempenhe funções importantes, como a estabilização do DNA, modulação do pH intracelular e influência sobre a divisão celular, sua influência direta na musculatura cardíaca e vascular parece ser limitada (Bhagwat & Saroj, 2023). No entanto, é importante notar que seu impacto indireto por meio da regulação do ambiente celular e da proliferação celular pode ter implicações em contextos específicos (Bhagwat & Saroj, 2023). A pesquisa atual ainda carece de estudos aprofundados para compreender completamente o papel da cadaverina na musculatura cardíaca e vascular em comparação com outros reguladores bem estabelecidos. Portanto, são necessárias investigações adicionais para esclarecer seu impacto específico nessas áreas.

5.7 Agmatina e saúde cardiovascular

A agmatina, AB derivada da arginina por descarboxilação, exerce funções multifacetadas no organismo, incluindo a modulação da neurotransmissão e a regulação do fluxo sanguíneo (Russo *et al.*, 2019). Sua influência direta na contratilidade da musculatura cardíaca é limitada e não é considerada um regulador primário da contratilidade cardíaca. Em contraste, a agmatina desempenha um papel significativo na musculatura vascular, promovendo a vasodilatação por meio da relaxação das células musculares lisas nas paredes dos vasos sanguíneos (Wu *et al.*, 2021). Isso resulta em uma redução da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, da pressão arterial (Suarez-Roca *et al.*, 2021). Além disso, a agmatina pode afetar a produção e a ação do óxido nítrico (NO),

vasodilatador, e influenciar a regulação do fluxo sanguíneo em diferentes tecidos e órgãos (Wierońska *et al.*, 2021). Ela também pode ter efeitos protetores na função endotelial, que é fundamental para a saúde vascular (Zhang *et al.*, 2022). Embora o papel da agmatina na musculatura cardíaca seja limitado, seu impacto na musculatura vascular a torna uma molécula de interesse na pesquisa biomédica, especialmente em relação à saúde cardiovascular e ao controle da pressão arterial.

5.8 Espermidina e saúde cardiovascular

A espermidina é uma poliamina de baixo peso molecular que desempenha funções cruciais em diversos processos biológicos (Tang *et al.*, 2020). Sua estrutura contém grupos amina e uma cadeia de carbono linear, com quatro átomos de carbono entre os grupos amina. Em pH fisiológico, a espermidina adquire carga positiva devido aos grupos amina, o que é relevante para suas interações com moléculas como DNA e proteínas no ambiente celular (Bhagwat & Saroj, 2023).

As funções biológicas da espermidina incluem a estabilização tridimensional do DNA, a regulação da expressão gênica, a modulação da proliferação celular e o potencial papel como cofator enzimático em vias metabólicas (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2019).

No contexto da musculatura cardíaca, a espermidina não exerce um efeito direto significativo na contratilidade cardíaca. A pesquisa concentra-se mais nas funções celulares e moleculares da espermidina, como regulação da expressão gênica e proliferação celular, do que em seus efeitos diretos sobre o músculo cardíaco (Stolarska *et al.*, 2023). O entendimento do papel preciso da espermidina na contratilidade cardíaca e na saúde cardiovascular ainda requer investigações adicionais.

Em relação à musculatura vascular, a espermidina atua como vasodilatador, relaxando as células musculares lisas vasculares e contribuindo para a redução da pressão arterial (Wang *et al.*, 2023). Seus efeitos estão relacionados à modulação do NO, regulação do fluxo

sanguíneo e possível proteção da função endotelial (Prado *et al.*, 2021). A pesquisa sobre a espermidina como potencial terapia para a saúde vascular está em crescimento, com foco em compreender os mecanismos precisos envolvidos em seus efeitos benéficos.

Considerando os efeitos conhecidos e desconhecidos das ABs no músculo cardíaco e as possíveis relações com inflamação estresse oxidativo, é necessário amplificar o conhecimento sobre as relações ABs com a disfunção cardíaca, assim como os efeitos de fatores de risco para DCV, como a obesidade, sobre o perfil de ABs na musculatura cardíaca.

6. Justificativa e Hipótese

Ainda não existem estudos com suplementação da porção hidrofílica da bergamota avaliando a inflamação e estresse oxidativo no miocárdio de ratos obesos, justificando este estudo. Adicionalmente, os estudos envolvendo o músculo cardíaco e ABs ainda não são claros, portanto, é importante a investigação para entender a relação desses compostos com a fisiopatologia da disfunção cardíaca na obesidade, assim como a relação destes compostos com a obesidade.

A hipótese deste trabalho é que a suplementação de com o extrato de bergamota previne o desenvolvimento de disfunção cardíaca em ratos obesos, por modular mediadores inflamatórios e indicadores do estresse oxidativo no miocárdio. Além disso, também é hipotetizado que a concentração de amins biogênicas no tecido cardíaco tem relação com a disfunção cardíaca.

7. Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com o extrato do fruto de bergamota no desenvolvimento de disfunção cardíaca, e suas relações com mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e perfil de amins biogênicas no miocárdio de ratos obesos.

7.1 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil de aminas biogênicas no extrato do fruto da bergamota;
- Quantificar a capacidade antioxidante do extrato do fruto da bergamota;
- Avaliar o efeito do extrato do fruto da bergamota na hipertensão gerada pela obesidade;
- Avaliar o efeito do extrato do fruto da bergamota no remodelamento cardíaco gerado pela obesidade;
- Avaliar os fatores transcricionais NF-kB e NRF-2, citocinas pró-inflamatórias, atividade de enzimas antioxidantes e indicadores do estresse oxidativo no coração; assim como os efeitos da obesidade e da suplementação do extrato do fruto de bergamota;
- Caracterizar o perfil de aminas biogênicas no tecido cardíaco;
- Avaliar os efeitos da obesidade no perfil de aminas biogênicas no tecido cardíaco.
- Correlacionar o perfil de aminas biogênicas cardíaco com marcadores de saúde cardiovascular.

Capítulo 2. Artigo científico 1

*Publicado na Revista “Pharmacological
Research - Natural Products”*

<https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100022>



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research - Natural Products

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/prenap

Bergamot by-product, a source of biogenic amines, reduces hypertension induced by high sugar-fat diet

Matheus Antônio Filiol Belin^{a,*}, Juliana Silva Siqueira^a, Taynara Aparecida Vieira^a, Núbia Alves Grandini^a, Thiago Luiz Novaga Palacio^a, Erika Tiemi Nakandakare-Maia^a, Dijon Henrique Salomé de Campos^a, Fabiane Valentini Francisqueti-Ferron^a, Ezio Bombardelli^b, Igor Otávio Minatel^d, Giancarlo Aldini^c, Giuseppina Pace Pereira Lima^d, Camila Renata Correa^a

^a Department of Pathology, Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-687, Brazil

^b Plantexresearch Srl, Milan 20122, Italy

^c Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Via Mangiagalli 25, Milan 20133, Italy

^d Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-687, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Unhealthy diet
Hypertension
Citrus bergamia
Phenolic compounds
Antioxidant
Agmatine

ABSTRACT

The high-sugar fat diet (HSF) generates hypertension. Bergamot by-product (BBP) is a source of hydrophilic bioactive compounds. The aim was to test BBP administration against hypertension induced by the HSF. The 48 male Wistar rats were equally divided into 4 groups: control diet (C), C + BBP, HSF, and HSF + BBP. The BBP (250 mg/Kg) was administrated by gavage for 20 weeks. The total phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacity of BBP were evaluated by spectrophotometry, and HPLC was used to evaluate the biogenic amines (BAs) profile. The animals' body weight (BW), caloric intake, glucose levels, superoxide dismutase activity, and systolic blood pressure (SBP) were measured at the final of the experiment. Results showed that BBP is a good source of bioactive compounds, such as phenolic compounds ($15 \pm 2.1 \mu\text{g}$ Gallic Acid Equivalents/mg, w-w) and flavonoids ($5.09 \pm 0.22 \mu\text{g}$ Quercetin Equivalents/mg, w-w), and has a high antioxidant capacity ($5.35 \pm 0.06 \mu\text{g}$ Trolox Equivalents (TE)/mg, w-w; $1.30 \pm 0.14 \mu\text{g}$ TE/mg, and $2.54 \pm 0.31 \text{ mM}$ FeSO₄/mg), by three different methods). BBP contains the BA histamine ($28.4 \pm 3.1 \mu\text{g/g}$, w-w), tyramine ($6.39 \pm 0.39 \mu\text{g/g}$, w-w), tryptamine ($186 \pm 11 \mu\text{g/g}$, w-w), putrescine ($29.0 \pm 4.4 \mu\text{g/g}$, w-w), cadaverine ($10.6 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$, w-w), spermidine ($34.8 \pm 4.3 \mu\text{g/g}$, w-w), spermine ($2.28 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$, w-w), serotonin ($4.46 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$, w-w), dopamine ($2.50 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$, w-w), and agmatine ($140 \pm 10 \mu\text{g/g}$, w-w). BBP has remarkable levels of antioxidant BAs, such as spermidine ($34.8 \pm 4.3 \mu\text{g/g}$, w-w) and agmatine ($140 \pm 10 \mu\text{g/g}$, w-w). HSF increased BW ($532 \pm 72 \text{ g}$ VS $474 \pm 36 \text{ g}$ (C), $p < 0.001$), glucose levels ($91.4 \pm 6.2 \text{ mg/dL}$ VS $80.9 \pm 7.1 \text{ mg/dL}$ (C), $p < 0.001$) and SBP ($146 \pm 9 \text{ mmHg}$ VS $121 \pm 5 \text{ mmHg}$ (C), $p < 0.001$). BBP reduced hypertension generated by HSF ($133 \pm 9 \text{ mmHg}$ VS $146 \pm 9 \text{ mmHg}$, $p < 0.001$), suggesting a direct hypotensive action. The synergy between the bioactive compounds identified in BBP demonstrates great potential for use to prevent and treat hypertension.

1. Background/introduction

The consumption of an HSF, an unhealthy diet, promotes oxidative stress and metabolic disorders, increasing BW, glucose levels, and blood pressure levels, which result in hypertension [1,2]. Hypertension affects more than 30% of adults and is the leading cause of cardiovascular disease and premature death worldwide [3]. Global mean blood

pressure has remained growing due to the widespread use of anti-hypertensive medications [3]. In addition to low adherence to drug treatment, only about 20% of patients on medication have their hypertension controlled [4], thus strategies to prevent and control hypertension need to be implemented.

Several fruits and their by-products, such as citrus fruits, have therapeutic properties, due to the significant amounts of antioxidant

* Corresponding author.

E-mail address: matheus.belin@unesp.br (M.A.F. Belin).

<https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100022>

Received 4 October 2023; Received in revised form 26 January 2024; Accepted 22 February 2024

Available online 28 February 2024

2950-1997/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved.

compounds. Bergamot (*Citrus bergamia*) is a fruit cultivated almost exclusively in southern Italy (25,000 tons/year) [5], primarily for the essential oil industry, which generates € 25 billion per year [6]. Juice and pulp are the industrial BBP and represent a source of phenolic compounds, vitamins, minerals, and other antioxidant compounds as recently reported [7].

Including citrus fruits in the diet increases the antioxidant compounds intake, such as phenolic compounds, carotenoids, and biogenic amines (BAs). These molecules act as radical scavengers, and directly or indirectly, may help to control several diseases by reducing inflammatory cell infiltration, oxidative stress, and plasma lipid concentrations, improving the mitochondrial function and the bioavailability of nitric oxide [8–10]. Intake of flavonoids was associated with a lower risk of ischemic stroke [8] and may help lower blood pressure (e.g. luteolin, quercetin, hesperidin, and naringenin) [11–13]. Citrus fruit contains high amounts of phenolic compounds. In ‘Washington navel’ orange, Multari et al. (2020) [14] described the highest contents of phenolic compounds in albedo ($10910 \pm 320 \text{ mg kg}^{-1}$), while El-khatim et al. (2018) [15] found lower values in wasted parts of orange, lemon, and grapefruit. Variation in the content of these bioactive may occur depending on the tissue analyzed, as well as the time of harvest and other cultivation and postharvest factors.

Carotenoids are also capable of maintaining normal blood pressure within a normal range, as described by Wolak et al. (2019) [16] using 15 or 30 mg of tomato-extracted lycopene. In contrast, synthetic lycopene did not show a similar effect. In flavedo of citrus fruits at the fully mature stage, the content of total carotenoids reaches 12.6 mg/100 g fresh weight (FW), while in the pulp the content is 1.4 mg/100 g FW [14]. Because it is a ubiquitous substance, BAs occur in citrus in variable amounts depending on cultivation, harvest, and post-harvest treatments. In orange juice, Preti et al. (2016) [17] detected putrescine as the predominant amine (45.5 mg/L) and spermidine and spermine, in addition to serotonin and histamine. Putrescine is the amine that occurs in higher concentrations, while histamine shows lower levels (up to 0.26 mg/L) [18] (Basheer et al., 2011). Since BBP contains phytochemicals, this study analyzed the antioxidant potential, including phenolic compounds and carotenoids, as well as the BBP BAs profile. Therefore, given the necessity to improve, the BBP was fed, with an unhealthy diet (HSF), to rats to verify whether these compounds can help reduce hypertension.

2. Material and methods

BBP was produced at an industrial level by AKHYNEX srl, (Polistena, RC, Italy) and will be commercially available with the tradename of Endo@berg by AKHYNEX and KALITA® by Gieliepi S.p.A. Milan, Italy.

2.1. Total phenolic compounds, total flavonoids, carotenoids, and antioxidant activity

As described by Belin et al. (2021) [19], BBP was diluted in MeOH: water: phosphoric acid (80:1:19 v/v/v). After sonicating for 30 min, and centrifuging for 10 min at 6000 x g, total phenolic compounds, total flavonoids, and antioxidant activity by DPPH, FRAP, and ABTS were determined using the supernatant.

Total phenolic compounds analysis was performed using the Folin-Ciocalteu reagent, as described by Singleton & Rossi (1965) [20] and the results were expressed in μg gallic acid equivalents (GAE)/mg. Total flavonoid analysis was performed as described by Popova et al. (2005) [21], with modifications. Briefly, 4 mL of BBP was mixed with 1% v/v acidified methanol solution and the mixture was vortexed (1 min) followed by sonication (25 °C, 30 min). One milliliter (1 mL) of 5% v/v aluminum chloride solution was added and the mixture was vortexed and kept in darkness for 30 minutes. After centrifugation for 10 min at 6000 x g, the absorbance was measured at 425 nm. The total flavonoid content was expressed as μg quercetin equivalents (QE)/mg.

The BBP capacity to reduce the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radicals was analyzed as described by Brand-Williams et al. (1995) [22], and Re et al. (1999) [23], respectively, and the results were expressed as μg Trolox equivalents (TE)/mg. The antioxidant capacity by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay was performed as described by Benzie & Strain (1996) [24] using fresh the FRAP reagent (300 nM acetate buffer, pH 3.6; 2.5 mL of 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-5-triazine [TPTZ] in 40 mM HCl; 2.5 mL FeCl_3 solution) and the results were expressed in mM FeSO_4 /mg.

2.2. Total carotenoids

Total carotenoids (TC) were performed as described by Lichtenthaler (1987) [25] with minor modifications. BBP was extracted twice with 80% acetone, vortexed, and sonicated for 30 min. The extracts were combined and centrifuged at 6000 x g. The absorbance of the supernatant was measured at 450 nm, 646 nm, and 663 nm respectively to determine the total carotenoids, and the results were expressed in $\mu\text{g}/\text{mg}$ (w/w).

2.3. Biogenic amine profile by high-performance liquid chromatography (HPLC)

Briefly, BAs were extracted as described by Borges et al. (2019) [26] as follows. The BBP (100 mg) was mixed with 3000 μL of cold perchloric acid at 5% (v/v). After that, the mixture was centrifuged at 3800 g (Hettich Zentrifugen, Mikro220R) for 20 min at 4 °C, and to the supernatant was added dansyl chloride and saturated sodium carbonate (2 M). After incubation for 1 h at 60 °C, 200 μL of proline was added to the mixture and maintained in the dark for 30 min at room temperature. To this mixture 1000 μL of toluene was added, hardly homogenate, and the supernatant was dried under gaseous nitrogen. The samples were resuspended in acetonitrile and 20 μL was injected into the HPLC system (Dionex UltiMate 3000; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a quaternary pump, automatic sampler 3000, diode array detector (DAD-3000), and an ACE C18 column ($4.6 \times 250 \text{ mm}$; 5 μm) at 25 °C. The analysis was monitored at 280 nm, and the integration peak and calibrations were realized between 210 and 350 nm using Chromeleon 7 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The chromatography gradient was established to a mixture of solvents (A) 100% acetonitrile and (B) 50% acetonitrile, as follows: 0–2 min, 40% A + 60% B; 2–4 min, 60% A + 40% B; 4–8 min, 65% A + 35% B; 8–12 min, 85% A + 15% B; 12–15 min, 95% A + 5% B; 15–21 min, 85% A + 15% B; 21–22 min, 75% A + 25% B; 22–25 min, 40% A + 60% B. The amount of each BA (agmatine, serotonin, dopamine, histamine, tyramine, tryptamine, putrescine, cadaverine, spermidine, and spermine) was calculated by comparing the peaks areas with standards, and the area below the curve obtained through calibration curves and expressed in $\mu\text{g}/\text{g}$ (w/w).

2.4. Experimental protocol and groups characterization

Male Wistar rats with 21 days ($\pm 185 \text{ g}$) obtained from the Animal Center of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP, Botucatu, SP, Brazil) were randomly distributed into four groups ($n = 12$ per group): control diet (C), C + BBP, high sugar-fat diet (HSF), and HSF + BBP for 20 weeks, as previously described [1,2,7]. BBP was administered by gavage (250 mg/Kg/day). The vehicle used was water. The HSF was elaborated at the Experimental Research Unity (UNIPEX) of the Botucatu Medical School. This diet comprised soybean meal, sorghum, soybean peel, dextrin, sucrose, fructose, lard, minerals, and salt. HSF groups also received 25% sucrose in drinking water, whereas normal drinking water was given to C rats without any addition. The dietary model of this experiment was based on the study by Francisqueti et al. (2017) [27]. The animals were housed in individual cages

under controlled temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), luminosity (12h light/ dark cycle), humidity ($60 \pm 5\%$), and received diets and water *ad libitum*. Groups C and HSF received the vehicle (water) by gavage. The experiments and procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Botucatu (protocol number CEUA-1137). They were performed under the National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and followed the ARRIVE guidelines.

2.5. Nutritional and biochemical profile analysis

The nutritional profile was evaluated according to caloric intake and body weight. Food and water intake were calculated daily from the individual leftovers of each animal, and caloric intake was determined by multiplying the energy value of each diet ($\text{g} \times \text{Kcal}$) by the food intake. For the HSF group, it also included calories from water ($0.25 \times 4 \times \text{mL}$ consumed). The animal's body weight was evaluated weekly. After 8 h of fasting, glucose concentration was determined using a glucometer (Ac-cu-Chek Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

2.6. Superoxide dismutase activity in cardiac tissue

Superoxide dismutase (SOD) activity of cardiac tissue was measured based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol by spectrophotometry at 420 nm. The results were expressed in pmol SOD/mg protein/min [28].

2.7. Systolic blood pressure

SBP evaluation was assessed in conscious rats by the non-invasive tail-cuff method with a NarcoBioSystems® Electro-Sphygmomanometer (International Biomedical, Austin, TX, USA) at the end of 20 weeks, as described [1,2,7]. In a study pilot, it was seen that this diet model induced systolic arterial hypertension after 1 month of the experiment, and this increase was maintained for up to 30 weeks. The animals were kept in a wooden box ($50 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$) between 38 and 40°C for 4–5 min to stimulate arterial vasodilation [29]. After this procedure, a cuff with a pneumatic pulse sensor was attached to the tail of each animal. The cuff was inflated to 200 mmHg pressure and subsequently deflated. The blood pressure values were recorded on a Gould RS 3200 polygraph (Gould Instrumental, Valley View, OH, USA). The average of three pressure readings was recorded for each animal.

2.8. Statistical analysis

Data are presented as average $\pm$ standard deviation. Differences between the groups were determined by two-way ANOVA with Tukey's post hoc test. Statistical analyses were performed using SigmaStat for Windows Version 3.5. (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and discussion

BBP is a good source of bioactive compounds, such as phenolic compounds, profile widely characterized [7], and carotenoids, which have antioxidant capacity. In this study, the total phenolic compounds of BBP were reevaluated by spectrophotometry considering that this methodology, despite being less specific, is still well accepted and easily accessible. Due to the BBP being obtained without the peel, the levels of these antioxidants are in line with those described in the literature for pulp and seed [15]. The total phenolic compounds content in BBP ($15 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Table 1) was close to the one in wasted parts (pulp and seed) of orange fruit [15]. However, the total flavonoids ($5.1 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$) content (Table 1) was lower than described by the authors (about

Table 1

Total phenolic compounds, total flavonoids, total carotenoids, and total antioxidant capacity in bergamot by-product.

Determination	Value
Total phenolic compounds ($\mu\text{g GAE}/\text{mg}$)	15.0 ± 2.1
Total flavonoids ($\mu\text{g QE}/\text{mg}$)	5.09 ± 0.22
Total carotenoids ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.07 ± 0.01
Total antioxidant capacity	
via DPPH ($\mu\text{g TE}/\text{mg}$)	5.35 ± 0.06
via ABTS ($\mu\text{g TE}/\text{mg}$)	1.30 ± 0.14
via FRAP ($\text{mM FeSO}/\text{mg}$)	2.54 ± 0.31

*GAE: Gallic acid equivalents; QE: Quercetin equivalents; TE: Trolox equivalents.

40 mg/g (w/w)). Polyphenol content in citrus fruit may vary depending on the analyzed tissue, time of development/harvest, and post-harvest treatments, among other biotic and abiotic factors. Bergamot fruit may show high contents of flavonoids [30], reaching 438 mg/100 g of naringin [31]. BBP showed lower values compared to other studies, which used fresh fruits and different tissues, cultivation, and preparation methods. In addition to phenolic compounds, BBP presented carotenoids ($0.07 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Table 1). In bergamot by-product, Siano et al. (2023) [32] detected $0.61 \text{ mg}/\text{kg}$ of total carotenoids, while other studies describe carotenoid contents between 1.44 and $4.69 \text{ mg}/100 \text{ g}$ for mandarin oranges depending on the analyzed cultivar [33]. All these compounds influence the antioxidant activity of BBP, measured via DPPH ($5.4 \mu\text{g TE}/\text{mg}$), ABTS ($1.3 \mu\text{g TE}/\text{mg}$), and FRAP ($2.5 \text{ mM FeSO}/\text{mg}$) (Table 1).

The HSF increased body weight, caloric intake, and blood glucose (Table 2). Although BBP is a compound derived from bergamot and has been described as a source of flavonoids with an antioxidant action [7]; it did not prevent these nutritional and biochemical changes generated by the HSF.

In this study, we observed an increase in body weight, as well as in blood glucose. It is noteworthy that the HSF is rich in fat from animal sources and sugar, which are metabolized by enzymes such as pancreatic lipase and those related to the glycolytic pathway. Although there is a description in the literature that bergamot contains flavonoids that can act as hypoglycemic [34], the addition of BBP to the HSF group was not effective in decreasing blood glucose levels (Table 2), agreeing with another study [7], nor caloric intake levels. Regarding systolic blood pressure, it was observed that the HSF diet promotes an increase in levels. When comparing the HSF and HSF + BBF groups, a decrease in blood pressure levels was observed, showing that the compound studied was effective in preventing hypertension triggered by the consumption of HSF. Studies have shown that bergamot juice extract has a positive effect on glucose levels, factors that can contribute to blood pressure control [35]. These effects are attributed to the bioactive compounds present in this fruit, moreover, it is possible to hypothesize that these compounds, in some way, may also be acting on some mechanism that regulates blood pressure. Several flavonoids were detected in bergamot, including hesperidin, and naringenin, among others [30,36] and certainly, they are part of the total phenols and total flavonoids present in BBP, which may have influenced blood pressure levels (Table 1; Fig. 1).

As there is a difference in phenolic polarity [37], BBP was diluted in water for administration to Wistar rats by gavage, promoting the best bioaccessibility and bioavailability of hydrophilic compounds, such as the flavonoids, naringenin and hesperidin, and BAs. Studies show that the addition of hesperidin and naringenin in diets for stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) did not significantly change body weight, but improved blood pressure [13]. This phenomenon was also observed in this study with the BBP administration to the HSF group (Fig. 1). Naringin, also detected in bergamot [30], normalized systolic blood pressure and improved vascular dysfunction and ventricular diastolic dysfunction in high carbohydrate, high fat-fed rats

Table 2
Nutritional profile and cardiac tissue superoxide dismutase activity of Wistar rats fed with a high sugar-fat diet and that received bergamot by-product administration.

Variable	Groups			
	C	C + BBP	HSF	HSF + BBP
Body weight (g)	474 ± 36	473 ± 67	532 ± 72 ^a	512 ± 59
Caloric intake (kcal/d)	97 ± 7	99 ± 14	111 ± 13 ^a	106 ± 14
Blood glucose (mg/dL)	80.9 ± 7.1	83.2 ± 9.5	91.4 ± 6.2 ^a	92.6 ± 8.5 ^d
SOD (pmol/mg protein/minute)	109 ± 21	97 ± 22	113 ± 31	89 ± 21 ^b

* Data presented as mean ± standard deviation and submitted to Two-way ANOVA with Tukey's post hoc ($p < 0.05$). a = C vs HSF; b = HSF vs HSF + BBP; c = C vs C + BBP; d = C + BBP vs HSF + BBP. C = control diet; BBP = bergamot by-product; HSF = high-sugar fat diet; SOD = superoxide dismutase activity in cardiac tissue.

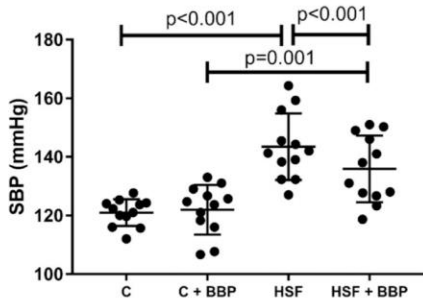


Fig. 1. Systolic blood pressure (mmHg) of Wistar rats fed with a high sugar-fat diet and that received bergamot by-product administration. *C = control diet; BBP = Bergamot by-product; HSF = High sugar-fat diet. SBP = systolic blood pressure.

[38]. These beneficial effects of naringin may be mediated by reduced inflammatory cell infiltration, reduced oxidative stress, lower plasma lipid concentrations, and improved liver mitochondrial function in rats [13].

The beneficial effect of flavonoids could be attributed to changes in the nitric oxide (NO) content [8,13]. Nitric oxide is a signaling molecule that binds to redox-active metals [39], and both excess and deficiency affect metabolism, including cardiovascular disease. Low levels of NO may be related to cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and hypertension, while high levels of NO modulated by NO synthase are related to cellular inflammation, hypotension, and inhibition of mitochondrial respiration, among others [40]. Flavonoids can act as pro-oxidants or as antioxidants depending mainly on the oxygen levels and pH of the medium. At low O₂ levels and more acidic pH, flavonoids preserve NO and increase their biological activity. On the other hand, at high oxygen levels and alkaline pH, flavonoids can scavenge NO, showing a pro-oxidant action. In a medium with high levels of O₂, even with high activity of superoxide dismutase (SOD), the formation of peroxynitrite (ONOO⁻) can occur, an oxidant species that contributes to vascular diseases, inflammation, pain, neurodegeneration, decrease in dopamine (involved with Parkinson's disease), among others [41]. In our study, SOD activity (Table 2) was lower when the rats were fed HSF + BBP, which may be an indication of the positive effect of the combination of BBP with the diet, that is, one of the effects may be attributed to the decrease of ONOO⁻, related to oxidative stress.

Another compound present in BBP, although in small amounts compared to phenolic compounds, were the carotenoids (Table 1) with polar chemical characteristics, since the product was obtained from the hydrophilic part of the fruit. It is noteworthy that the methodology used to detect carotenoids did not allow identification, only the amount. However, this was not a limitation, as the objective of this study was to synergistically approach the action of all the bioactive compounds present in BBP. Carotenoids can act as anti-inflammatories and antioxidants, factors that can modulate blood pressure levels [16,42].

Regarding the more polar carotenoids, a study carried out with diabetic individuals showed that supplementation with astaxanthin improved the lipid profile and lowered blood pressure [43]. However, in that study, no mechanism was investigated, so this improvement was attributed to the anti-inflammatory effect, confirmed by the increase in circulating levels of adiponectin [44]. In addition to inflammation, oxidative stress also plays a role in the pathology of hypertension associated with increased production of pro-oxidants such as superoxide anion hydrogen peroxide, reduced NO synthesis, and decreased bioavailability of antioxidants. Oxidative stress is found to be associated with endothelial dysfunction, inflammation, hypertrophy, apoptosis, cell migration, fibrosis, and angiogenesis in the vascular remodeling of hypertension [45]. Based on this, we can attribute that, due to the BBP antioxidant activity measured by DPPH, ABTS, and FRAP tests (Table 1), BBP may act as a scavenger radical, which may be contributing to the reduction of blood pressure levels observed in this study (Fig. 1).

Among the bioactive compounds that make up plant foods, in addition to flavonoids and carotenoids, BA, present in all cells, can influence metabolism and act as an antioxidant, mediating inflammatory processes. BBP has a remarkable concentration of BAs (444 µg/g) (Table 3). The BAs profile of BBP is composed of agmatine, serotonin, dopamine, histamine, tyramine, tryptamine, putrescine, cadaverine, spermidine, and spermine. Given the importance of knowing the profile of BAs in food products, we show for the first time, the BAs profile in BBP. Several biogenic amines have been described for their protective action on membranes, acting as antioxidants and helping to reduce inflammation generated by oxidative stress [26].

BBP has stood out levels of agmatine (140 µg/g, Table 3), a biogenic amine considered a free radical scavenger, with a cytoprotective effect due to the protection of mitochondria against oxidative stress, promoting a slowdown of apoptotic cell death [46]. BBP may represent an interesting source of agmatine, because according to Moretti et al. (2015) [47], the intake of 0.0001 – 1 mg/kg may have an antidepressant effect, contributing to the reduction of symptoms related to Parkinson's disease. In addition to agmatine, serotonin (4.46 µg/g) and

Table 3
Biogenic amines profile of bergamot by-product.

Biogenic Amine	Concentration (µg/g)
Histamine	28.4 ± 3.1
Tyramine	6.39 ± 0.39
Tryptamine	186 ± 11
Putrescine	29.0 ± 4.4
Cadaverine	10.6 ± 0.8
Spermidine	34.8 ± 4.3
Spermine	2.28 ± 0.25
Serotonin	4.46 ± 0.77
Dopamine	2.50 ± 0.29
Agmatine	140 ± 10

*Data presented as mean ± standard deviation.

dopamine (2.5 µg/g) were found in BBP. Serotonin, despite not efficiently crossing the blood-brain barrier, is described as an antioxidant [9] and has been implicated in metabolic regulation and some important physiological processes related to appetite, sleep, mood, anxiety, and blood pressure [48]. Dopamine, a neurotransmitter with high antioxidant activity, together with serotonin is implicated in the rewarding effects of food and there are hypotheses that the increased appetite in obese people is due to changes in the central systems of dopamine and serotonin [49]. Despite the serotonin and dopamine levels detected by BBP being below those described for some fruits and vegetables [10,26,50], it may be an interesting source of these neurotransmitters for future studies with obesity and improvement in physical condition.

The levels of some biogenic amines are important factors for detecting food and safety quality, mainly histamine and tyramine. High histamine levels can influence blood pressure, as well as induce edema, skin eruptions, and migraines, among others [51]. Its hypotensive effect is related to the reduction of blood volume and is considered a vasodilator [52]. In BBP, the histamine content of 28.4 µg/g (Table 3) is below the level considered toxic (50 mg/100 g) [53] but may have contributed to the result found in Fig. 1, in addition to being a favorable point in the intake of BBP.

Another biogenic amine – tyramine, should be considered due to its relation to blood pressure, among other harmful effects on the body, such as palpitations, nausea, and vomiting, among others [54]. The tyramine content in BBP (6.39 µg/g, Table 3), is below the 'no observed adverse effect level' (NOAEL) (200 mg per meal, female with 60 Kg) [55]. Both tyramine and histamine are monoamines that are oxidized by monoamine oxidases (MAO; EC 1.4.3.4), usually in the intestine and people who consume amino oxidase inhibitors (mono and diamine oxidase – MAOI/DAOI), alcohol, with gastrointestinal problems and deficiency of these enzymes [51], may show symptoms of histamine or tyramine poisoning. Thus, determining the content of both amines in BBP is of great importance to demonstrate the safety of its consumption.

In addition to histamine and tyramine promoting metabolic changes when ingested in greater amounts than recommended, tryptamine, due to its vasoconstrictor action, can also induce changes in blood pressure, inducing hypertension [56]. However, the levels of this biogenic amine are not regulated. In the tested product (BBP), the tryptamine content is 186 µg/g, while in tomatoes the levels reach 147.1 µg/g and in chicory, it reaches 0.8 µg/g [57]. Although NOAEL for tryptamine has not yet been well established, determining its content is critical as this amine can increase the harmful effect of histamine and tyramine [58]. No adverse effects, such as vomiting or diarrhea, were observed from the consumption of BBP.

In fruits and vegetables, it is common to find high levels of putrescine. For example, in orange juice, Preti et al. (2016) [17] detected putrescine as the predominant amine (45.5 mg/L) besides spermidine, spermine, serotonin, and histamine. Other studies also demonstrate that putrescine is the amine that occurs in higher concentrations, as described by Basheer et al. (2011) [18] and histamine shows lower levels (up to 0.26 mg/L). Putrescine and cadaverine are diamines related to microbial contamination and are related to food safety and security. In BBP, the levels of putrescine and cadaverine are 29 and 10.6 µg/g, respectively. Although few human studies have been conducted, a 'non-observed adverse effect level' (NOAEL) of 2000 ppm (180 mg/kg body weight/day) for both putrescine and cadaverine has been established in Wistar rats [59,60]. Both amines can also potentiate the toxic effect of histamine and tyramine [56].

Spermidine (34.8 µg/g) and spermine (2.28 µg/g) were detected in BBP (Table 3) and may act as antioxidants [61]. Although some studies demonstrate that they are involved in regulating DNA transcription, RNA translation, protein biosynthesis, and adjusting the immune response, these BAs can result in an acute decrease in blood pressure, in addition to being related to carcinogenesis, tumor invasion, and metastasis [62]. However, moderate consumption of spermidine (0.05% of

total daily nitrogen intake) may be important in the treatment of trauma [63], due to the improvement in protein absorption. Putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine, and spermine can be used as a quality index [10,61], important for verifying food safety. BBP's IQ shows a value of 1.79, which is above the so-called acceptable limit, which can be attributed to the higher values of histamine and putrescine, despite being considered tolerable and safe by several studies. Thus, although the IQ was higher than that described in other studies with food [9,10], the levels of each amine individually do not exceed what is allowed by some bodies [60]. No adverse effects were observed in the animals after administration of BBP.

Noticing the synergistic hypotensive effect of BBP, future research could be conducted evaluating the effects of the biogenic amines found in BBP, isolated or combined by themselves, on vascular and cardiac tissue of animals with metabolic disorders, induced or not by unhealthy diets.

4. Conclusion

BBP has notable amounts of phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant capacity by DPPH, ABTS, and FRAP, and has low levels of carotenoids. Moreover, the biogenic amine profile of *Citrus bergamia* was described for the first time. This fruit contains histamine, tyramine, tryptamine, putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, serotonin, dopamine, and agmatine. Although BBP has high levels of histamine and tryptamine, the levels of these compounds do not exceed safe levels and do not generate adverse effects in animals. BBP has remarkable levels of antioxidant biogenic amines, such as spermidine and agmatine.

The HSF had increased body weight, blood glucose, and blood pressure. BBP did not alter body weight and blood glucose but was able to reduce hypertension generated by this diet, suggesting a direct hypotensive action. The synergy effect of the bioactive compounds identified in BBP demonstrates great potential to prevent and/or treat hypertension.

Funding

This research was funded by The São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant numbers: 2021/13050, and 2022/01925-7); National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number: 310614/2020-1) and by AKHYNEX srl (Polistena, RC, Italy).

Data Availability

Data will be made available on request.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing interest.

Acknowledgments

We thank AKHYNEX srl (Polistena, RC, Italy) for providing the BBP. We are also grateful to Arch. Giuseppe Lombardo and Dr. Bombardelli for providing technical suggestions for the BBP preparation. We thank the Experimental Research Unit of Botucatu Medical School-UNIPEX, and the Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP, Brazil, for providing the necessary structure and equipment to conduct this research.

References

- [1] E.T. Nakandakare-Maia, J.S. Siqueira, A.J.T. Ferron, T.A. Vieira, T.L.N. Palacio, N.A. Grandini, C.R. Corrêa, Treatment with bergamot (*Citrus bergamia*) leaves extract attenuates leptin resistance in obese rats, *Mol. Cell. Endocrinol.* 566 (2023) 111908, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111908>.

- [2] J.S. Siqueira, E.T. Nakandakare-Maia, T.A. Vieira, T.L.N. Palacio, N.A. Grandini, M.A.F. Belin, C.R. Correa, Effect of bergamot leaves (*Citrus bergamia*) in the crosstalk between adipose tissue and liver of diet-induced obese rats, *Livers* 3 (2) (2023) 258–270, <https://doi.org/10.3390/livers3020017>.
- [3] K.T. Mills, A. Stefanescu, J. He, The global epidemiology of hypertension, *Nat. Rev. Nephrol.* 16 (4) (2020) 223–237, <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2>.
- [4] B.M. Egan, S.E. Kjeldsen, K. Narkiewicz, R. Kreutz, M. Burnier, Single-pill combinations, hypertension control and clinical outcomes: potential, pitfalls and solutions, *Blood Press.* 31 (1) (2022) 164–168, <https://doi.org/10.1080/08037051.2022.2095254>.
- [5] S.G. Rudra, J. Nishad, N. Jakhar, C. Kaur, Food industry waste: mine of nutraceuticals, *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 4 (1) (2015) 205–229 ISSN 2278-3687 (O).
- [6] J.B. Sharmeen, F.M. Mahomoodally, G. Zengin, F. Maggi, Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals, *Molecules* 26 (3) (2021) 666–680, <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>.
- [7] L.D. Vedova, F. Gado, T.A. Vieira, N.A. Grandini, T.L.N. Palacio, J.S. Siqueira, M. Carini, E. Bombardelli, C.R. Correa, G. Aldini, G. Baron, Chemical, nutritional and biological evaluation of a sustainable and scalable complex of phytochemicals from bergamot by-products, *Molecules* 28 (7) (2023) 2964–2986, <https://doi.org/10.3390/molecules28072964>.
- [8] S.J. Maleki, J.F. Crespo, B. Cabanillas, Anti-inflammatory effects of flavonoids, 125124-125135, *Food Chem.* 299 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>.
- [9] C.V. Borges, A. Nunes, V.E. Costa, R.O. Orsi, L.S.P. Basilio, G.C. Monteiro, M. Maraschin, G.P.P. Lima, Tryptophan and biogenic amines in the differentiation and quality of honey, *Int. J. Tryptophan Res.* 15 (2022) 1–12, <https://doi.org/10.1177/11786469221102098>.
- [10] L.S.P. Basilio, C.V. Borges, I.O. Minatel, P.F. Vargas, M.A. Tecchio, F. Vianello, G.P.P. Lima, New beverage based on grapes and purple-fleshed sweet potatoes: Use of non-standard tubers, 101626-101636, *Food Biosci.* 47 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101626>.
- [11] J. Su, H. Xu, J. Yu, J. Gao, J. Lei, Q. Yin, B. Li, M. Pang, M. Su, W. Mi, S. Chen, G. Lv, Luteolin ameliorates hypertensive vascular remodeling through inhibiting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells, *Evid. -Based Complement. Altern. Med.* 2015 (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/364876>.
- [12] B. Salehi, L. Machin, L. Monzote, J. Sharifi-Rad, S.M. Ezzat, M.A. Salem, W.C. Cho, Therapeutic potential of quercetin: new insights and perspectives for human health, *ACS Omega* 5 (20) (2020) 11849–11872, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>.
- [13] M. Ikemura, Y. Sasaki, J.C. Giddings, J. Yamamoto, Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Phytother. Res.* 26 (9) (2012) 1272–1277, <https://doi.org/10.1002/ptr.3724>.
- [14] S. Multari, C. Licciardello, M. Caruso, S. Martens, Monitoring the changes in phenolic compounds and carotenoids occurring during fruit development in the tissues of four citrus fruits, 109228-109243, *Food Res. Int.* 134 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109228>.
- [15] K.A.S. Elkhatim, R.A. Elagib, A.B. Hassan, Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits, *Food Sci. Nutr.* 6 (5) (2018) 1214–1219, <https://doi.org/10.1002/fsn3.660>.
- [16] T. Wolak, Y. Sharoni, J. Levy, K. Linnewiel-Hermoni, D. Stepensky, E. Paran, Effect of tomato nutrient complex on blood pressure: a double blind, randomized dose-response study, *Nutrients* 11 (5) (2019) 950–963, <https://doi.org/10.3390/nu11050950>.
- [17] R. Preti, R. Bernacchia, G. Vinci, Chemometric evaluation of biogenic amines in commercial fruit juices, *Eur. Food Res. Technol.* 242 (2016) 2031–2039, <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2701-5>.
- [18] C. Basheer, W. Wong, A. Makahleh, A.A. Tameem, A. Salhin, B. Saad, H.K. Lee, Hydrazone-based ligands for micro-solid phase extraction-high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in orange juice, *J. Chromatogr. A* 1218 (28) (2011) 4332–4339, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.073>.
- [19] M.A.F. Belin, F. Gendron, S. Cheng, V. Ziffle, Total phenolic compounds, carotenoids and in vitro antioxidant activity of three traditional indigenous medicinal plants of Saskatchewan, Canada, *Am. J. Plant Sci.* 12 (8) (2021) 1197–1209, <https://doi.org/10.4236/ajps.2021.128083>.
- [20] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (3) (1965) 144–158, <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>.
- [21] M. Popova, S.I.B.E.L. Silici, O. Kaftanoglu, V. Bankova, Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition, *Phytomedicine* 12 (3) (2005) 221–228, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.09.007>.
- [22] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C.L.W.T. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci. Technol.* 28 (1) (1995) 25–30, [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [23] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (9-10) (1999) 1231–1237, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [24] I.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239 (1) (1996) 70–76, <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- [25] H.K. Lichtenthaler, Chlorophyll fluorescence signatures of leaves during the autumnal chlorophyll breakdown, *J. Plant Physiol.* 131 (1-2) (1987) 101–110, [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(87\)80271-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80271-7).
- [26] C.V. Borges, M.A.F. Belin, E.P. Amorim, I.O. Minatel, G.C. Monteiro, H.A.G. Gomez, G.R.S. Monar, G.P.P. Lima, Bioactive amines changes during the ripening and thermal processes of bananas and plantains, 125020-125022, *Food Chem.* 298 (2019) 7, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125020>.
- [27] F.V. Francisqueti, I.O. Minatel, A.J.T. Ferron, S.G.Z. Bazan, V.S. Silva, J.L. Garcia, D.H.S. Campos, A.L. Ferreira, F. Moreto, A.C. Cicogna, C.R. Corrêa, Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet, *Nutrients* 9 (12) (2017) 1299–1309, <https://doi.org/10.3390/nu9121299>.
- [28] S.L. Marklund, Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis, *FEBS Lett.* 184 (2) (1985) 237–239, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80613-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80613-X).
- [29] P.P.D. Santos, B.P.M. Rafacho, A.D.F. Gonçalves, R.G. Jaldin, T.B.D. Nascimento, M.A.B. Silva, S.A.R.D. Paiva, Vitamin D induces increased systolic arterial pressure via vascular reactivity and mechanical properties, *PLoS One* 9 (6) (2014) e9895–e98904, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098955>.
- [30] A.R. Cappello, V. Dolce, D. Iacopetta, M. Martello, M. Fiorillo, R. Curcio, L. Muto, D. Dhanyalayam, Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) flavonoids and their potential benefits in human hyperlipidemia and atherosclerosis: an overview, *Mini Rev. Med. Chem.* 16 (8) (2016) 619–629, <https://doi.org/10.2174/1389557515666150709110222>.
- [31] Y. Nogata, K. Sakamoto, H. Shiratsuchi, T. Ishii, M. Yano, H. Ohta, Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 70 (1) (2006) 178–192, <https://doi.org/10.1271/bbb.70.178>.
- [32] F. Siano, G. Picariello, D. Castaldo, D. Cautela, T. Caruso, E. Vasca, Monitoring antioxidants by coulometry: quantitative assessment of the strikingly high antioxidant capacity of bergamot (*Citrus bergamia* R.) by-products, 123765-123774, *Talanta* 251 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123765>.
- [33] J. Zacarias-García, F. Rey, J.V. Gil, M.J. Rodrigo, L. Zacarias, Antioxidant capacity in fruit of *Citrus* cultivars with marked differences in pulp coloration: contribution of carotenoids and vitamin C, *Food Sci. Technol. Int.* 27 (3) (2021) 210–222, <https://doi.org/10.1177/1082013220944018>.
- [34] V. Mollace, M. Scicchitano, S. Paone, F. Casale, C. Calandruccio, M. Gliozzi, V. Musolino, C. Carresi, J. Maiuolo, S. Nucera, A. Riva, P. Allegrini, M. Ronchi, G. Petrangolini, E. Bombardelli, Hypoglycemic and hypolipemic effects of a new lecithin formulation of bergamot polyphenolic fraction: a double blind, randomized, placebo-controlled study, *Endocr., Metab. Immune Disord. -Drug Targets (Former. Curr. Drug Targets-Immune, Endocr. Metab. Disord.)* 19 (2) (2019) 136–143, <https://doi.org/10.2174/1871530319666181203151513>.
- [35] M.A. Alam, N. Subhan, M.M. Rahman, S.J. Uddin, H.M. Reza, S.D. Sarker, Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action, *Adv. Nutr.* 5 (4) (2014) 404–417, <https://doi.org/10.3945/an.113.005603>.
- [36] G. Baron, A. Altomare, M. Mol, J.L. Garcia, C. Correa, A. Raucchi, L. Mancinelli, S. Mazzotta, L. Fumagalli, G. Trunfio, L. Tucci, E. Lombardo, D. Malara, E. Janda, V. Mollace, M. Carini, E. Bombardelli, G. Aldini, Analytical profile and antioxidant and anti-inflammatory activities of the enriched polyphenol fractions isolated from bergamot fruit and leave, *Antioxidants* 10 (2) (2021) 141–167, <https://doi.org/10.3390/antiox10020141>.
- [37] E. Herrera-Pool, A.L. Ramos-Díaz, M.A. Lizardi-Jiménez, S. Pech-Cohuo, T. Ayora-Talavera, J.C. Cuevas-Bernardino, ... N. Pacheco, Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS, *Ultrason. Sonochem.* 76 (2021) 105658, <https://doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2021.105658>.
- [38] M.A. Alam, K. Kauter, L. Brown, Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats, *Nutrients* 5 (3) (2013) 637–650, <https://doi.org/10.3390/nu5030637>.
- [39] N.S. Bryan, Nitric oxide deficiency is a primary driver of hypertension, 115325-115334, *Biochem. Pharmacol.* 206 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115325>.
- [40] J. Duarte, V. Francisco, F. Perez-Vizcaino, Modulation of nitric oxide by flavonoids, *Food Funct.* 5 (8) (2014) 1653–1668, <https://doi.org/10.1039/C4FO00144C>.
- [41] C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi, Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (8) (2007) 662–680, <https://doi.org/10.1038/nrd2222>.
- [42] J. Amengual, Bioactive properties of carotenoids in human health, *Nutrients* 11 (10) (2019) 2388–2394, <https://doi.org/10.3390/nu11102388>.
- [43] W. Xia, N. Tang, H. Kord-Varkaneh, T.Y. Low, S.C. Tan, X. Wu, Y. Zhu, The effects of astaxanthin supplementation on obesity, blood pressure, CRP, glycemic biomarkers, and lipid profile: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Pharmacol. Res.* 161 (2020) 105113, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105113>.
- [44] N.S. Mashhadi, M. Zakerkish, J. Mohammadiasl, M. Zarei, M. Mohammadshahi, M.H. Haghigizadeh, Astaxanthin improves glucose metabolism and reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 27 (2) (2018) 341–346, <https://doi.org/10.6133/apjcn.052017.11>.
- [45] N. Sinha, P. Kumar Dabla, Oxidative stress and antioxidants in hypertension—a current review, *Curr. Hypertens. Rev.* 11 (2) (2015) 132–142, <https://doi.org/10.2174/1573402111666150529130922>.
- [46] S. Condello, M. Currò, N. Ferlazzo, D. Caccamo, J. Satriano, R. Lentile, Agmatine effects on mitochondrial membrane potential and NF- κ B activation protect against rotenone-induced cell damage in human neuronal-like SH-SY5Y cells, *J. Neurochem.* 116 (1) (2011) 67–75, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07085.x>.
- [47] M. Moretti, V.B. Neis, F.C. Matheus, M.P. Cunha, B.B. Rosa, C.M. Ribeiro, A.L.S. Rodrigues, R.D. Prediger, Effects of agmatine on depressive-like behavior induced by intracerebroventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), *Neurotox. Res.* 28 (2015) 222–231, <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9540-1>.

- [48] B. Strasser, J.M. Gostner, D. Fuchs, Mood, food, and cognition: role of tryptophan and serotonin, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 19 (1) (2016) 55–61, <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000237>.
- [49] K.A. Van Galen, K.W. Ter Horst, J. Booij, S.E. la Fleur, M.J. Serlie, The role of central dopamine and serotonin in human obesity: lessons learned from molecular neuroimaging studies, *Metabolism* 85 (2018) 325–339, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.007>.
- [50] M.S. Diamante, C.V. Borges, M.B. da Silva, I.O. Minatel, C.R. Corrêa, H.A. Gomez Gomez, G.P.P. Lima, Bioactive amines screening in four genotypes of thermally processed cauliflower, *Antioxidants* 8 (8) (2019) 311–326, <https://doi.org/10.3390/antiox8080311>.
- [51] C. Ruiz-Capillas, A.M. Herrero, Impact of biogenic amines on food quality and safety, *Foods* 8 (2) (2019) 62–92, <https://doi.org/10.3390/foods8020062>.
- [52] T.A. Cookson, Bacterial-induced blood pressure reduction: mechanisms for the treatment of hypertension via the gut, 721393-721406, *Front. Cardiovasc. Med.* 8 (2021), <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.721393>.
- [53] M. Gagic, E. Jamroz, S. Krizkova, V. Milosavljevic, P. Kopel, V. Adam, Current trends in detection of histamine in food and beverages, *J. Agric. Food Chem.* 67 (3) (2018) 773–783, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05515>.
- [54] A. Durak-Dados, M. Michalski, J. Osek, Histamine and other biogenic amines in food, *J. Vet. Res.* 64 (2) (2020) 281–288, <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0029>.
- [55] P. Paulsen, R. Grossgut, F. Bauer, E. Rauscher-Gabernig, Estimates of maximum tolerable levels of tyramine content in foods in Austria, *J. Food Nutr. Res.* 51 (1) (2012) 52–59 <<https://web.s.ebscohost.com/ehost/detail?vid=0&sid=990d44de-dc4d-40f3-9c52-ae8f35945e3b%40redis&bdata=Jmxbmc9cHQYnImc2l0ZT1laG9zdC1saXZlAN=73755717&db=aph>>.
- [56] B. Del Rio, B. Redruello, M. Fernandez, M.C. Martin, V. Ladero, M.A. Alvarez, The biogenic amine tryptamine, unlike β -phenylethylamine, shows in vitro cytotoxicity at concentrations that have been found in foods, 127303-127320, *Food Chem.* 331 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127303>.
- [57] D. Ly, K. Kang, J.Y. Choi, A. Ishihara, K. Back, S.G. Lee, HPLC analysis of serotonin, tryptamine, tyramine, and the hydroxycinnamic acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables, *J. Med. Food* 11 (2) (2008) 385–389, <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.514>.
- [58] V. Ladero, D.M. Linares, M. Pérez, B. Del Rio, M. Fernández, M.A. Alvarez, Biogenic amines in dairy products, *Microb. Toxins Dairy Prod.* (2017) 94–131, <https://doi.org/10.1002/9781118823095.ch4>.
- [59] H.P. Til, H.E. Falke, M.K. Prinsen, M.I. Willems, Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats, *Food Chem. Toxicol.* 35 (3-4) (1997) 337–348, [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00121-X).
- [60] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods, *EFSA J.* 9 (10) (2011) 2393–2486, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>.
- [61] W. Wójcik, M. Lukaszewicz, K. Puppel, Biogenic amines: formation, action and toxicity—a review, *J. Sci. Food Agric.* v. 101, (n. 7) (2021) 2634–2640, <https://doi.org/10.1002/jsfa.10928>.
- [62] A.E. Pegg, Toxicity of polyamines and their metabolic products, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (12) (2013) 1782–1800, <https://doi.org/10.1021/tx400316s>.
- [63] E. Larqué, M. Sabater-Molina, S. Zamora, Biological significance of dietary polyamines, *Nutrition* 23 (1) (2007) 87–95, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.006>.

Capítulo 3. Artigo científico 2

(Apresentado nas normas para submissão
à revista *Free Radical Biology and Medicine*)

Title: Bergamot supplementation prevents cardiac dysfunction and remodeling in obese rats

Matheus AF Belin¹, Taynara A Vieira¹, Núbia A Grandini¹, Juliana S Siqueira¹, Thiago LN Palacio¹, Erika T Nakandakare-Maia¹, Anderson SS Fujimori¹, Jordanna Cruzeiro¹, Luis E Sormani¹, Dijon HS Campos¹, Silmeia GZ Bazan¹, Bertha F Polegato¹, Giuseppina PP Lima², Giancarlo Aldini³, Camila R Correa^{1*}.

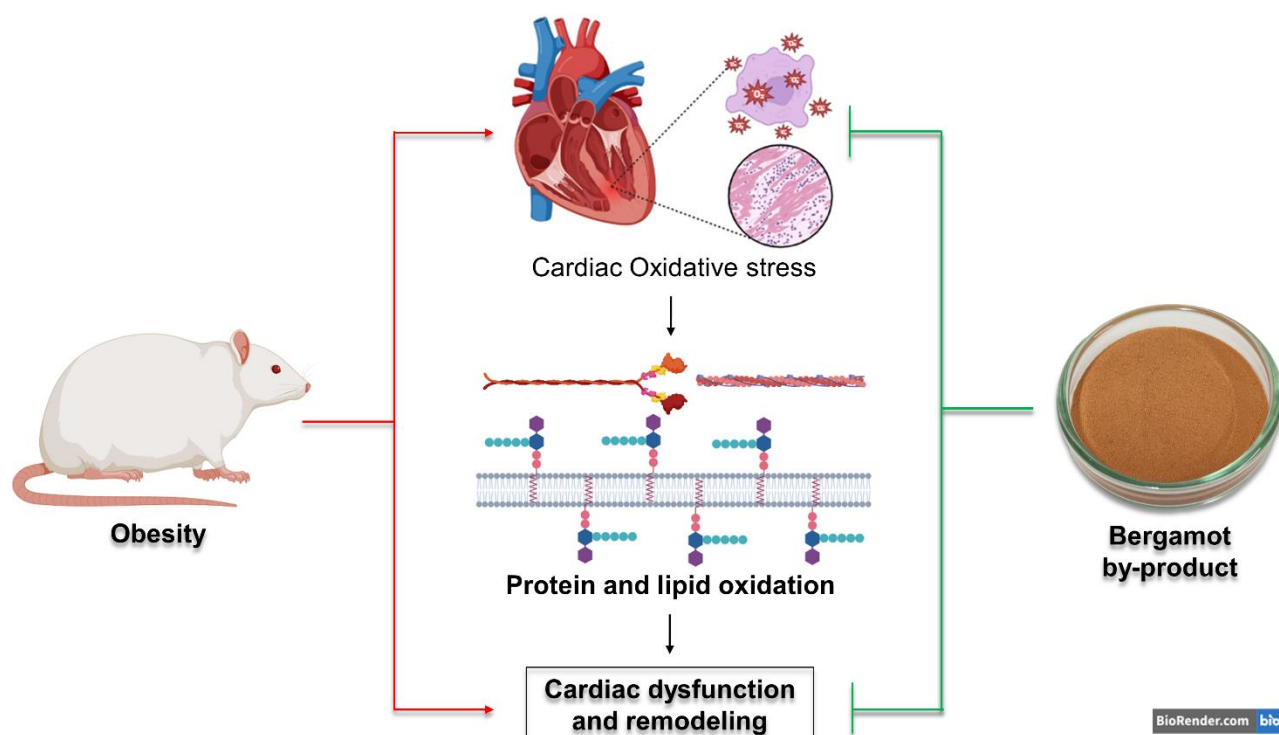
*Corresponding author: camila.camacho@unesp.br

¹Department of Pathology, Medical School, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu 18618-687, Brazil

²Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu 18618-970, Brazil

³Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Via Mangiagalli 25, 20133 Milan, Italy

Graphical Abstract



Highlights:

- Obesity decreases cardiac activation of Nrf2
- Obesity increases cardiac inflammation and oxidative stress
- Obesity generates cardiac dysfunction and remodeling
- Bergamot supplementation improves the cardiac antioxidant capacity in obese rats
- Bergamot supplementation prevents cardiac inflammation, lipid, and protein oxidation in obese rats
- Bergamot supplementation prevents cardiac dysfunction and remodeling in obese rats
- Bergamot supplementation decreases cardiac inflammation in healthy rats

Abbreviations

- Control = C; Bergamot = B; Obese = O.

Acknowledgments

We thank AKHYNEX srl (Polistena, RC, Italy) for providing the bergamot pulp and juice to prepare the bergamot supplement (EndoBerg®). We are also grateful to Arch. Giuseppe Lombardo and Dr. Bombardelli for providing technical suggestions for the supplement preparation. Experimental Research Unit of FMB-UNESP – UNIPEX, Brazil.

Funding sources

This research was funded by The São Paulo Research Foundation, grant numbers: 2021/13050, and 2022/01925-7; National Council for Scientific and Technological Development, grant number: 310614/2020-1; and by AKHYNEX srl (Polistena, RC, Italy).

Author Contributions

Methodology, formal analysis, data curation: T.A.V., E.T.N., N.A.G., T.L.N.P., J.S.S., J.C, L.E.S., A.S.S.F., and D.H.S.C.; methods and data analysis for the analytical part: G.A., M.A.F.B., S.G.Z.B., B.F.P. and G.P.P.L.; writing—original draft preparation: C.R.C., M.A.F.B., B.F.P., and G.A.; writing—review and editing: G.A; C.R.C.; Conceptualization: M.A.F.B., S.G.Z.B., and C.R.C.; Supervision: G.P.P.L., G.A. and C.R.C.

Data availability

Data will be made available on request to authors.

Declaration of interest: none.

Abstract

Introduction: Obesity generates a pro-inflammatory scenario and systemic oxidative stress, triggering cardiac remodeling and dysfunction. Bergamot (B) is rich in bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory potential. This study aimed to evaluate the effect of bergamot supplementation on the development of cardiac remodeling and dysfunction in obese rats. **Material and Methods:** 48 Wistar rats were equally allocated into 4 groups: control (C), C+B, obese (O), and O+B. Obesity was diet-induced. Bergamot was administrated by gavage (250 mg/Kg/d) for 20 weeks. Was performed a Doppler Echocardiography study, the analysis of Nuclear Factor Kappa B (NFKB), NFKB-Phosphorylated (NFKB-P), NF-E2-Related Factor 2 (NRF2), and Kelch-like ECH-Associated Protein 1 (KEAP 1) expression by Western Blotting, cardiac inflammatory (Interleukins: IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor- α : TNF- α) and oxidative stress markers (Malondialdehyde-MDA, protein carbonylation-PC, and Ferric Reducing Antioxidant Power-FRAP). **Results:** The O group developed cardiac remodeling and dysfunction and had a decreased activation of NRF2 ($p=0.031$), and higher levels of IL-10 ($p=0.016$), TNF- α ($p=0.009$), MDA ($p=0.024$), and PC ($p<0.001$), and lower antioxidant capacity by FRAP ($p<0.001$). Bergamot supplementation prevented the development of cardiac remodeling and dysfunction in obese animals by modulating the production of inflammatory cytokines: IL-10 ($p=0.008$), TNF- α ($p=0.013$), MDA ($p=0.038$), and oxidative stress indicators: PC ($p<0.001$) and FRAP ($p<0.001$). **Conclusion:** Bergamot supplementation has myocardial antioxidant and anti-inflammatory properties and was able to prevent cardiac remodeling and dysfunction in obese rats.

Keywords: obesity, inflammation, oxidative stress, *Citrus bergamia*, antioxidant capacity, protein carbonylation, malondialdehyde.

Introduction

Obesity has been a growing disease since 1970 and will affect more than 30% of the population in 2030, that is, more than 2.5 billion people (Coker *et al.*, 2023). This disease deregulates metabolism, increases oxidative stress, and systemic inflammation, and generates systemic diseases, such as cardiac remodeling and dysfunction (Tutor *et al.*, 2023), markers of heart disease (HD), which kills the most (Gaidai *et al.*, 2023). Strategies are needed to treat and combat HD.

Citrus fruits and their bioactive compounds have shown promising results against HD. The phenolic compounds and flavonoids in *citrus* can act on metabolic changes, oxidative stress, and inflammation generated by obesity and reduce the occurrence and/or severity of systemic diseases caused by obesity, such as HD (Ahmed *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021; Minami *et al.*, 2023; Samanta *et al.*, 2023).

Bergamot (*Citrus bergamia*) is a source of phenolic compounds, such as flavonoids, and biogenic amines, both with antioxidant potential (Belin *et al.*, 2024). This fruit has already demonstrated *in vitro* effects of inhibiting the expression of Nuclear Factor Kappa B (NFKB), related to increased inflammation; and increased expression of NF-E2-Related Factor 2 (NRF2), related to increased anti-inflammatory response (Baron *et al.*, 2021). Additionally, Vedova *et al.*, (2023) showed that bergamot promotes a reduction in some parameters of the metabolic syndrome such as triglycerides, systemic blood pressure, and insulin resistance in addition to reducing body fat (Della Vedova *et al.*, 2023). However, the effect of bergamot on the heart's expression of these proteins has not yet been studied.

Knowing the antioxidant and anti-inflammatory potential of bergamot, and the need to control oxidative stress and inflammation related to HD generated by obesity, this study aims to evaluate the effect of bergamot supplementation on the development of cardiac remodeling and dysfunction in obese rats.

Material and Methods

Bergamot supplement

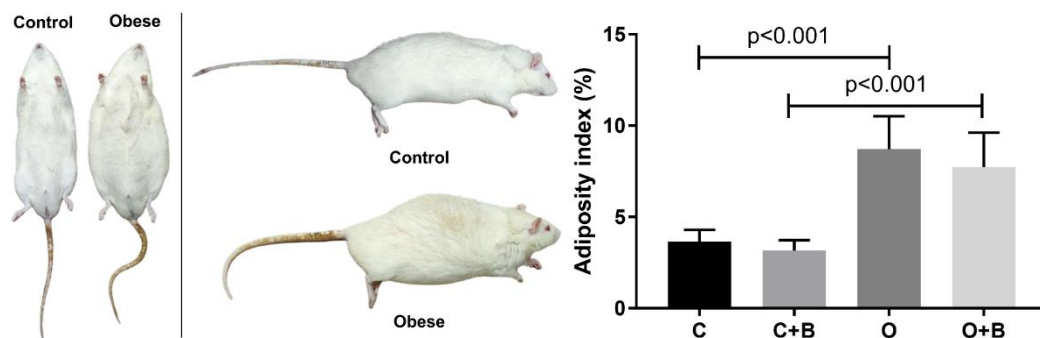
Bergamot supplement (commercial name EndoBerg®) was produced at an

industrial level by AKHYNEX srl, (Polistena, RC, Italy). Bergamot supplement has polyphenols, flavonoids, and biogenic amines (Baron *et al.*, 2021; Belin *et al.*, 2024).

Obesity induction and experimental protocol

Obesity (Figure 1) was induced by a high-sugar fat diet (HSF), as previously described by our group (Garcia *et al.*, 2022; Siqueira *et al.*, 2023; Nakandakare-Maia *et al.*, 2023; Belin *et al.*, 2024). The obese animals had more than twice the body fat of the control group animals ($p < 0.001$) (Fig. 1). The experiments and procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Botucatu (protocol number CEUA-1137). They were performed under the *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*, as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. Male Wistar rats (± 190 g) obtained from the Animal Center of Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP, Botucatu, SP, Brazil) were randomly distributed into four groups ($n=12$ per group): control (C), control supplemented with bergamot (C+B), obese (O), and obese supplemented with bergamot (O+B) for 20 weeks. Bergamot was administered by gavage (250 mg/Kg/day), as showed by other study (Belin *et al.*, 2024). The animals were housed in individual cages under controlled temperature (22 ± 3 °C), luminosity (12 h light/ dark cycle), and humidity ($60 \pm 5\%$) and received diets and water *ad libitum*. After intraperitoneal anesthesia with sodium thiopental 150 mg/kg, the animals were euthanized, and the left ventricle (LV) was collected, frozen with liquid nitrogen, and stored at -80°C for analysis.

Figure 1. Obesity induced in male Wistar rats.



*Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Tukey's post hoc ($p < 0.05$). (n = 48; 12 / group). C: control; B: bergamot; O: obese.

Doppler Echocardiography study

Doppler echocardiographic evaluation was performed by a single examiner using commercially available echocardiography (General Electric Medical Systems, Vivid S6, Tirat Carmel, Israel) equipped with a 5–11.5 MHz multifrequency ultrasonic transducer.

Animals were anesthetized with ketamine (50 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (1 mg/kg, i.p.). After the anterior chest region trichotomy, the animals were placed in slight left lateral decubitus for the exam. The equipment used was model Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel) with a multifrequency ultrasonic transducer 5.0–11.5 MHz. To implement structural measurements of the heart, the images were obtained in one-dimensional mode (M-mode) guided by the images in two-dimensional mode with the transducer in the parasternal position, minor axis. LV evaluation was performed by positioning the cursor M-mode just below the mitral valve plane at the level of the papillary muscles. The images of the aorta and left atrium were obtained by positioning the M-mode course to plan the level of the aortic valve.

The cardiac morphology was analyzed through left ventricle diastolic diameter (LVDD); left ventricle systolic diameter (LVSD); Left Ventricular Mass (LVM); Left ventricular relative thickness (LVRT); Left ventricular mass index (LVMI); diastolic thickness of the interventricular septum (IST); diastolic posterior wall thickness (PWT); left atrium diameter (LA); LA/AO ratio. The

cardiac function was assessed by heart rate; left ventricle posterior wall shortening velocity (PWSV); ejection fraction (EF); cardiac output (CO); cardiac index (CI); early and late diastolic mitral inflow velocities ratio (E/A ratio); Doppler systolic displacement of the mitral annulus (S') (average of septal and lateral walls); Doppler early diastolic displacement of the mitral annulus (E'), and Doppler late diastolic displacement of the mitral annulus (A') (average of septal and lateral walls); E/E' ratio, and E'/A' ratio.

Western Blotting analysis

LV tissue (100 mg) was homogenized in RIPA buffer and centrifuged. Supernatants were collected and total protein was quantified by the Bradford method (1976). Western blotting was performed in acrylamide gels and proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were incubated in 5% skimmed milk. Then, membranes were incubated with primary antibodies NFKB, NFKB-P, NRF2, and KEAP1 (SC-8008, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA; SC-136548, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA; SC-722, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA; E-AB-60460, Elabscience Biotechnology Inc., Houston, TX, USA, respectively) for 16 h, and then incubated with secondary antibodies. Antibody anti-Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (SC-32233, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) was used for normalization. To delimitate the NFKB and NRF2 activation, the expression ratios NFKB/NFKB-P and NRF2/KEAP1 were calculated.

RedOx/Inflammatory parameters in cardiac tissue

Tissue preparation

The LV samples were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 (1:10; w/v) using a bead beater homogenizer (Bullet Blender®, Next Advance, Inc., NY, USA). The homogenates were centrifuged at 800×g for 10 min at 4 °C (Eppendorf® Centrifuge 5804- R, Hamburg, Germany), and the supernatant was obtained to measure the inflammatory and oxidative stress markers. The Bradford (1976) method was used to determine the total protein content.

Inflammatory markers

The inflammatory markers, interleukin-10 (IL-10), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), were assessed using the ELISA method using commercial kits (Rat IL-10 DuoSet ELISA, DY522; Rat IL-6 DuoSet ELISA, DY506; Rat TNF-alpha DuoSet ELISA, DY510; R&D System, Minneapolis, MN, USA).

Oxidative stress markers

For Malondialdehyde (MDA) quantification, thiobarbituric acid (TBA) (0.67% w/v) in proportion (1: 1) was added to the supernatant and heated for 45 min in a water bath at 100 °C. MDA reacted with TBA in a 1:2 MDA-TBA ratio and after cooling, reading was performed at 532 and 600 nm with a Spectra Max 190 microplate reader (Molecular DevicesVR, Sunnyvale, CA, USA). The concentration of MDA was obtained through the molar extinction coefficient ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) and the absorbances of cardiac tissue, and the result was expressed in nmol/mg (Uchiyama and Mihara, 1978). Protein carbonyl content analysis was performed by a non-specific method that uses DNPH (2,4-dinitro-phenylhydrazine derivatizing agent) and photometric detection of any protein modified by carbonylation (Mesquita *et al.*, 2014). Protein carbonylation (PC) levels are expressed in nmol of DNPH/mg of protein. The Ferric Reducing Antioxidant Power FRAP was adapted from Benzie & Strain (1996) to evaluate the antioxidant capacity to reduce iron. After the reaction with the fresh FRAP reagent (FeCl₃ 20 nmol/L, acetate buffer 0.3 mol/L and 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine 10 mmol/L), the results are expressed in nmol Fe/L.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation or median (interquartile range). Two-way ANOVA determined differences between the groups with Tukey's post-hoc test or Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test. Statistical analyses were performed using SigmaStat for Windows Version 3.5. (Systat

Software, Inc., San Jose, CA, USA). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Doppler Echocardiography study

The Doppler echocardiography is presented in Table 1. The obese animals developed cardiac remodeling, by increased LVSD, LVM, LVRT, LVMI, IST, PWT, LA, LA/AO, and dysfunction, by increased A' and E/E' ratio, and by decreased PWSV, EF, CO, CI, E/A ratio, S', E', E'/A' ratio. Bergamot supplementation prevented the development of cardiac remodeling and dysfunction in obese animals.

Table 1. Doppler echocardiography of obese rats supplemented with bergamot.

Variable	Groups			
	C	C + B	O	O + B
Heart rate (bpm)	290 ± 51	286 ± 50	272 ± 60	303 ± 52
<u>Morphological</u>				
LVDD (mm)	7.08 ± 0.48	7.17 ± 0.36	6.80 ± 0.47	7.19 ± 0.38 ^b
LVSD (mm)	2.73 ± 0.14	2.78 ± 0.20	3.06 ± 0.31 ^a	2.86 ± 0.11 ^b
LVM (g)	0.70 ± 0.09	0.74 ± 0.07	0.94 ± 0.14 ^a	0.75 ± 0.08 ^b
LVRT (mm)	0.42 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.57 ± 0.05 ^a	0.43 ± 0.03 ^b
LVMI (g/g)	1.49 ± 0.21	1.59 ± 0.28	1.80 ± 0.32 ^a	1.47 ± 0.17 ^b
IST (mm)*	1.52(1.50-1.53)	1.53(1.53-1.59)	2.00(1.88-2.04) ^a	1.53(1.53-1.55) ^b
PWT (mm)	1.49 ± 0.06	1.52 ± 0.03	1.92 ± 0.12 ^a	1.55 ± 0.06 ^b
LA (mm)	4.64 ± 0.14	4.67 ± 0.27	5.56 ± 0.24 ^a	4.71 ± 0.14 ^b
LA/AO	1.23 ± 0.07	1.23 ± 0.08	1.42 ± 0.09 ^a	1.23 ± 0.07 ^b
<u>Functional</u>				
PWSV (mm/s)	83.8 ± 4.6	81.4 ± 4.3	67.2 ± 6.3 ^a	85.5 ± 4.9 ^{bd}
EF (%)	0.94 ± 0.02	0.94 ± 0.01	0.91 ± 0.02 ^a	0.94 ± 0.01 ^b
CO (L/min)	99.5 ± 28.9	100.6 ± 27.1	78.2 ± 2.3 ^a	105.5 ± 20.2 ^b
CI (L/min/m ²)	212 ± 66	217 ± 64	150 ± 48 ^a	209 ± 45 ^b
E/A ratio (cm/s)	1.77 ± 0.27	1.81 ± 0.53	1.28 ± 0.46 ^a	1.68 ± 0.34 ^b
S' (cm/s)	5.69 ± 0.32	5.74 ± 0.47	5.13 ± 0.20 ^a	5.73 ± 0.37 ^b
E' (cm/s)	5.39 ± 0.36	5.39 ± 0.46	3.22 ± 0.33 ^a	5.44 ± 0.43 ^b
A' (cm/s)	3.45 ± 0.30	3.28 ± 0.18	4.93 ± 0.43 ^a	3.47 ± 0.37 ^b
E/E' ratio*	11.8(10.6-12.4)	11.9(11.1-13.1)	18.6(15.8-19.9) ^a	11.7(10.5-12.7) ^b
E'/A' ratio	1.56 ± 0.07	1.64 ± 0.09 ^c	0.66 ± 0.07 ^a	1.57 ± 0.11 ^{bd}

C = Control; B = Bergamot; O = Obese. LVSD: left ventricle systolic diameter; LVM: Left Ventricular Mass; LVRT: Left ventricular relative thickness; LVMI: Left ventricular mass index; IST: diastolic thickness of the interventricular septum; PWT: diastolic posterior wall thickness; LA: left atrium diameter; AO: aorta diameter; PWSV: left ventricle posterior wall shortening velocity; EF: ejection fraction; CO: cardiac output; CI: cardiac index; E wave: early diastolic mitral inflow velocity; A wave: late diastolic mitral inflow velocity. S': Doppler systolic displacement of the mitral annulus; E': Doppler early diastolic displacement of the mitral annulus; A': Doppler late diastolic displacement of the mitral annulus. Data presented as mean ± standard deviation or median with interquartile range (*) and submitted to Two-way ANOVA with Tukey's

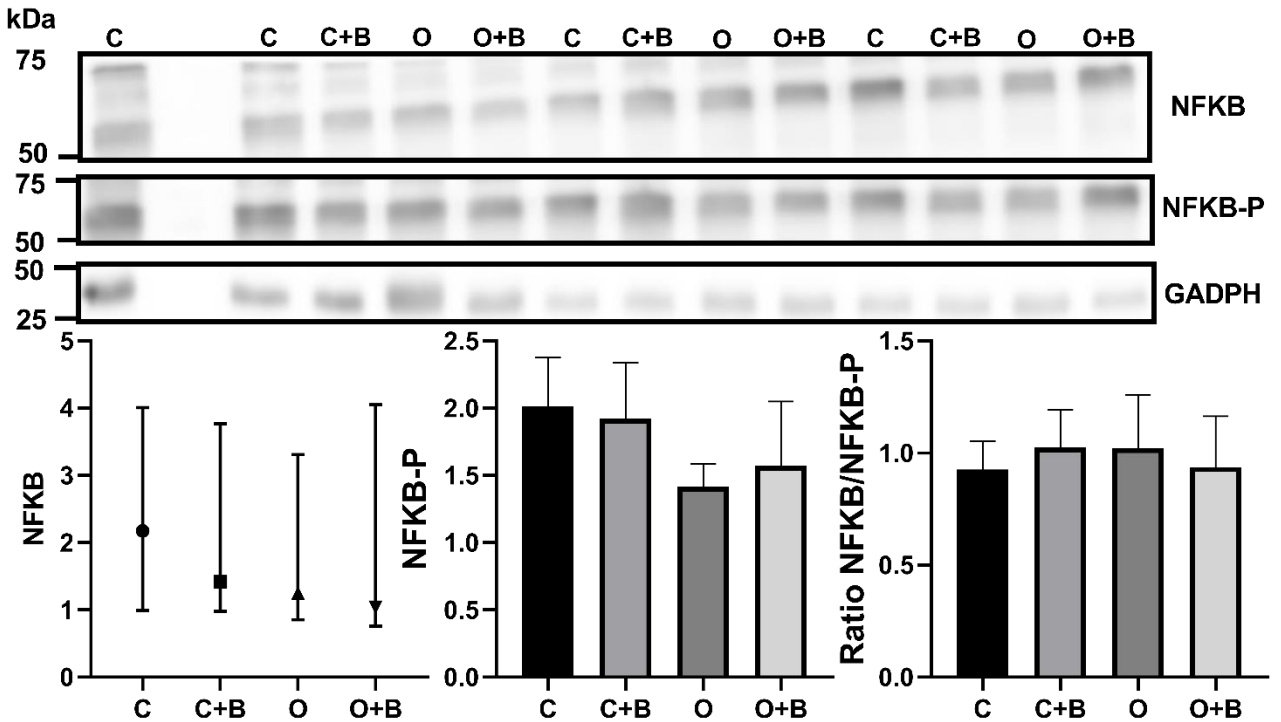
post hoc or Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test ($p < 0.05$). (n = 48; 12 / group). a = C vs O; b = O vs O + B; c = C vs C + B; d = C + B vs O + B.

Protein expression

- NFKB and NFKB-Phosphorylated

The cardiac NFKB and NFKB-P expression normalized by GAPDH by Western blot, and the NFKB/NFKB-P expression ratio are presented in Figure 2. Even obesity or bergamot did not influence the expression of these proteins.

Figure 2. Cardiac NFKB and NFKB-P expression, normalized by GAPDH, by Western blot, and NFKB/NFKB-P expression ratio in cardiac tissue of obese rats supplemented with bergamot.

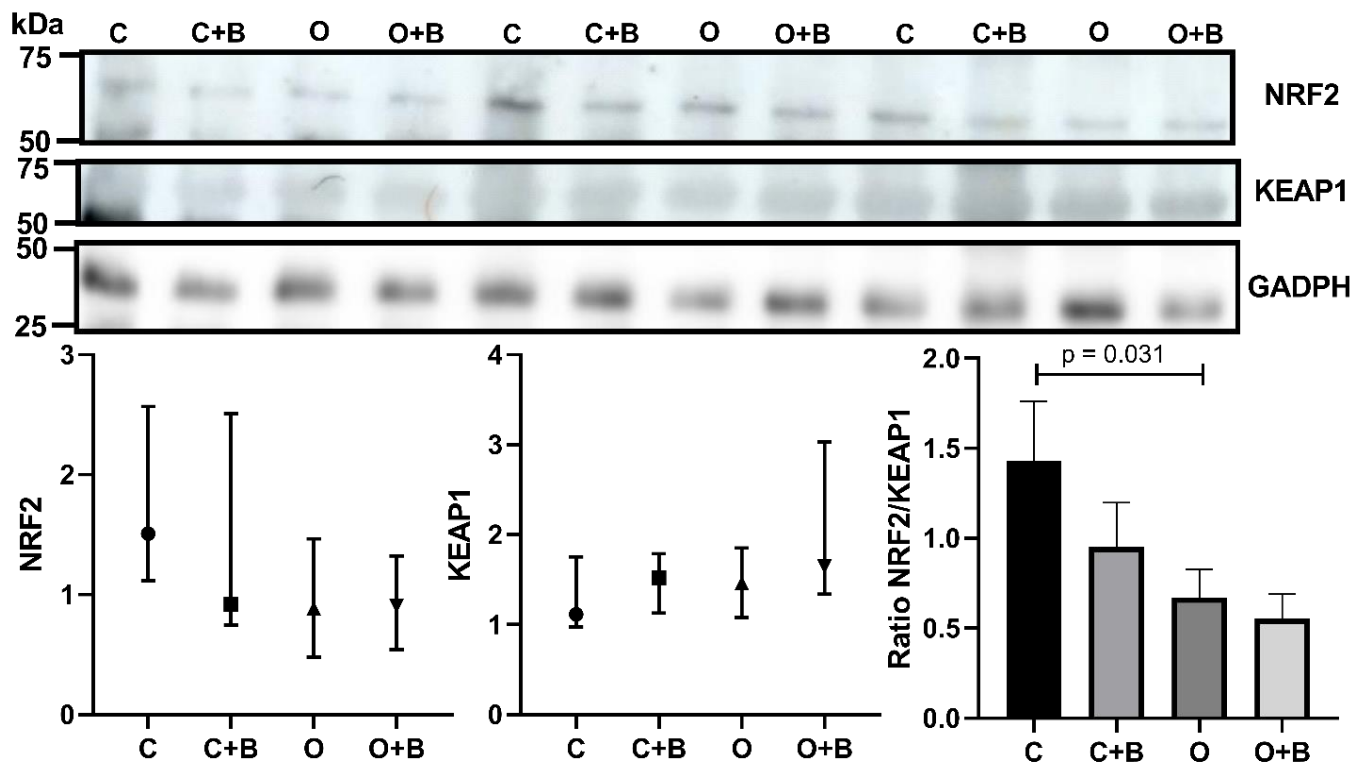


NFKB: Nuclear Factor Kappa B; NFKB-P: Phosphorylated-Nuclear Factor Kappa B; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; C: control; B: bergamot; O: obese. Data presented as mean $\pm$ standard deviation or median with interquartile range () and submitted to Two-way ANOVA with Tukey's post hoc or Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test ($p < 0.05$). (n = 48; 12 / group).

- NRF 2 and KEAP 1

The cardiac NRF2 and KEAP1 expression, normalized by GAPDH by Western blot and NRF2/KEAP1 expression ratio in Figure 3. Obesity decreases the activation of NRF2, decreasing the production of antioxidant defense. Bergamot did not influence the expression of these proteins.

Figure 3. Cardiac NRF2 and KEAP1 expression, normalized by GAPDH, by Western blot and NRF2/KEAP1 expression ratio in cardiac tissue of obese rats supplemented with bergamot.

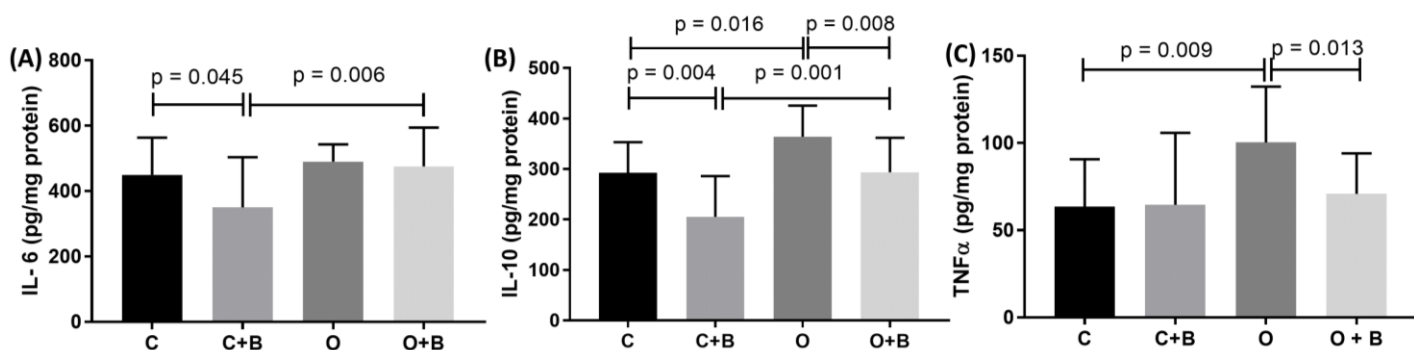


NRF2: NF-E2-Related Factor 2; KEAP1: Kelch-like ECH-Associated Protein 1; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; C: control; B: bergamot; O: obese. Data presented as mean $\pm$ standard deviation or median with interquartile range () and submitted to Two-way ANOVA with Tukey's post hoc or Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc test ($p < 0.05$). (n = 48; 12 / group).

Cardiac inflammatory markers

The cardiac inflammatory markers are present in Figure 4. The control animals that received bergamot supplementation had decreased levels of IL-6 when compared to control animals and obese animals with bergamot supplementation. Obesity promoted an increase in the inflammatory cytokines TNF- α , and IL-10, but bergamot supplementation prevented this increase.

Figure 4. Cardiac inflammatory markers in cardiac tissue of obese rats supplemented with bergamot.

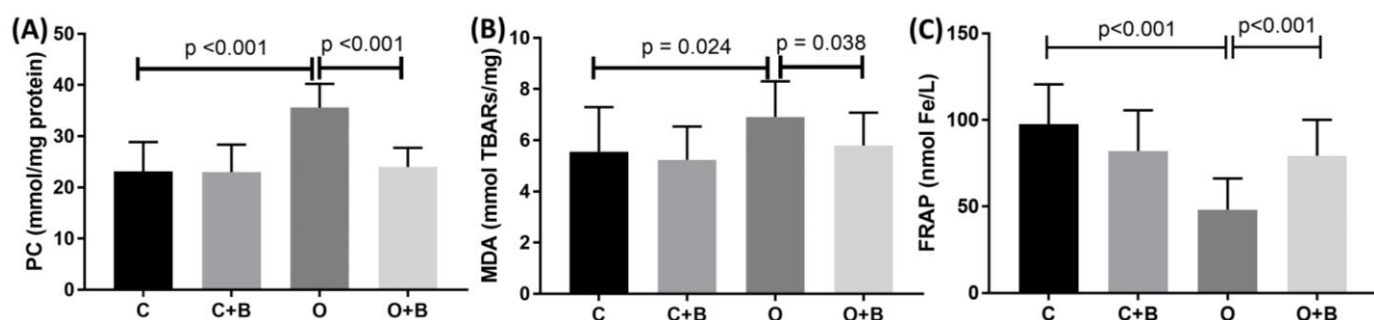


*(A) IL-6 (pg/mg protein); (B) IL-10 (pg/mg protein); (C) TNF- α (pg/mg protein). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Tukey's post hoc ($p < 0.05$). (n = 48; 12 / group). IL: interleukin; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha. C: control; B: bergamot; O: obese.

Cardiac oxidative stress markers

Cardiac oxidative stress markers are shown in Figure 5. The obese animals had increased levels of lipid peroxidation, by MDA, and PC, and had a decreased antioxidant capacity by FRAP. The supplementation with bergamot prevented the increase in MDA and PC and increased the antioxidant capacity by FRAP, then preventing the cardiac oxidative stress.

Figure 5. Cardiac oxidative stress markers in cardiac tissue of obese rats supplemented with bergamot.



*(A) PC levels (mmol/mg protein); (B) MDA levels (nmol/mg protein); (C) FRAP levels (nmol Fe/L). Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Comparison by two-way ANOVA with Tukey's post hoc ($p < 0.05$). ($n = 48$; 12 / group). PC: Protein carbonylation; MDA: Malondialdehyde; FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Powder; C: control; B: bergamot; O: obese.

Discussion

This study aimed to evaluate the effect of bergamot supplementation on developing cardiac remodeling and dysfunction in obese rats. Most clinical studies with obesity and cardiac changes can easily show cardiac dysfunction. However, it is difficult to study the mechanisms involved and carry out interventions, therefore, preclinical studies are necessary. In preclinical studies, the majority do not have this characteristic, that is, pre-clinical obesity models in which remodeling and cardiac dysfunction are possible to be generated, or even improve cardiac function (Oliveira Junior *et al.*, 2013; Vileigas *et al.*, 2021). This is because obesity was induced in our study through diet, and we did not use animals with genetic predisposition/knockout. Here, obesity was induced through the HSF diet, that is, a Western standard, composed mainly of simple sugar (fructose and sucrose) and saturated fat, which is more efficient in causing cardiac aggression (Garcia *et al.*, 2022; Kaur *et al.*, 2022; Francisqueti-Ferron *et al.*, 2023; Teicholz, 2023), therefore, it is the appropriate model for pre-clinical studies because it is identical to the dietary pattern of obese humans.

The results demonstrated, through echocardiography, that obese animals receiving bergamot did not develop cardiac remodeling and dysfunction. These

results of cardioprotection in obesity are in line with the cardioprotective effect of bergamot against diabetic cardiomyopathy and toxicity by doxorubicin (Maiuolo *et al.*, 2021; Algieri *et al.*, 2022) and with the protection with bergamot leaves (Siqueira *et al.*, 2024). The term “cardiac remodeling” is defined as a group of molecular, cellular, and interstitial changes that clinically manifest as changes in size, shape, and function of the heart resulting from cardiac injury. The clinical diagnosis of remodeling is based on the detection of morphological changes – changes in the cavity diameter, mass (hypertrophy and atrophy), geometry (heart wall thickness and shape), fibrosis, and inflammatory infiltrate (e.g in myocarditis) (Azevedo *et al.*, 2015). Cardiac dysfunction is the main consequence of pathological cardiac remodeling, which occurs according to the intensity and duration of aggression. This interaction starts with genetic changes in response to cardiac aggression, with re-expression of fetal genes and, consequently, molecular, cellular, and morphological changes occur, resulting in progressive loss of ventricular function, initially asymptomatic, which can evolve into signs and symptoms of heart failure (Azevedo *et al.*, 2015).

Studies have shown that one of the pathophysiological mechanisms for cardiac remodeling in obesity is oxidative stress and inflammation (Aimo *et al.*, 2020), as in our study. Oxidative stress is triggered by the increase in reactive oxygen species by the activation of NADPH oxidase, increased catecholamine degradation, increased xanthine oxidase, mitochondrial dysfunction, decreased antioxidant systems, having, therefore, lipid peroxidation, protein oxidation, DNA damage, cell dysfunction, fibroblast proliferation, metalloproteinase activation, increased apoptosis, and increased signaling pathways to hypertrophy. Additionally, inflammation occurs through adaptive response dysfunction, having consequently increased inflammatory cytokines, such as TNF- α , and macrophage, T cell, and B cell dysfunction (Azevedo *et al.*, 2015). These two pathophysiological pillars of cardiac remodeling, inflammation, and stress oxidative, can be controlled by nuclear factors such as NFkB; and NRF2 (Kruszewska *et al.*, 2022).

The results of oxidative stress and inflammation evaluated in this work

show that bergamot prevented oxidative stress and TNF- α in the myocardium of animals in the O+B group. These data lead us to attribute that the prevention of cardiac dysfunction and remodeling may be associated with these factors, as the MDA formation may also be a marker of the development of cardiac remodeling, due to the shift in the metabolism of this organ (Jiménez-González *et al.*, 2020). Our data agree with Maiuolo *et al.* (2021), where bergamot polyphenols reduced MDA formation in heart tissue and decreased cardiac dysfunction. The increase in protein oxidation in cardiac tissue can harm the entire structure and function of this organ, since both contractile proteins, calcium transport proteins, and extracellular matrix proteins must be intact and not oxidized, avoiding fibrosis and loss of function (Da Dalt *et al.*, 2023). The oxidation of these structures can also generate cell death and activate the immune response, increasing inflammation, as seen in TNF- α and IL-10. When obese animals were given bergamot, cardiac remodeling, and dysfunction did not develop. Similar results to those were found when administering *citrus* fruits in a cardiotoxicity model (Ribeiro *et al.*, 2021). It was seen that the structural and functional changes resulting from obesity were not developed with bergamot supplementation. Bergamot supplementation, due to its bioactive compounds, such as phenolics, flavonoids, and antioxidant biogenic amines (Belin *et al.*, 2024), was able to directly modulate the response to oxidative stress, elevation of TNF- α and IL-10 resulting from obesity, even without altering the expression of NFkB and NRF2, demonstrating possible direct and local action of bergamot bioactive compounds on the protein and lipid structures of cardiac tissue (Samtiya *et al.*, 2021; Maiuolo *et al.*, 2021). This information is in line with our results since we found no influence of bergamot on the protein expression of the transcriptional factors NFkB and NRF-2. In addition, Bergamot can reduce mitochondrial dysfunction and sarcoplasmic reticulum stress (Maiuolo *et al.*, 2021) in heart disease, and can regulate the cell metabolism in heart tissue-challenged (Algieri *et al.*, 2021). The pro-inflammatory role of TNF-alpha is well recognized, but there may be some confusion regarding the role of IL-10. The increase in pro-inflammatory TNF-alpha, concomitant with the increase in anti-inflammatory IL-10, may signify the body's response to inflammation. IL-10 is

secreted by M2 profile macrophages and is defined as an anti-inflammatory cytokine and a potent inhibitor of pro-inflammatory cytokines, which may be important for recovery after cardiac injuries (Jung *et al.*, 2017). Despite this, the induction of IL-10 often occurs at the same time as the induction of pro-inflammatory cytokines, although the pathways that induce IL-10 can negatively regulate these pro-inflammatory cytokines (Saraiva & O'garra, 2010). The literature reports that IL-10 plays an irreplaceable role in the negative regulation of inflammation, mainly through a mechanism that selectively blocks the expression of pro-inflammatory genes that encode cytokines, chemokines, cell surface molecules, and other molecules involved in propagation of inflammation (Murray, 2006). Therefore, our data demonstrate an increase in cardiac inflammation resulting from obesity and the prevention of this increase in animals that received bergamot.

Unlike what was observed with TNF-alpha and IL-10, obesity did not increase IL-6 levels. Bergamot supplementation also did not influence IL-6 levels in obese animals but reduced its levels in C+B animals, control/healthy, without obesity, and the pro-inflammatory and oxidative stress environment generated by it. Obesity may not alter IL-6 levels, a pro-inflammatory cytokine. Obesity is associated with a chronic low-grade inflammatory state, with increased production of TNF-alpha in both adipose tissue and the heart, contributing to the development of insulin resistance, endothelial dysfunction, cardiac remodeling, inflammation, cardiomyocyte apoptosis, and development of fibrosis resulting in cardiac dysfunction (Azevedo *et al.*, 2015; Tutor *et al.*, 2023). In this scenario, in contrast to inflammation, the production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, is increased to limit tissue damage and modulate the immune response. This process is recognized as an attempt by the body to counterbalance the inflammation promoted by TNF-alpha and other pro-inflammatory cytokines (Murray, 2006; Saraiva & O'garra, 2010). Divergently, IL-6 production may be more variable and dependent on factors specific to the cell type and tissue microenvironment. In some contexts, IL-6 may not be as prominently regulated as TNF-alpha (McElvaney *et al.*, 2021). Furthermore, IL-6 can be regulated differently depending on the type of

stress or injury (McElvaney *et al.*, 2021), such as, in this case, injury by obesity (Wueest & Konrad, 2020). In this sense, obesity and cardiovascular disease can create a specific inflammatory microenvironment in the heart, where TNF-alpha is more predominantly increased than IL-6. This may be due to the cellular origin of the cytokines, or the nature of the inflammatory cells present (Sun *et al.*, 2021). For example, IL-6 coordinates humoral responses, while TNF α is responsible for cellular responses (Amin *et al.*, 2020). There may still be differences in intracellular signaling. The intracellular signaling pathways activated by TNF-alpha and IL-10 may differ from those activated by IL-6. Depending on the cell type and physiological state, signaling via IL-6 may not be as active as the TNF-alpha-mediated and IL-10 pathways (Illán-Gómez *et al.*, 2012). Metabolic influences should also be considered. Obesity can alter cellular metabolism and signaling, influencing the differential expression of cytokines. For example, insulin resistance associated with obesity may impact the production of TNF-alpha and IL-10 more than that of IL-6 depending on the duration of the study (Tanti & Jager, 2009). Looking at the effects of bergamot supplementation in healthy animals, we saw a decrease in IL-6 and IL-10 levels, demonstrating an anti-inflammatory effect. The reduction of the pro-inflammatory cytokine IL-6, and consequently IL-10, may occur due to the presence of anti-inflammatory polyphenols and biogenic amines of bergamot (Carresi *et al.*, 2020; Gualtieri *et al.*, 2023). Although we did not see a change in NF-kB expression in our study, the bioactive compounds in this fruit may have acted on other components of this pathway, such as membrane receptors, for example, toll-like receptors (TLR), or I κ B complex Kinase (IKK) (Coutinho-Wolino *et al.*, 2022), and having inhibited this pathway can result in a selective reduction of IL-6 without altering the levels of other cytokines such as TNF-alpha. The biogenic amines present in bergamot, such as putrescine, spermidine, and spermine (Belin *et al.*, 2024), can have profound effects on cell signaling, modulating differently the production of cytokines such as IL-6 and IL-10 (Dasdelen *et al.*, 2023). Biogenic amines can interact with specific receptors on the cell surface, activating intracellular signaling cascades. Some biogenic amines can bind to G Protein-Coupled Receptors

(GPCRs), known to modulate several cellular signaling pathways (Strassheim *et al.*, 2021). Activation of these receptors can lead to a series of downstream responses that may include inhibition of IL-6 and IL-10 production (Minami *et al.*, 2003; Schroeter *et al.*, 2008). Biogenic amines can also modulate enzymes responsible for IL-6 production. Putrescine, spermidine, and spermine can regulate the activity of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) (Hobbs & Gilmour, 2006; Park & Kim, 2012), which regulate gene expression and can suppress the expression of inflammatory-related genes such as IL-6 or the IL-10 (Gatla *et al.*, 2019). Added to this, biogenic amines, such as phenolic compounds and flavonoids in bergamot, can cause epigenetic modifications that affect the expression of inflammatory-related cytokines. These compounds can influence DNA methylation, which can epigenetically silence specific genes encoding IL-6 and IL-10, resulting in a decrease in their expression and levels (Shenderov *et al.*, 2020). Biogenic amines can also interfere with the activity of RNA polymerase II, the enzyme responsible for the transcription of mRNA from DNA (Cao *et al.*, 2015), thus modulating the synthesis of IL-6 and IL-10. Additionally, biogenic amines can also modulate the signaling of growth factors such as TGF- β , which can influence the production of IL-6 and IL-10 (Moya-García *et al.*, 2021). Finally, specific synergistic interactions may exist between the bioactive compounds in bergamot (Belin *et al.*, 2024), enhancing the effects described above.

Given the increasing number of studies regarding the benefits of bergamot on cardiovascular health, and as seen the benefits in healthy and obese animals, without side effects or negative changes from supplementation, it is recommended that new clinical studies be carried out evaluating the benefits of bergamot on cardiovascular health.

Conclusion

Bergamot supplementation prevents cardiac remodeling and dysfunction in obese rats. Bergamot supplementation has great potential in combating heart disease in obesity through controlling oxidative stress, however, it is still important to understand which protein and lipid structures in cardiac tissue bergamot acts on.

References

- Ahmed, O. M., AbouZid, S. F., Ahmed, N. A., Zaky, M. Y., & Liu, H. An up-to-date review on citrus flavonoids: chemistry and benefits in health and diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 27(4), 513-530, 2021. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201127122313>
- Aimo, A., Castiglione, V., Borrelli, C., Saccaro, L. F., Franzini, M., Masi, S., ... & Giannoni, A. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: from pathophysiology to therapeutic strategies. *European journal of preventive cardiology*, 27(5), 494-510, 2020. <https://doi.org/10.1177/2047487319870344>
- Algieri, C., Bernardini, C., Oppedisano, F., La Mantia, D., Trombetti, F., Palma, E., ... & Nesci, S. The Impairment of Cell Metabolism by Cardiovascular Toxicity of Doxorubicin Is Reversed by Bergamot Polyphenolic Fraction Treatment in Endothelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8977, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23168977>
- Amin, M. N., Siddiqui, S. A., Ibrahim, M., Hakim, M. L., Ahammed, M. S., Kabir, A., & Sultana, F. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of cardiovascular disease and cancer. *SAGE open Medicine*, 8, 2050312120965752, 2020. <https://doi.org/10.1177/2050312120965752>
- Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A., & Zornoff, L. A. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 106, 62-69, 2015. <https://doi.org/10.5935/abc.20160005>
- Baron, G., Altomare, A., Mol, M., Garcia, J. L., Correa, C., Raucci, A., ... & Aldini, G. Analytical profile and antioxidant and anti-inflammatory activities of the enriched polyphenol fractions isolated from bergamot fruit and leave. *Antioxidants*, 10(2), 141, 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10020141>
- Belin, M. A. F., Siqueira, J. S., Vieira, T. A., Grandini, N. A., Palacio, T. L. N., Nakandakare-Maia, E. T., ... & Correa, C. R. Bergamot by-product, a source of biogenic amines, reduces hypertension induced by high sugar-fat diet. *Pharmacological Research-Natural Products*, 2, 100022, 2024.

<https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100022>

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cao, J., Arha, M., Sudrik, C., Mukherjee, A., Wu, X., & Kane, R. S. A universal strategy for regulating mRNA translation in prokaryotic and eukaryotic cells. *Nucleic acids research*, 43(8), 4353-4362, 2015.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkv290>

Carresi, C., Gliozzi, M., Musolino, V., Scicchitano, M., Scarano, F., Bosco, F., ... & Mollace, V. The effect of natural antioxidants in the development of metabolic syndrome: Focus on bergamot polyphenolic fraction. *Nutrients*, 12(5), 1504, 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12051504>

Coker, T., Saxton, J., Retat, L., Guzek, J., Card-Gowers, J., BinDhim, N. F., ... & Alqahtani, S. A. How could different obesity scenarios alter the burden of type 2 diabetes and liver disease in Saudi Arabia?. *Obesity Facts*, 16(6), 559-566, 2023. <https://doi.org/10.1159/000533301>

Coutinho-Wolino, K. S., Almeida, P. P., Mafra, D., & Stockler-Pinto, M. B. Bioactive compounds modulating Toll-like 4 receptor (TLR4)-mediated inflammation: pathways involved and future perspectives. *Nutrition Research*, 107, 96-116, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2022.09.001>

Da Dalt, L., Cabodevilla, A. G., Goldberg, I. J., & Norata, G. D. Cardiac lipid metabolism, mitochondrial function, and heart failure. *Cardiovascular Research*, 119(10), 1905-1914, 2023. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvad100>

Dasdelen, D., Cetin, N., Menevse, E., Baltaci, A. K., & Mogulkoc, R. Effects of putrescine on oxidative stress, spermidine/spermine-N (1)-acetyltransferase, inflammation and energy levels in liver and serum in rats with brain ischemia-reperfusion. *Physiology International*, 110(1), 34-45, 2023.

<https://doi.org/10.1556/2060.2022.00138>

Della Vedova, L., Gado, F., Vieira, T. A., Grandini, N. A., Palácio, T. L., Siqueira, J. S., ... & Baron, G. Chemical, Nutritional and Biological Evaluation of

a Sustainable and Scalable Complex of Phytochemicals from Bergamot By-Products. *Molecules*, 28(7), 2964, 2023.

<https://doi.org/10.3390/molecules28072964>

Francisqueti-Ferron, F. V., Belin, M. A. F., Palacio, T. L. N., Ferron, A. J. T., Garcia, J. L., Siqueira, J. S., ... & Minatel, I. O. Fructose Consumption Alters Biogenic Amines Associated with Cardiovascular Disease Risk Factors. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 120, e20220770, 2023.

<https://doi.org/10.36660/abc.20220770>

Gaidai, O., Cao, Y., & Loginov, S. Global cardiovascular diseases death rate prediction. *Current Problems in Cardiology*, 101622, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2023.101622>

Garcia, J. L., Vileigas, D. F., Gregolin, C. S., Costa, M. R., Francisqueti-Ferron, F. V., Ferron, A. J. T., ... & Corrêa, C. R. Rice (*Oryza sativa* L.) bran preserves cardiac function by modulating pro-inflammatory cytokines and redox state in the myocardium from obese rats. *European Journal of Nutrition*, 1-13, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s00394-021-02691-0>

Gatla, H. R., Muniraj, N., Thevkar, P., Yavvari, S., Sukhavasi, S., & Makena, M. R. Regulation of chemokines and cytokines by histone deacetylases and an update on histone decetylase inhibitors in human diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1110, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20051110>

Gualtieri, P., Marchetti, M., Frank, G., Smeriglio, A., Trombetta, D., Colica, C., ... & Di Renzo, L. Antioxidant-Enriched Diet on Oxidative Stress and Inflammation Gene Expression: A Randomized Controlled Trial. *Genes*, 14(1), 206, 2023. <https://doi.org/10.3390/genes14010206>

Gutiérrez-Cuevas, J., Sandoval-Rodriguez, A., Meza-Rios, A., Monroy-Ramírez, H. C., Galicia-Moreno, M., García-Bañuelos, J., ... & Armendariz-Borunda, J. Molecular mechanisms of obesity-linked cardiac dysfunction: an up-date on current knowledge. *Cells*, 10(3), 629, 2021.

<https://doi.org/10.3390/cells10030629>

Hobbs, C. A., & Gilmour, S. K. Role of polyamines in the regulation of chromatin acetylation. *Polyamine Cell Signaling: Physiology, Pharmacology, and*

- Cancer Research, 75-89, 2006. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-145-1_5
- Illán-Gómez, F., González-Ortega, M., Orea-Soler, I., Alcaraz-Tafalla, M. S., Aragón-Alonso, A., Pascual-Díaz, M., ... & Lozano-Almela, M. L. Obesity and inflammation: change in adiponectin, C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 after bariatric surgery. *Obesity surgery*, 22, 950-955, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11695-012-0643-y>
- Jiménez-González, S., Marín-Royo, G., Jurado-López, R., Bartolomé, M. V., Romero-Miranda, A., Luaces, M., ... & Cachofeiro, V. The crosstalk between cardiac lipotoxicity and mitochondrial oxidative stress in the cardiac alterations in diet-induced obesity in rats. *Cells*, 9(2), 451, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9020451>
- Jung, M., Ma, Y., Iyer, R. P., DeLeon-Pennell, K. Y., Yabluchanskiy, A., Garrett, M. R., & Lindsey, M. L. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic research in cardiology*, 112, 1-14, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0622-5>
- Kaur, A., Yousuf, H., Ramgobin-Marshall, D., Jain, R., & Jain, R. Energy drink consumption: a rising public health issue. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 23(3), 83, 2022. <https://doi.org/10.31083/j.rcm2303083>
- Kruszewska, J., Cudnoch-Jedrzejewska, A., & Czarzasta, K. Remodeling and Fibrosis of the Cardiac Muscle in the Course of Obesity—Pathogenesis and Involvement of the Extracellular Matrix. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4195, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23084195>
- Maiuolo, J., Carresi, C., Gliozzi, M., Musolino, V., Scarano, F., Coppoletta, A. R., ... & Mollace, V. Effects of bergamot polyphenols on mitochondrial dysfunction and sarcoplasmic reticulum stress in diabetic cardiomyopathy. *Nutrients*, 13(7), 2476, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13072476>
- McElvaney, O. J., Curley, G. F., Rose-John, S., & McElvaney, N. G. Interleukin-6: obstacles to targeting a complex cytokine in critical illness. *The Lancet Respiratory Medicine*, 9(6), 643-654, 2021. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00103-X)

Minami, G. S., Lumbantoruan, E. C., Nuraini, R., Harianto, J. C., & Fahrurroji, A. The potential of sweet orange (*Citrus sinensis*) in cardiovascular health: A literature review. *JKKI: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 82-94, 2023. <https://doi.org/10.20885/JKKI.Vol14.Iss1.art12>

Minami, Y., Kudo, M., Kawasaki, T., Chung, H., Ogawa, C., Inoue, T., ... & Shiozaki, H. Percutaneous ultrasound-guided radiofrequency ablation with artificial pleural effusion for hepatocellular carcinoma in the hepatic dome. *Journal of gastroenterology*, 38, 1066-1070, 2003.

<https://doi.org/10.1007/s00535-003-1197-5>

Moya-García, A. A., Pino-Ángeles, A., Sánchez-Jiménez, F., Urdiales, J. L., & Medina, M. Á. Histamine, metabolic remodelling and angiogenesis: a systems level approach. *Biomolecules*, 11(3), 415, 2021.

<https://doi.org/10.3390/biom11030415>

Murray, P. J. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Current opinion in pharmacology*, 6(4), 379-386, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.01.010>

Nakandakare-Maia, E. T., Siqueira, J. S., Ferron, A. J. T., Vieira, T. A., Palacio, T. L. N., Grandini, N. A., ... & Corrêa, C. R. Treatment with bergamot (*Citrus bergamia*) leaves extract attenuates leptin resistance in obese rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 566, 111908, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111908>

Oliveira Junior, S. A., Padovani, C. R., Rodrigues, S. A., Silva, N. R., Martinez, P. F., Campos, D. H., ... & Cicogna, A. C. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. *Cardiovascular diabetology*, 12, 1-10, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-65>

Park, I. H., & Kim, M. M. Spermidine inhibits MMP-2 via modulation of histone acetyltransferase and histone deacetylase in HDFs. *International journal of biological macromolecules*, 51(5), 1003-1007, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.013>

Ribeiro, A. P. D., Pereira, A. G., Todo, M. C., Fujimori, A. S. S., Dos Santos, P.

P., Dantas, D., ... & Polegato, B. F. Pera orange (*Citrus sinensis*) and Moro orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juices attenuate left ventricular dysfunction and oxidative stress and improve myocardial energy metabolism in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Nutrition*, 91, 111350, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111350>

Samanta, S., Banerjee, J., Ahmed, R., & Dash, S. K. Potential Benefits of Bioactive Functional Components of Citrus Fruits for Health Promotion and Disease Prevention. In *Recent Advances in Citrus Fruits* (pp. 451-499). Cham: Springer International Publishing. 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-031-37534-7_15

Samtiya, M., Aluko, R. E., Dhewa, T., & Moreno-Rojas, J. M. Potential health benefits of plant food-derived bioactive components: An overview. *Foods*, 10(4), 839, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10040839>

Saraiva, M., & O'garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews immunology*, 10(3), 170-181, 2010. <https://doi.org/10.1038/nri2711>

Schroeter, S., Khan, K., Barbour, R., Doan, M., Chen, M., Guido, T., ... & Games, D. Immunotherapy reduces vascular amyloid- β in PDAPP mice. *Journal of Neuroscience*, 28(27), 6787-6793, 2008.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2377-07.2008>

Shenderov, B. A., Sinitsa, A. V., Zakharchenko, M., & Lang, C. *Metabiotics*. Springer International Publishing. 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-34167-1>

Siqueira, J. S., Nakandakare-Maia, E. T., Vieira, T. A., Palacio, T. L. N., Grandini, N. A., Belin, M. A. F., ... & Correa, C. R. Effect of Bergamot Leaves (*Citrus bergamia*) in the Crosstalk between Adipose Tissue and Liver of Diet-Induced Obese Rats. *Livers*, 3(2), 258-270, 2023.

<https://doi.org/10.3390/livers3020017>

Siqueira, J. S., Nakandakare-Maia, E. T., Vieira, T. A., Palacio, T. L. N., Belin, M. A. F., Baron, G., ... & Correa, C. R. Overview of bergamot leaves extract (*Citrus bergamia*) effect on the RedOx/Inflammatory scenario in obesity target

organs in an animal model of metabolic syndrome. *Journal of Functional Foods*, 113, 106042, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106042>

Steen, E. H., Wang, X., Balaji, S., Butte, M. J., Bollyky, P. L., & Keswani, S. G. The role of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in tissue fibrosis.

Advances in wound care, 9(4), 184-198, 2020.

<https://doi.org/10.1089/wound.2019.1032>

Strassheim, D., Sullivan, T., Irwin, D. C., Gerasimovskaya, E., Lahm, T., Klemm, D. J., ... & Karoor, V. Metabolite G-protein coupled receptors in cardio-metabolic diseases. *Cells*, 10(12), 3347, 2021.

<https://doi.org/10.3390/cells10123347>

Sun, K., Li, Y. Y., & Jin, J. A double-edged sword of immuno-microenvironment in cardiac homeostasis and injury repair. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 79, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00455-6>

Tanti, J. F., & Jager, J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Current opinion in pharmacology*, 9(6), 753-762, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.07.004>

Teicholz, N. A short history of saturated fat: the making and unmaking of a scientific consensus. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 30(1), 65, 2023. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000791>

Tutor, A. W., Lavie, C. J., Kachur, S., Milani, R. V., & Ventura, H. O. Updates on obesity and the obesity paradox in cardiovascular diseases. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 78, 2-10, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.pcad.2022.11.013>

Uchiyama, M., & Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, 86(1), 271-278, 1978.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)

Vileigas, D. F., de Souza, S. L. B., Correa, C. R., de Almeida Silva, C. C. V., de Campos, D. H. S., Padovani, C. R., & Cicogna, A. C. The effects of two types of Western diet on the induction of metabolic syndrome and cardiac remodeling in obese rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 92, 108625, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108625>

Wueest, S., & Konrad, D. The controversial role of IL-6 in adipose tissue on obesity-induced dysregulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 319(3), E607-E613, 2020.

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00306.2020>

Yang, Y., Zhang, Y., Song, J., Li, Y., Zhou, L., Xu, H., ... & Zheng, Y. Bergamot polysaccharides relieve DSS-induced ulcerative colitis via regulating the gut microbiota and metabolites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127335, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127335>

Zhou, D. D., Luo, M., Shang, A., Mao, Q. Q., Li, B. Y., Gan, R. Y., & Li, H. B. Antioxidant food components for the prevention and treatment of cardiovascular diseases: effects, mechanisms, and clinical studies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6627355>

Capítulo 4. Artigo científico 3

(Aprovado para publicação na
revista *Vascular Pharmacology*)

<https://doi.org/10.1016/j.vph.2024.107412>



Cardiac biogenic amine profile and its relationship with parameters of cardiovascular disease in obesity

Matheus Antônio Filiol Belin^a, Taynara Aparecida Vieira^a, Núbia Alves Grandini^a, Juliana Silva Siqueira^a, Thiago Luiz Novaga Palacio^a, Jordanna Cruzeiro^a, Luis Eduardo Sormani^a, Murilo Dalarme Tanganini^a, Gabriela Souza Barbosa^a, Cristina Schmitt Gregolin^a, Dijon Henrique Salomé de Campos^a, Silmeia Garcia Zanati Bazan^a, Igor Otávio Minatel^b, Giuseppina Pace Pereira Lima^b, Camila Renata Correa^{a,*}

^a Department of Pathology, Medical School, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu 18618-687, Brazil

^b Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Bioscience, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu 18618-687, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cardiac remodeling
Cardiac dysfunction
Hypertension
Polyamines
Agmatine

ABSTRACT

Aims: To identify the cardiac biogenic amine profile of obese rats and associate these compounds with parameters of cardiovascular disease.

Main methods: Wistar rats ($n = 20$) were randomly distributed into two groups: control and obese. Obesity was induced by a high-sugar fat diet. Biochemical parameters were evaluated. Doppler Echocardiography and systolic blood pressure; interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- α (TNF- α), protein carbonylation, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and catalase activity were measured in cardiac tissue. HPLC evaluated the cardiac biogenic profile. Data were compared using the Student's T or Mann-Whitney tests and Spearman's correlation at 5% significance. The principal component analysis (PCA) was performed.

Key findings: Obesity generated hypertension, cardiac remodeling and dysfunction, and imbalanced all biochemical, inflammatory, and oxidative markers ($p < 0.001$). Eight biogenic amines were found in cardiac tissue. Obesity increased serotonin and decreased agmatine, putrescine, cadaverine, and spermidine. Serotonin ($r = 0.534$ to 0.808) was strong and positively correlated with obesity, biochemical parameters, cardiac inflammation, oxidative stress, hypertension, cardiac remodeling, and dysfunction ($p < 0.001$). Spermidine ($r = -0.560$ to -0.680), putrescine ($r = -0.532$ to -0.805), cadaverine ($r = -0.534$ to -0.860), and agmatine ($r = -0.579$ to -0.884) were inversely correlated with the same parameters ($p < 0.001$). PCA allowed for distinguishing the control and obese groups.

Significance: There are strong correlations between cardiac biogenic amine levels, cardiac remodeling, and dysfunction resulting from obesity.

Conclusion: There is an association between cardiac biogenic amines and cardiovascular disease in obesity. In addition, agmatine, putrescine, cadaverine, and, mainly, serotonin may be new biomarkers for cardiovascular health in obesity and help to improve the diagnosis and treatment of CVD resulting or not from obesity. However, more research is needed to support this conclusion.

1. Introduction

Obesity is a disease defined by excess body fat, caused mainly by nutritional imbalances resulting from excessive intake of sugars and fats. By 2030, this disease will reach more than one billion, which will become a worrying factor [1]. Increased adipose mass promotes

oxidative stress, including other complications, which increases the risk of >30 systemic diseases, mainly cardiovascular diseases (CVD). [2–4]

CVD is the leading non-communicable disease (NCD), representing >50% of the world's NCD-related deaths, it means >17,8 million deaths per year [5]. This scenario could be prevented or postponed through preventive and therapeutic measures, which can be achieved through

* Corresponding author.

E-mail address: camila.camacho@unesp.br (C.R. Correa).

<https://doi.org/10.1016/j.vph.2024.107412>

Received 25 April 2024; Received in revised form 17 July 2024; Accepted 18 July 2024

Available online 19 July 2024

1537-1891/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

better knowledge about the pathophysiological mechanisms of CVD.

Cardiac remodeling is one of the most important compensatory responses of the heart to multiple stresses caused by excess weight which may progress to dysfunction and heart failure [6]. It is defined as a set of molecular, cellular, and interstitial changes that are clinically manifested by changes in the size, mass, geometry, and function of the heart, in response to aggression [7]. Several mechanisms and metabolites have already been related to pathological cardiac remodeling in obesity conditions, such as inflammation, and oxidative stress [8–10]. However, as obesity is a complex disease that involves many changes in organs and systems, other metabolites may also be involved in cardiac remodeling.

The heart is a muscular organ, and as a muscle, it has a direct relationship with proteins, protein compounds, and their metabolites. Biogenic amines (BAs), composed of mono, di, and polyamines, are nitrogenous organic compounds formed mainly by decarboxylation of amino acids. These molecules can easily bind to biomolecules, including DNA, RNA, proteins, and phospholipids, modulating in many cases their functions. Consequently, BAs can positively or negatively affect many biochemical and cellular processes, including translation, transcription, signal transduction, cell proliferation and differentiation, apoptosis, or cellular stress response [11].

A few studies report the role of amines in cardiac dysfunction. Hautbergue and collaborators (2021), in an experimental model of pulmonary hypertension, evaluating the right ventricle, observed, using the metabolomics technique, predominant changes in the metabolic pathways of arginine, pyrimidine, purine, and tryptophan. These pathways are well described to regulate cellular regularity, cellular hypertrophy, and cardioprotection, highlighting the involvement of putrescine in cardiac dysfunction [12]. Other studies report that in cases of cardiac ischemia and increased blood pressure overload, there are changes in spermine, spermidine, and putrescine content in cardiac tissue in response to an increase in mast cell density [13,14]. According to these studies, we can report that there is growing evidence of the role of BA in cardiac pathophysiology, pointing to these metabolites as possible markers and targets to treat and prevent CVD. Nevertheless, no study has determined the cardiac biogenic amine profile and evaluated its relationship with cardiovascular disease in obesity, then this study aimed to identify the cardiac biogenic amine profile of obese rats and associate these compounds with parameters of cardiovascular disease.

2. Methods

2.1. Obesity induction

Male Wistar rats ($n = 20$) were randomly distributed into two groups: control and obese ($n = 10/\text{group}$). The dietary model was carried out following previous studies by our research group [15–18]. The control group was fed a diet of soybean meal, sorghum, soybean hulls, dextrin, soybean oil, minerals, and salt to promote healthy growth and development. The obesity induction protocol was developed with an HSF diet, with lard, sucrose, and fructose, plus 25% sucrose in water for 20 weeks. All animal care and procedures complied with the ARRIVE guidelines and were carried out under the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, with the Ethics Committee on Animal Use approved protocol number 1337/2019, from Botucatu Medical School of São Paulo State University (UNESP), Brazil.

2.2. Nutritional parameters

To prove the obesity were evaluated the caloric intake (Kcal/d), body weight (g), weekly and after 20 weeks, and adiposity index (%). Food and water intake were calculated daily from the individual leftovers of each animal, and caloric intake was determined by multiplying the energy value of each diet ($\text{g} \times \text{Kcal}$) by food intake. For the obese group, it also included calories from water ($0.25 \times 4 \times \text{mL consumed}$). After 8-h fasting, blood was collected, and the plasma was used to measure insulin

and biochemical parameters. Glucose concentration was determined by using a glucometer (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA); triglycerides and cholesterol levels were measured with an automatic enzymatic analyzer system (Chemistry Analyzer BS200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). The TyG index was calculated based on the lipid profile and fasting blood glucose, with the formula: $\text{Ln} [\text{Tg (mg/dL)} \times \text{Fasting blood glucose (mg/dL)} / 2]$, in which Ln is the neperian logarithm [19]. At the end of the experiment with overnight fasting the animals were anesthetized (thiopental 120 mg/kg/i.p.) and subsequently decapitated after verifying the absence of the following reflexes: palpebral (when touching the eyelid), foot, interdigital, and caudal (through clamping). Decapitation was carried out to obtain blood from 15 mL conical tubes. After euthanasia, the epididymal, visceral, and retroperitoneal fat deposits were dissected from the animals. The sum of deposits normalized by body weight [(epididymal + retroperitoneal + visceral)/body weight $\times 100$] is considered the adiposity index [20]. The insulin level was measured using the indirect enzyme immunoassay (ELISA) method using commercial kits (Linco Research Inc., R&D Systems, Millipore, and B-Bridge International Inc.), and the reading was performed on a Spectramax 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). The IR assessment was performed using the Homeostasis Model Index - Insulin Resistance (HOMA-IR) obeyed the following formula: $\text{insulin } (\mu\text{L U/mL}) \times \text{blood glucose (mmol/L)} / 22.5$ [21]. In plasma, an enzymatic colorimetric kit (Labtest, Brazil) was used to measure aspartate aminotransferase (AST) [22].

2.3. Cardiovascular parameters

2.3.1. Doppler echocardiography study

Doppler echocardiographic evaluation was performed by a single examiner using commercially available echocardiography (General Electric Medical Systems, Vivid S6, Tirat Carmel, Israel) equipped with a 5–11.5 MHz multifrequency ultrasonic transducer.

Animals were anesthetized with ketamine (50 mg/kg, i.p.) and xylazine hydrochloride (1 mg/kg, i.p.). After the anterior chest region trichotomy, the animals were placed in slight left lateral decubitus for the exam. The equipment used was model Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel) with a multifrequency ultrasonic transducer 5.0–11.5 MHz. To implement structural measurements of the heart, the images were obtained in one-dimensional mode (M-mode) guided by the images in two-dimensional mode with the transducer in the parasternal position, minor axis. Left ventricular (LV) evaluation was performed by positioning the cursor M-mode just below the mitral valve plane at the level of the papillary muscles. The images of the aorta and left atrium were obtained by positioning the M-mode course to plan the level of the aortic valve.

The following cardiac parameters were evaluated in the Doppler echocardiography study: heart rate (HR), left ventricle diastolic diameter (LVDD), left ventricle systolic diameter (LVSD), posterior wall diastolic thickness (PWDT), posterior wall systolic thickness (PWST), intraventricular septum diastolic thickness (ISDT), intraventricular septum systolic thickness (ISST); aorta diameter (AD); left atrium (LA), LVDD/body weight (BW), cardiac index (CI), left ventricular mass (LVM), left ventricular mass index (LVMI), posterior wall relative thickness (PWRT), posterior wall shortening velocity (PWSV), systolic stress (SS), ejection fraction (EF), early diastolic mitral inflow velocity (E)/Doppler early diastolic displacement of the mitral annulus (E') ratio (E/E'), and E'/Doppler late diastolic displacement of the mitral annulus (A') (E'/A' ratio).

2.3.2. Systolic blood pressure

Systolic blood pressure (SBP) evaluation was assessed in conscious rats by the non-invasive tail-cuff method with a NarcoBioSystems® Electro-Sphygmomanometer (International Biomedical, Austin, TX, USA). The animals were kept in a wooden box (50 $\times$ 40 cm) between 38

and 40 °C for 4–5 min to stimulate arterial vasodilation. After this procedure, a cuff with a pneumatic pulse sensor was attached to the tail of each animal. The cuff was inflated to 200 mmHg pressure and subsequently deflated. The blood pressure values were recorded on a Gould RS 3200 polygraph (Gould Instrumental, Valley View, OH, USA). The average of three pressure readings was recorded for each animal.

2.4. Inflammatory and oxidative stress markers in the myocardium

The inflammatory markers interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were assessed using the ELISA method using commercial kits (Rat IL-10 DuoSet ELISA, DY522; Rat TNF- α DuoSet ELISA, DY510; R&D System, Minneapolis, MN, USA).

The oxidative stress markers protein carbonylation (PC), enzyme catalase activity (CAT), and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) were evaluated according to Mesquita et al., (2014) [23], Aebi (1984) [24] and Benzie & Strain (1996) [25], respectively with small adaptations. An LV homogenate with phosphate-buffered saline (PBS) solution (1:10) was used to measure PC and FRAP. PC content analysis was performed by a non-specific method that uses DNPH (2,4-dinitro-phenylhydrazine derivatizing agent) and photometric detection of any protein modified by carbonylation. PC levels are expressed in nmol of DNPH/mg of protein. CAT activity was determined using phosphate buffer pH 7.0, 0.5 mL of LV homogenate in potassium chloride (KCl, 1.15%) (1:10), and 10% of hydrogen peroxide. To evaluate the capacity of reducing the hydrogen peroxide, readings were performed at 240 nm. The FRAP was measured after reaction with the fresh FRAP reagent (FeCl₃ 20 nmol/L, acetate buffer 0.3 mol/L and 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine 10 mmol/L) and reading at 594 nm, expressing the results in nmol Fe/L.

2.5. Biogenic amine profile by high-performance liquid chromatography (HPLC)

Briefly, biogenic amines (BAs) were extracted as described by Borges et al. (2019) [26] with small modifications. The LV samples (100 mg) were mixed with 1500 μ L of cold perchloric acid at 5% (v/v). After that, the mixture was centrifuged at 3800g (Hettich Zentrifugen, Mikro220R) for 20 min at 4 °C, and to the supernatant was added dansyl chloride and saturated sodium carbonate (2 M). After incubation for 1 h at 60 °C, 100 μ L of proline was added to the mixture and maintained in the dark for 30 min at room temperature. To this mixture 500 μ L of toluene was added, hardly homogenate, and the supernatant was dried under gaseous nitrogen. The samples were resuspended in acetonitrile and 20 μ L was injected into the HPLC system (Dionex UltiMate 3000; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a quaternary pump, automatic sampler 3000, diode array detector (DAD-3000), and an ACE C18 column (4.6 $\times$ 250 mm; 5 μ m) at 25 °C. The analysis was monitored at 280 nm, and the integration peak and calibrations were realized between 210 and 350 nm using Chromeleon 7 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The chromatography gradient was established to a mixture of solvents (A) 100% acetonitrile and (B) 50% acetonitrile, as follows: 0–2 min, 40% A + 60% B; 2–4 min, 60% A + 40% B; 4–8 min, 65% A + 35% B; 8–12 min, 85% A + 15% B; 12–15 min, 95% A + 5% B; 15–21 min, 85% A + 15% B; 21–22 min, 75% A + 25% B; 22–25 min, 40% A + 60% B. The amount of each BA (tryptamine, spermine, histamine, serotonin, putrescine, cadaverine, agmatine, and spermidine) was calculated by comparing the peaks areas with standards, and the area below the curve obtained through calibration curves and expressed in μ g/g (w/w).

3. Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ standard deviation or medians (interquartile range). The Kolmogorov-Smirnov test and the Equal Variance test evaluated data normality. Student's *t*-test or Mann-

Whitney test determined differences between the groups. Spearman's correlation and Principal Component Analysis (PCA) were performed. Statistical analyses were performed using SigmaStat for Windows Version 3.5. (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA), and the graphs and correlation matrix using GraphPad Prism software version 9.3 for Windows and MetaboAnalyst 6.0. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

4. Results

Obesity and biochemical parameters are presented in Table 1. The obese group had an increased body weight, daily caloric intake, and an increased adiposity index compared to the control group, proving the development of obesity in these animals. The obese group presented the following comorbidities: increased blood glucose, total cholesterol, triglycerides, AST, TyG index, and HOMA-IR levels compared to the control group.

The Doppler echocardiography showed that obesity increased the morphological variables and decreased heart function, demonstrating the development of cardiac remodeling and dysfunction. Additionally, the dietary model promoted an increase in blood pressure in obese animals (Table 2).

The cardiac inflammatory and oxidative stress markers were measured in cardiac tissue and the results are shown in Fig. 1. The obese group had increased IL-10 and TNF- α levels compared to the control group. The obesity group had increased oxidative stress by increased PC, and decreased antioxidant capacity by decreased CAT and FRAP levels compared to the control group.

The cardiac biogenic amines profile and the influence of obesity on it are presented in Fig. 2. The cardiac profile of biogenic amines is composed of tryptamine, agmatine, putrescine, cadaverine, histamine, spermidine, spermine, and serotonin, with higher levels of spermine, spermidine, tryptamine, and serotonin, respectively. The obese group had lower cardiac levels of agmatine, putrescine, cadaverine, and spermidine, and higher levels of serotonin compared to the control group.

The correlation matrix between obesity, biochemical parameters, cardiovascular parameters, cardiac biogenic amines profile, and cardiac inflammatory and oxidative stress markers is presented in Fig. 3. Obesity, mainly adiposity index, is moderate and strongly positively correlated with negative alterations in biochemical parameters ($r = 0.534$ to 0.776), cardiac remodeling and dysfunction, and hypertension ($r = 0.504$ to 0.818), moderated with cardiac oxidative stress (0.545 to 0.693), and moderated and strongly with five biogenic amines (0.532 to 0.748). Alterations in biochemical parameters and cardiac inflammatory and oxidative stress markers are correlated with cardiac remodeling and dysfunction, hypertension, and biogenic amines profile. The biogenic

Table 1
Obesity and biochemical parameters.

Variable	Control	Obese	<i>p</i> -value
Body Weight (g)	474 $\pm$ 36	534 $\pm$ 49*	0.006
Caloric Intake (Kcal/d)	96.5 $\pm$ 7.5	111.6 $\pm$ 13.2*	0.005
Adiposity Index (%)	3.6 (3.3–4.2)	8.0 (6.0–9.9)*	<0.001
Blood Glucose (mg/dL)	81 $\pm$ 7	91 $\pm$ 6*	0.004
Total Cholesterol (mg/dL)	55 (46–57)	66 (62–69)*	0.025
Triglycerides (mg/dL)	25 (20–29)	87 (72–124)*	<0.001
AST (U/L)	138 (97–171)	254 (183–485)*	0.001
TyG Index	3.8 $\pm$ 0.1	4.5 $\pm$ 0.2*	<0.001
HOMA-IR	0.68 $\pm$ 0.08	0.84 $\pm$ 0.17*	0.010

Data presented as mean $\pm$ standard deviation or median (interquartile range). Kolmogorov-Smirnov and Equal Variance tests were used to evaluate data normality. Student's *t*-test or Mann-Whitney test determined differences between the groups ($n = 20$). AST: aspartate aminotransferase; TyG: Triglycerides-Glucose Index; HOMA-IR: homeostasis model assessment – insulin resistance. * = $p < 0.05$.

Table 2
Doppler echocardiography and systolic blood pressure study.

Variable	Control	Obese	p-value
HR (bpm)	290 ± 51	261 ± 34	0.140
LVDD (mm)	7.1 ± 0.5	6.9 ± 0.5	0.534
LVSD (mm)	2.8 (2.7–2.8)	3.3 (3.1–3.3)*	<0.001
PWDT (mm)	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1*	<0.001
PWST (mm)	3.8 (3.6–4.1)	3.6 (3.4–3.6)	0.094
ISDT (mm)	1.5 (1.5–1.5)	2.0 (1.8–2.0)*	<0.001
ISST (mm)	3.7 ± 0.4	3.9 ± 0.5	0.334
AD (mm)	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.1*	0.023
LA (mm)	4.6 (4.6–4.8)	5.5 (5.4–5.8)*	<0.001
LA/AD	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1*	<0.001
LVDD/BW	15 ± 2	13 ± 1*	0.012
CI (L/min/m ²)	212 ± 66	150 ± 41*	0.020
LVM (g)	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1*	<0.001
LVMi (g/g)	1.5 ± 0.2	1.9 ± 0.3*	0.006
PWRT (mm)	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1*	<0.001
PWSV (mm/s)	84 ± 5	66 ± 7*	<0.001
SS (Kdyn/cm ²)	114 ± 17	139 ± 19*	0.005
EF (%)	0.94 ± 0.02	0.90 ± 0.02*	<0.001
E/E'	12 (10–12)	18 (16–21)*	0.001
E'/A'	1.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1*	<0.001
SBP (mmHg)	121 ± 5	146 ± 14*	<0.001

Data presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range) and submitted to the Kolmogorov-Smirnov test and Equal Variance test to evaluate data normality. and to Student's t-test or Mann-Whitney test to determine differences between the groups ($p < 0.05$). HR: heart rate; LVDD: left ventricle diastolic diameter; LVSD: left ventricle systolic diameter; PWDT: posterior wall diastolic thickness; PWST: posterior wall systolic thickness; ISDT: intraventricular septum diastolic thickness; ISST: intraventricular septum systolic thickness; AD: aorta diameter; LA: left atrium; BW: body weight; CI: cardiac index; LVM: left ventricular mass; LVMi: left ventricular mass index; PWRT: posterior wall relative thickness; PWSV: posterior wall shortening velocity; SS: systolic stress; EF: ejection fraction; E: early diastolic mitral inflow velocity; E': Doppler early diastolic displacement of the mitral annulus; A': Doppler late diastolic displacement of the mitral annulus; SBP: systolic blood pressure. * = $p < 0.05$, $n = 20$.

amines agmatine, putrescine, cadaverine, spermidine (positively), and serotonin (negatively) were correlated markers of cardiovascular health.

To evaluate the strongest BA-specific correlations, Pearson's or Spearman's correlations between BA correlated with obesity and markers of cardiac remodeling are presented in Fig. 4. Cardiac levels of agmatine ($r = -0.803$ to -0.886), putrescine ($r = -0.725$ to -0.805), and cadaverine ($r = -0.681$ to -0.806) are strongly and inversely correlated with cardiac remodeling; while cardiac levels of serotonin ($r = 0.648$ to 0.756) are strongly and positively correlated the same parameters.

Fig. 5 presents Pearson's or Spearman's correlation between biogenic amines correlated with obesity and markers of cardiac dysfunction and hypertension. Cardiac levels of agmatine ($r = 0.777$ to 0.921), putrescine ($r = 0.607$ to 0.615), and cadaverine ($r = 0.705$ to 0.860) are very strongly, moderated, and strongly positively correlated with cardiac function, respectively, while cardiac levels of serotonin ($r = -0.611$ to -0.748) are strong and negatively correlated with cardiac function. Cardiac levels of agmatine ($r = -0.765$), putrescine ($r = -0.651$), and cadaverine ($r = -0.675$) are strongly and moderated negatively correlated with hypertension, while cardiac levels of serotonin ($r = 0.770$) are strong and positively correlated with cardiac function.

Principal Component Analysis (PCA) of the obesity, biochemical parameters, cardiovascular parameters, cardiac biogenic amines profile, and cardiac inflammatory and oxidative stress markers is presented in Fig. 6. The PCA (2D) and (3D) demonstrated groups well separated with animals of the same group clustered together.

5. Discussion

Our study shows the profile of cardiac BA in an experimental model

of obesity. Obesity was induced by an HSF diet, triggering hyperglycemia, dyslipidemia, insulin resistance, and systolic arterial hypertension, characterizing a metabolic syndrome scenario (MS). Additionally, the dietary model developed a pro-inflammatory, through an increase in TNF-alpha, a pro-inflammatory cytokine, and at the same time an increase in IL-10, an anti-inflammatory cytokine, whose high levels may signify the body's response to inflammation. The literature reports that IL-10 plays an irreplaceable role in the negative regulation of inflammation, primarily through a mechanism that selectively blocks the expression of pro-inflammatory genes encoding cytokines, chemokines, cell surface molecules, and other molecules involved in the propagation of inflammation [27]. In parallel a pro-oxidant state was found in the myocardium, represented by high levels of protein carbonylation, decreased antioxidant capacity, and decreased catalase enzyme activity. These findings are already well elucidated in the literature [15,16,28–31]; however, it is important to highlight all the comorbidities that the diet offered caused. The combination of these comorbidities found as metabolic syndrome, cardiac inflammation, and oxidative stress impair the structure and functionality of the heart, as demonstrated by Doppler Echocardiography, resulting in cardiac remodeling and dysfunction [7,10,32]. We also evaluated AST, which may also mark cardiac damage because it is present in cardiac muscle fibers, being released when any type of injury occurs [33], possibly explained by cardiac inflammation and oxidative stress in the obese group.

In addition to this scenario, the cardiac profile of biogenic amines was determined for the first time in the obesity experimental model. BAs are derived from and related to amino acid metabolism, and so, may mark pathophysiological processes of protein-structured organs, such as cardiac muscle, and cardiovascular diseases [34,35]. The cardiac BA profile in this study was composed of tryptamine, agmatine, putrescine, cadaverine, histamine, spermidine, spermine, and serotonin. Other studies already found the presence of some amines such as tryptamine [36], agmatine [37], putrescine, spermidine, spermine [38], cadaverine [39], histamine [40], and serotonin [41] in cardiac tissue. Regarding the levels of these amines, the results showed that obese animals presented a significant reduction in agmatine, putrescine, cadaverine, and spermidine. This behavior may have occurred due to the insulin resistance that these animals presented. Insulin resistance leads to a loss of enzymatic activities in the synthesis of BA, such as arginine decarboxylase [42], ornithine decarboxylase [42–44], and S-adenosylmethionine decarboxylase [45,46], mainly involved in the synthesis of agmatine. Another explanation would be changes in the microbiota found in obesity, which also impair spermidine synthesis [11,47]. In addition, in the scenario of increased oxidative stress and inflammation, there is an increase in the activity of enzymes involved in the catabolism of these BAs, such as diamine oxidase [48], amine oxidase [49], spermidine/spermine N1-acetyltransferase [50,51], and polyamine oxidase [51,52], justifying the reductions in cardiac levels of agmatine, putrescine, cadaverine, and spermidine found here. Otherwise, in the presence of insulin resistance oxidative stress, and inflammation by obesity, there may be increased activity of the enzyme tryptophan hydroxylase, crucial for serotonin synthesis, increasing serotonin production in response to cellular damage [53]. In addition, the inflammatory and oxidative state in the heart can also increase the release of serotonin and alter cellular permeability to serotonin, altering the signaling of this neurotransmitter in tissues [54]. Another explication can be by tryptophan metabolism, a precursor of serotonin may be diverted to the kynurenine pathway, and the body may increase the production of serotonin as a compensatory mechanism [55]. Inflammation and oxidative stress can also activate the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, influencing serotonin production in the central and peripheral nervous system [56]. Studies in rats have shown that exposure to oxidative stress, through oxidizing agents, and experimentally induced inflammation, such as through injection of lipopolysaccharides (LPS), have shown increases in serotonin levels [57]. In short, the obesity scenario, which involves metabolic changes, increased oxidative stress, and inflammation creates a cellular

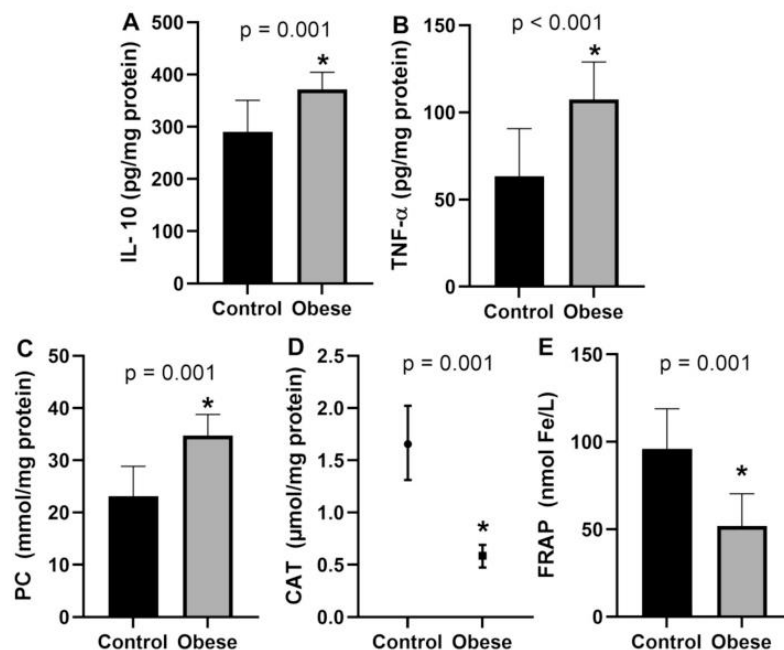


Fig. 1. Inflammatory (A and B) and oxidative stress (C, D, and E) markers in cardiac tissue of obese rats.

IL-10: interleukin 10; TNF-α: tumor necrosis factor-alpha; PC: protein carbonylation; CAT: catalase activity; FRAP: ferric reducing antioxidant power. A: IL-10; B: TNF-α; C: PC; D: CAT; E: FRAP. Data presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range) and submitted to the Kolmogorov-Smirnov test and Equal Variance test to evaluate data normality, and to Student's *t*-test or Mann-Whitney test to determine differences between the groups (*n* = 20). * = *p* < 0.05.

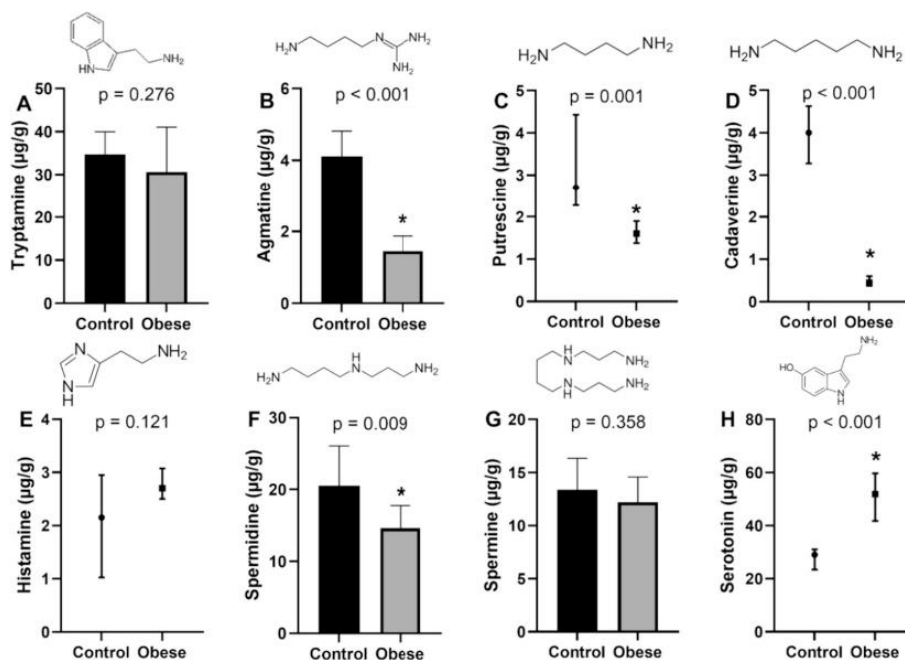


Fig. 2. Influence of obesity in the cardiac profile of biogenic amines.

A: tryptamine; B: agmatine; C: putrescine; D: cadaverine; E: histamine; F: spermidine; G: spermine; H: serotonin. Data presented as mean ± standard deviation or median (interquartile range) and submitted to the Kolmogorov-Smirnov test and Equal Variance test to evaluate data normality, and to Student's *t*-test or Mann-Whitney test to determine differences between the groups (*n* = 20). * = *p* < 0.05.

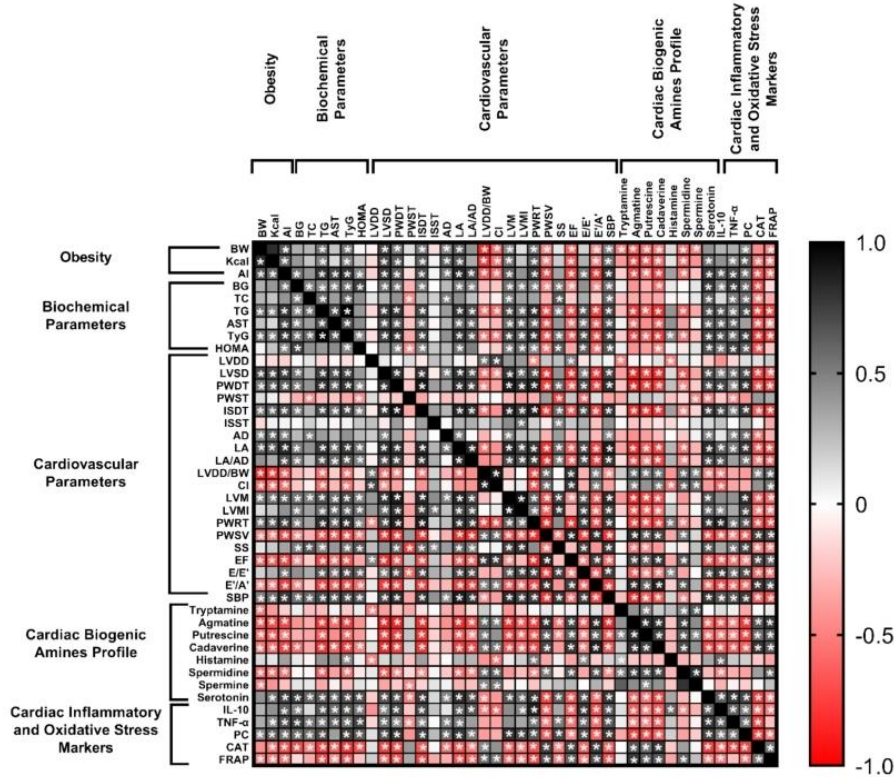


Fig. 3. Correlation matrix among obesity, biochemical parameters, cardiovascular parameters, cardiac biogenic amines, cardiac inflammatory and oxidative stress markers.

Positive correlations are presented in black and negative correlations are presented in red. The color intensity is proportional to the correlation coefficients. *Indicates Spearman's correlations with $p < 0.05$ ($n = 20$). BW: body weight; Kcal: daily caloric intake; AI: adiposity index; BG: blood glucose; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; AST: aspartate aminotransferase; TyG: Triglycerides-Glucose Index; HOMA: homeostasis model assessment – insulin resistance; LVDD: left ventricle diastolic diameter; LVSD: left ventricle systolic diameter; PWDT: posterior wall diastolic thickness; PWST: posterior wall systolic thickness; ISDT: intraventricular septum diastolic thickness; ISST: intraventricular septum systolic thickness; AD: aorta diameter; LA: left atrium; CI: cardiac index; LVM: left ventricular mass; LVMI: left ventricular mass index; PWRT: posterior wall relative thickness; PWSV: posterior wall shortening velocity; SS: systolic stress; EF: ejection fraction; E: early diastolic mitral inflow velocity; E': Doppler early diastolic displacement of the mitral annulus; A': Doppler late diastolic displacement of the mitral annulus; SBP: systolic blood pressure; IL-10: interleukin 10; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; PC: protein carbonylation; CAT: catalase activity; FRAP: ferric reducing antioxidant power.

and molecular environment unfavorable for adequate levels of production, degradation, and maintenance of some BA in rat tissues. This environment is characterized by changes in the microbiota, cell signaling, gene expression, and enzymatic activities, generating a reduction in cardiac levels of agmatine, putrescine, cadaverine, and spermidine and an increase in serotonin levels, justifying the impact of obesity on the cardiac BA profile found in our study. In summary, the inflammatory and oxidative scenario in obesity can alter amino acid metabolism, and its derived compounds (BAs), and may generate cardiomyopathy and even heart failure [58,59].

Regarding the association of these amines with coronary disease, some reports have been documented. Meana et al., (2016) [38] evaluated polyamines in the right atrial appendage of 17 patients, with cardiac abnormalities, submitted to cardiopulmonary bypass and correlated with clinical parameters. It was shown that left ventricular ejection fraction (LVEF) and heart rate were positively associated with spermidine and N(1)-acetylspermidine levels. Based on this information, the authors suggest that changes in polyamine homeostasis may be associated with cardiac function and remodeling. Despite the authors studying the LA and we studied the LV, in our study, spermidine, tryptamine, agmatine, putrescine (positively), and serotonin

(negatively) were correlated with EF, a marker of cardiac functionality. We did not find isoamylamine in cardiac tissue, which may be due to the differences between parts of tissue analyzed (LA and LV) [38], but we found that agmatine, putrescine, and cadaverine are also negatively correlated with ISDT, while serotonin is positively correlated with the same parameter, a marker of cardiac remodeling.

The protective effects of agmatine are strongly studied in cardiovascular health. Agmatine, an antioxidant metabolite derived from L-arginine, acts on ion channels, receptor targets, synthesis, and release of neurotransmitters. Agmatine is produced in neurons, liver, and endothelium, and its level can significantly vary in different pathophysiological states [60]. The endogenous neurotransmitter agmatine in micromolar concentrations via α 2-AR activates the nitric oxide (NO) synthesis, enhancing the Ca^{2+} pumping into the sarcoplasmic reticulum (SR). In millimolar doses, it inhibits Ca^{2+} sequestration by SR Ca^{2+} ATPase (SERCA), involved in the development of cardiovascular diseases [60]. These mechanisms justify the strong and even very strong correlations found here between the cardiac levels of agmatine and cardiovascular health.

Putrescine, a diamine, is also related to cardiovascular health. This BA has anti-inflammatory effects, enhances cardiac function, and is

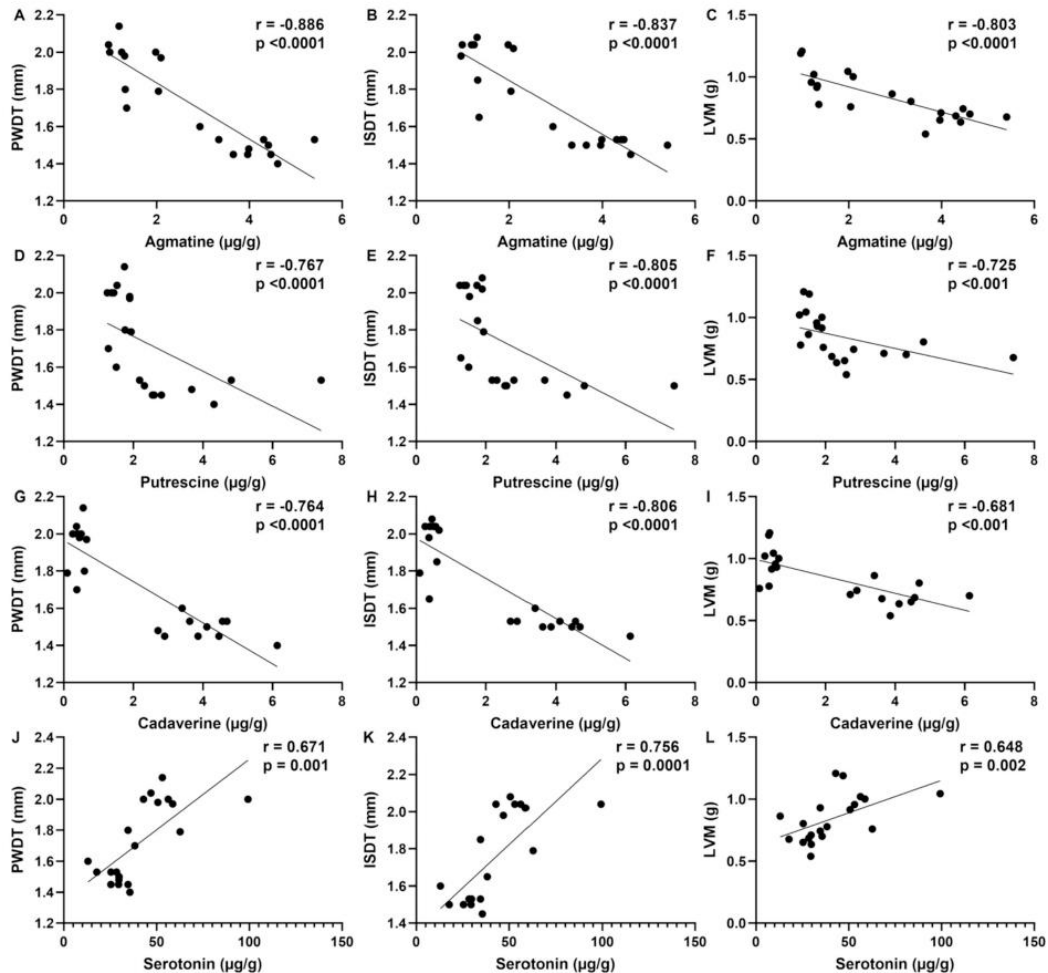


Fig. 4. Pearson's or Spearman's correlation with simple linear regression between biogenic amines and markers of cardiac remodeling.

PWDT: posterior wall diastolic thickness; ISDT: intraventricular septum diastolic thickness; LVM: left ventricle mass. A: Pearson's correlation between PWDT and agmatine; B: Spearman's correlation between ISDT and agmatine; C: Pearson's correlation between LVM and agmatine; D: Spearman's correlation between PWDT and putrescine; E: Spearman's correlation between ISDT and putrescine; F: Spearman's correlation between LVM and putrescine; G: Spearman's correlation between PWDT and cadaverine; H: Spearman's correlation between ISDT and cadaverine; I: Spearman's correlation between LVM and cadaverine; J: Spearman's correlation between PWDT and serotonin; K: Spearman's correlation between ISDT and serotonin; L: Spearman's correlation between LVM and serotonin; $n = 20$.

related to cardiomyocyte excitability. Putrescine levels in the right ventricle (RV) were correlated to cardiac remodeling and RV function in the pulmonary hypertension (PH) model [12]. Putrescine is responsible for the induction of autophagy, a critical process involved in cardiac hypertrophy. Moreover, putrescine may regulate TASK-1 function, which is a hallmark of RV hypertrophy/dysfunction; is related to cardiac pathophysiology and targets the treatment of cardiovascular diseases [12]. Putrescine plays essential roles in programmed cell death, cell growth and differentiation, membrane permeability transition of mitochondria, cytosolic Ca^{2+} homeostasis, and NO synthesis, which exhibits antihypertrophic functions and inhibits cardiac remodeling [61]. Our study also demonstrates strong correlations between putrescine and markers of cardiovascular health.

The cardiac levels of cadaverine and its relations with cardiovascular health are not so clear. Cadaverine, a diamine, is synthesized from L-lysine, instead of L-ornithine as the other polyamines, and may have other pathways involved. Cadaverine can further be converted into aminopropyl cadaverine, which is a close analog of spermidine. This BA,

also found here, is correlated with cardiovascular health and is known for cardioprotective effects [62]. Spermidine decreased mTORC1 activation; mitochondrial depolarization and a ROS burst, contributing to the activation of the protein kinase Ataxia-telangiectasia mutated, acting in DNA damage and redox sensing; restorative effect on oxidative functions of isolated aged mitochondria, and stimulation of ATPase activity in heart sub-mitochondrial particles. These effects contribute to the induction of mitophagy in cardiac muscle, thus removing damaged mitochondria, and resulting in improved metabolic function and cell survival [62]. Finally, this BA has also been shown to have a positive effect on cardiac survival and recovery, through induction of AKT and MAPK1/3 (Erk2/1) pathways and preventing calcium overload [62]. Our study demonstrates that spermidine, and mainly cadaverine, levels in cardiac tissue are positively correlated with markers of cardiovascular health.

Serotonin plays an important role in cardiac physiology and pathology. Serotonin can be released from platelets and be produced in the heart by cardiac endothelial cells and cardiomyocytes through the

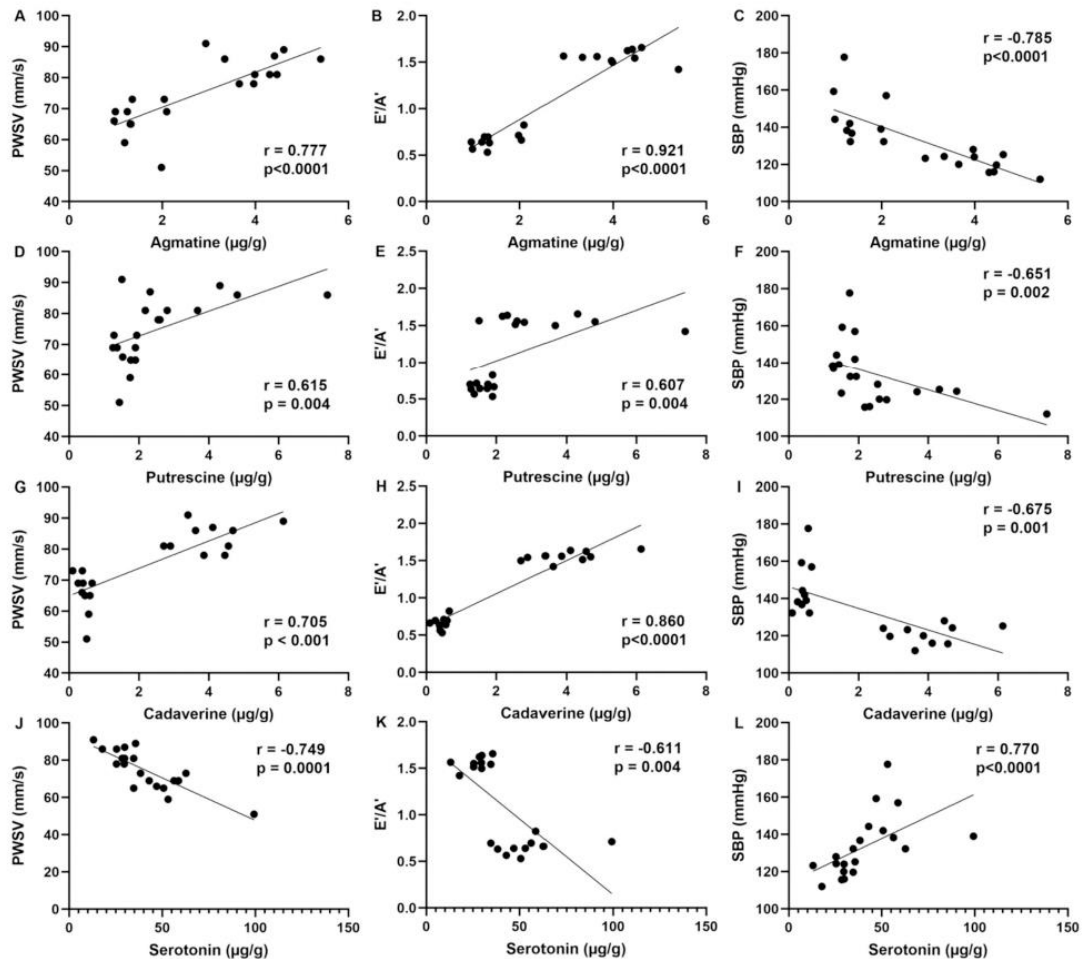


Fig. 5. Pearson's or Spearman's correlation with simple linear regression between biogenic amines, markers of cardiac dysfunction, and hypertension.

PWSV: posterior wall shortening velocity; E/A': Doppler early diastolic displacement of the mitral annulus/Doppler late diastolic displacement of the mitral annulus; SBP: systolic blood pressure. A: Pearson's correlation between PWSV and agmatine; B: Pearson's correlation between E/A' and agmatine; C: Pearson's correlation between SBP and agmatine; D: Spearman's correlation between PWSV and putrescine; E: Spearman's correlation between E/A' and putrescine; F: Spearman's correlation between SBP and putrescine; G: Spearman's correlation between PWSV and cadaverine; H: Spearman's correlation between E/A' and cadaverine; I: Spearman's correlation between SBP and cadaverine; J: Spearman's correlation between PWSV and serotonin; K: Spearman's correlation between E/A' and serotonin; L: Spearman's correlation between SBP and serotonin; $n = 20$.

transformation of 5-hydroxytryptophan into serotonin by l-aromatic amino acid decarboxylase. Serotonin, from within or outside of the heart, is important to cardiac function and development. Serotonin from platelets participates in cardiac injury/repair while that produced within the heart may play an important role in the regulation of physiological cardiac function. Accordingly, serotonin has been involved in a variety of cardiac pathophysiological processes, including ventricular hypertrophy, valve fibrosis, and ischemia/reperfusion injury. These cardiac effects of serotonin have been related to the stimulation of specific serotonin receptors [63]. Serotonin stimulates cardiomyocyte hypertrophy and is used as a substrate for monoamine oxidase (MAO) providing the hydrogen peroxide that also activates heart hypertrophic pathways [64], as seen in the correlations between cardiac remodeling and serotonin in our study. Serotonin has positive inotropic and chronotropic effects in the rat atrium. Cardiac serotonin increases in various heart diseases such as ventricular hypertrophy [65] and diabetic cardiac dysfunction [66]. Supraphysiological levels of cardiac serotonin may be responsible for the overproduction of H_2O_2 and the subsequent cardiac

and mitochondrial dysfunction, apoptosis, and oxidative damage, impairing mitophagy, necrosis, and senescence [67]. Serotonin has direct effects on ventricular cardiomyocytes and is considered a survival factor in cardiomyocytes, while apoptosis is a predominant feature of ventricular remodeling [68]. Despite that, platelet serotonin aggravates myocardial injury via neutrophil degranulation, increasing cardiac oxidative stress and inflammation [69], as seen in the correlations of our study. The availability and activity of cardiac serotonin depends not only on its release and/or production but also on its local degradation. Indeed, the extracellular serotonin can be internalized into the cardiomyocytes through the plasma membrane serotonin transporter. The increase in serotonin levels has structural and functional consequences on the heart, such as cardiomyocyte hypertrophy, myocardial degeneration, and structural and functional damage of mitochondria accompanied by decreased adenosine triphosphate (ATP) concentrations and mitochondrial biogenesis [63]. Studies have shown that serotonin is a potent antioxidant against lipid peroxidation [70] and has powerful antioxidant properties [71]. This information may also explain the

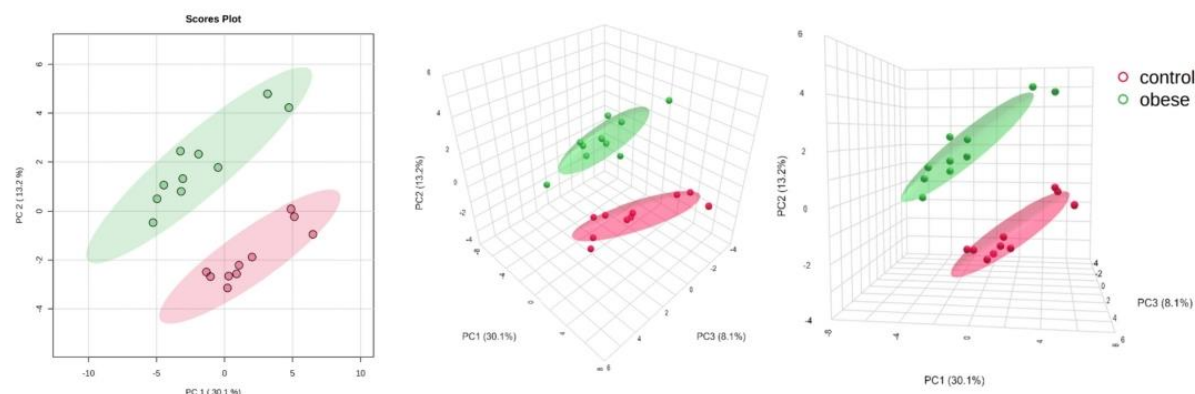


Fig. 6. Principal Component Analysis (PCA) of the obesity, biochemical parameters, cardiovascular parameters, cardiac biogenic amines profile, and cardiac inflammatory and oxidative stress markers normalized by median and after auto-scaling (mean-centered and divided by the standard deviation of each variable) ($n = 20$).

results found in this study. The increase in cardiac serotonin levels may also have occurred due to greater production and/or mobilization of this amine to combat the increased oxidative stress generated by obesity, as with IL-10. Considering these findings, we strongly suggest that cardiac levels of serotonin are inversely related to cardiovascular health.

The well-separated PCA between control and obese animals demonstrates that the obesity, biochemical parameters, cardiovascular parameters, cardiac biogenic amines profile, and cardiac inflammatory and oxidative stress markers share the same characteristics according to the groups. So, they may be used to evaluate and mark cardiovascular disease in obesity.

Finally, the results of this study clarify that BA are involved in cardiac remodeling in obesity and that future studies need to be carried out for a better understanding. This study shows that the biogenic amines agmatine, putrescine, cadaverine, and serotonin may be new biomarkers for cardiovascular health/disease in obesity. In this experimental obesity protocol, the heart was used to identify BA. However, future studies could evaluate these amines in plasma, urine, and/or saliva to facilitate detection in humans. Perhaps not evaluating the BA levels in plasma and urine and not correlating it with cardiac BA was a limitation of this study. Therefore, more studies must delve deeper into the investigation of these amines in cardiovascular diseases, as well as their respective relationships and impacts on their development, prevention, or treatment.

6. Conclusion

Our study shows that the cardiac biogenic amine profile is composed of tryptamine, agmatine, putrescine, cadaverine, histamine, spermidine, spermine, and serotonin. Additionally, obesity decreases agmatine, putrescine, cadaverine, and spermidine levels, and increases serotonin levels. Finally, we conclude that agmatine, putrescine, and cadaverine are correlated with cardiovascular health, while serotonin is correlated with cardiovascular disease. In the future, with more experimental and clinical research about these biogenic amines, they may be used as therapeutic targets and/or used for less invasive, faster, and more accurate diagnoses of cardiovascular diseases resulting or not from obesity.

Funding

This research was funded by The São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant numbers: 2021/13050, and 2022/01925–7) and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (grant number: 306640/2023–6).

Credit authorship contribution statement

Matheus Antônio Filiol Belin: Writing – original draft, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Taynara Aparecida Vieira:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Núbia Alves Grandini:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Juliana Silva Siqueira:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Thiago Luiz Novaga Palacio:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Jordanna Cruzeiro:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Luis Eduardo Sormani:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Murilo Dalarne Tangani:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Gabriela Souza Barbosa:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Cristina Schmitt Gregolin:** Writing – review & editing. **Dijon Henrique Salomé de Campos:** Writing – original draft, Supervision, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Silmeia Garcia Zanati Bazan:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Igor Otávio Minatel:** Supervision, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Giuseppina Pace Pereira Lima:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Conceptualization. **Camila Renata Correa:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank the Experimental Research Unit of Botucatu Medical School-UNIPEX, and the Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP, Brazil, for providing the necessary structure and equipment to conduct this research.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vph.2024.107412>.

References

- [1] D.B. dos Santos Pereira, W.L. Conde, Overweight and obesity in adulthood, sociodemographic factors, lifestyle, and the early burden of noncommunicable diseases among Americans: NHANES 2007–2018, *Am. J. Hum. Biol.* 35 (8) (2023) e23905, <https://doi.org/10.1002/ajhb.23905>.
- [2] A.M. Rychter, A.E. Ratajczak, A. Zawada, A. Dobrowolska, I. Krela-Kazmierczak, Non-systematic review of diet and nutritional risk factors of cardiovascular disease in obesity, *Nutrients* 12 (3) (2020) 814, <https://doi.org/10.3390/nu12030814>.
- [3] T.M. Powell-Wiley, P. Poirier, L.E. Burke, J.P. Després, P. Gordon-Larsen, C. J. Lavie, S.A. Lear, C.E. Ndumele, I.J. Neeland, P. Sanders, M.P. St-Onge, American Heart Association Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; and Stroke Council, Obesity and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, *Circulation* 143 (21) (2021) e984–e1010, <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000973>.
- [4] M.A. Hill, Y. Yang, L. Zhang, Z. Sun, G. Jia, A.R. Parrish, J.R. Sowers, Insulin resistance, cardiovascular stiffening and cardiovascular disease, *Metabolism* 119 (2021) 154766, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154766>.
- [5] R. Jagannathan, S.A. Patel, M.K. Ali, K.M.V. Narayan, Global updates on cardiovascular disease mortality trends and attribution of traditional risk factors, *Curr. Diab. Rep.* 19 (2019) 44, <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1161-2>.
- [6] J. Kruszewska, A. Cudnoch-Jedrzejewska, K. Czarzasta, Remodeling and fibrosis of the cardiac muscle in the course of obesity—pathogenesis and involvement of the extracellular matrix, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (8) (2022) 4195, <https://doi.org/10.3390/ijms23084195>.
- [7] P.S. Azevedo, B.F. Polegato, M.F. Minicucci, S.A. Paiva, L.A. Zornoff, Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment, *Arq. Bras. Cardiol.* 106 (2015) 62–69, <https://doi.org/10.5935/abc.20160005>.
- [8] G. Jia, J.R. Sowers, Hypertension in diabetes: an update of basic mechanisms and clinical disease, *Hypertension* 78 (5) (2021) 1197–1205, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17981>.
- [9] M. Tanaka, Improving obesity and blood pressure, *Hypertens. Res.* 43 (2) (2020) 79–89, <https://doi.org/10.1038/s41440-019-0348-x>.
- [10] A. Li, N. Zheng, X. Ding, Mitochondrial abnormalities: a hub in metabolic syndrome-related cardiac dysfunction caused by oxidative stress, *Heart Fail. Rev.* 27 (4) (2022) 1387–1394, <https://doi.org/10.1007/s10741-021-10109-6>.
- [11] B. Ramos-Molina, M.I. Queipo-Ortuño, A. Lambertos, F.J. Tinahones, R. Peñañel, Dietary and gut microbiota polyamines in obesity-and age-related diseases, *Front. Nutr.* 6 (2019) 444723, <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00024>.
- [12] T. Hautbergue, F. Antigny, A. Boët, F. Haddad, B. Masson, M. Lambert, A.D. Scilit, J.B. Menager, L. Savale, J. Le Pave, E. Fadel, M. Humbert, C. Junot, F. Fenaïlle, B. Colisch, O. Mercier, Right ventricle remodeling metabolic signature in experimental pulmonary hypertension models of chronic hypoxia and monocrotaline exposure, *Cells* 10 (6) (2021) 1559, <https://doi.org/10.3390/cells10061559>.
- [13] X. Xiong, J. Li, S. Zhang, X. Jia, C. Xiao, Involvement of polyamines from cardiac mast cells in myocardial remodeling induced by pressure overload through mitochondrial permeability transition pore opening, *Front. Cardiovasc. Med.* 9 (2022) 850688, <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.850688>.
- [14] Y. Yang, L. Ma, M. Song, X. Li, F. He, C. Wang, et al., The role of the complement factor B-arginase-polyamine molecular axis in uremia-induced cardiac remodeling in mice, *Eur. J. Immunol.* 50 (2020) 220–233, <https://doi.org/10.1002/eji.201948227>.
- [15] M.A.F. Belin, J.S. Siqueira, T.A. Vieira, N.A. Grandini, T.L.N. Palacio, E. Bombardieri, T. Nakandakare-Maia, D.H.S. de Campos, F.V. Francisqueti-Ferron, B. Bombardieri, I.O. Minatel, G. Aldini, G.P.P. Lima, C.R. Correa, Bergamot by-product, a source of biogenic amines, reduces hypertension induced by high sugar-fat diet, *Pharmacol. Res. Nat. Prod.* (2024), <https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100022>.
- [16] J.S. Siqueira, E.T. Nakandakare-Maia, T.A. Vieira, T.L.N. Palacio, M.A.F. Belin, G. Baron, S.G.Z. Bazan, A.J.T. Ferron, G. Aldini, F.V. Francisqueti-Ferron, C. R. Correa, Overview of bergamot leaves extract (*Citrus bergamia*) effect on the RedOx/inflammatory scenario in obesity target organs in an animal model of metabolic syndrome, *J. Funct. Foods* 113 (2024) 106042, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106042>.
- [17] J.S. Siqueira, E.T. Nakandakare-Maia, T.A. Vieira, T.L.N. Palacio, N.A. Grandini, M. A.F. Belin, G.A. Nai, F. Moreto, A. Altomare, G. Baron, G. Aldini, F.V. Francisqueti-Ferron, C.R. Correa, Effect of bergamot leaves (*Citrus bergamia*) in the crosstalk between adipose tissue and liver of diet-induced obese rats, *Livers* 3 (2) (2023) 258–270, <https://doi.org/10.3390/livers3020017>.
- [18] E.T. Nakandakare-Maia, J.S. Siqueira, A.J.T. Ferron, T.A. Vieira, T.L.N. Palacio, N. A. Grandini, J.L. Garcia, M.A.F. Belin, A. Altomare, G. Baron, G. Aldini, F. V. Francisqueti-Ferron, C.R. Correa, Treatment with bergamot (*Citrus bergamia*) leaves extract attenuates leptin resistance in obese rats, *Mol. Cell. Endocrinol.* 566 (2023) 111908, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111908>.
- [19] N.M.K. Selvi, S. Nandhini, V. Sakthivadivel, S. Lokesh, A.R. Srinivasan, S. Sumathi, Association of triglyceride-glucose index (TyG index) with HbA1c and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus, *Maedica* 16 (3) (2021) 375, <https://doi.org/10.26574/maedica.2021.16.3.375>.
- [20] R.D.A.M. Luvizotto, A.F. Nascimento, E. Imaizumi, D.T. Pierine, S.J. Conde, C. R. Correa, K. Yeum, A.L.A. Ferreira, Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats, *Br. J. Nutr.* 110 (10) (2013) 1803–1809, <https://doi.org/10.1017/S0007114513001256>.
- [21] N.A. Grandini, M.R. Costa, C.S. Gregolin, J.S. Siqueira, T.A. Vieira, A.J.T. Ferron, F. V. Francisqueti-Ferron, G.R. Romualdo, A.L.A. Ferreira, G. Aldini, C.R. Correa, F. Moreto, Effects of carnitine supplementation on markers for the pathophysiological development of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in a diet-induced model, *Mol. Cell. Endocrinol.* 582 (2024) 112138, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.112138>.
- [22] C.S. Gregolin, M. do Nascimento, S.L.B. de Souza, G.A.F. Mota, G.F. Bomfim, R.D. A.M. Luvizotto, M.M. Sugizaki, S.G.Z. Bazan, D.H.S. de Campos, M.C. Dias, C. R. Correa, A.C. Cicogna, A.F. do Nascimento, Myocardial dysfunction in cirrhotic cardiomyopathy is associated with alterations of phospholamban phosphorylation and IL-6 levels, *Arch. Med. Res.* 52 (3) (2021) 284–293, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.11.004>.
- [23] C.S. Mesquita, R. Oliveira, F. Bento, D. Geraldo, J.V. Rodrigues, J.C. Marcos, Simplified 2, 4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins, *Anal. Biochem.* 458 (2014) 69–71, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>.
- [24] H. Aebi, Catalase in vitro, in: *Methods in Enzymology* Vol. 105, Academic Press, 1984, pp. 121–126, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [25] I. Benzie, J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power: the FRAP assay”, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76, <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- [26] C.V. Borges, M.A.F. Belin, E.P. Amorim, I.O. Minatel, G.C. Monteiro, H.A. G. Gomez, G.R.S. Monar, G.P.P. Lima, Bioactive amines changes during the ripening and thermal processes of bananas and plantains, *Food Chem.* 298 (2019) 125020–125027, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125020>.
- [27] P.J. Murray, Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response, *Curr. Opin. Pharmacol.* 6 (4) (2006) 379–386, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.01.010>.
- [28] N.G. Frangogiannis, Regulation of the inflammatory response in cardiac repair, *Circ. Res.* 110 (1) (2012) 159–173, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243162>.
- [29] M.A.F. Belin, T.A. Vieira, N.A. Grandini, J.S. Siqueira, T.L.N. Palacio, E.T.N. Maia, F.V. Francisqueti-Ferron, A.J.T. Ferron, S.G.Z. Bazan, D.H.S. Campos, I.O. Minatel, G.P.P. Lima, G. Lombardo, G. Aldini, C.R. Correa, *Citrus bergamia* (EndoBerg®) attenuates systolic blood pressure and prevents cardiac oxidative stress, cardiac remodeling and dysfunction in obese rats, *Atherosclerosis* 379 (2023) S178, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.598>.
- [30] M. Belin, T.A. Vieira, N.A. Grandini, J.S. Siqueira, T.L.N. Palacio, E.T.N. Maia, F. V. Francisqueti-Ferron, A.J.T. Ferron, S.G.Z. Bazan, D.H.S. Campos, G. Lombardo, G. Aldini, C.R. Correa, Effect of citrus bergamia (ENDOBERG®) on cardiovascular risk parameters of rats fed with a high-sugar fat diet, *Atherosclerosis* 379 (2023) S64, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.856>.
- [31] A.J. Mouton, X. Li, M.E. Hall, J.E. Hall, Obesity, hypertension, and cardiac dysfunction: novel roles of immunometabolism in macrophage activation and inflammation, *Circ. Res.* 126 (6) (2020) 789–806, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.312321>.
- [32] D. Rotariu, E.E. Babes, D.M. Tit, M. Moisi, C. Bustea, M. Stoicescu, A.F. Radu, C. M. Vesa, T. Behl, A.F. Bungau, S.G. Bungau, Oxidative stress—complex pathological issues concerning the hallmark of cardiovascular and metabolic disorders, *Biomed. Pharmacother.* 152 (2022) 113238, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113238>.
- [33] D. Maeda, N. Kagiya, K. Jujo, K. Saito, K. Kamiya, H. Saito, Y. Ogasahara, E. Maekawa, M. Konishi, T. Kitai, K. Iwata, H. Wada, M. Hiki, T. Dotare, T. Sunayama, T. Kasai, H. Nagamatsu, T. Ozawa, K. Izawa, S. Yamamoto, N. Aizawa, R. Yonezawa, K. Oka, S. Momomura, Y. Matsue, Aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase ratio is associated with frailty and mortality in older patients with heart failure, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 11957, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91368-z>.
- [34] J.R. Ussher, S. Elmariyah, R.E. Gerszten, J.R. Dyck, The emerging role of metabolomics in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 68 (25) (2016) 2850–2870, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.09.972>.
- [35] D.K. Tobias, P.R. Lawler, P.H. Harada, O.V. Demler, P.M. Ridker, J.E. Manson, S. Cheng, S. Mora, Circulating branched-chain amino acids and incident cardiovascular disease in a prospective cohort of US women, *Circul. Genom. Precis. Med.* 11 (4) (2018) e002157, <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.118.002157>.
- [36] N. Bodor, H.H. Farag, P. Polgar, A tryptamine analog with high affinity to the heart tissues is a potential antiarrhythmic agent, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (6) (2001) 889–894, <https://doi.org/10.1211/0022357011776054>.
- [37] W. Raasch, S. Regunathan, G. Li, D.J. Reis, Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues, *Life Sci.* 56 (26) (1995) 2319–2330, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00226-V](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00226-V).
- [38] C. Meana, J.M. Rubin, C. Bordin, L. Suarez, J. Bordin, M. Sanchez, Correlation between endogenous polyamines in human cardiac tissues and clinical parameters in patients with heart failure, *J. Cell. Mol. Med.* 20 (2) (2016) 302–312, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12674>.
- [39] A.E. Donaldson, L.L. Lamont, Metabolomics of post-mortem blood: identifying potential markers of post-mortem interval, *Metabolomics* 11 (2015) 237–245, <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0691-5>.
- [40] M. Triggiani, A. Genovese, C. Vigorito, G. Marone, Histamine and human heart, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 77 (1–2) (1985) 174–176, <https://doi.org/10.1159/000233777>.
- [41] F. Côté, C. Fligny, Y. Fromes, J. Mallet, G. Vojdani, Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function, *Trends Mol. Med.* 10 (5) (2004) 232–238, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.03.007>.
- [42] Y. Ren, Z. Li, W. Li, X. Fan, F. Han, Y. Huang, Y. Yu, L. Qian, Y. Xiong, Arginase: biological and therapeutic implications in diabetes mellitus and its complications,

- Oxidative Med. Cell. Longev. 2022 (2022), <https://doi.org/10.1155/2022/2419412>.
- [43] H. Li, Y. Meng, S. He, X. Tan, Y. Zhang, X. Zhang, L. Wang, W. Zheng, Macrophages, chronic inflammation, and insulin resistance, *Cells* 11 (19) (2022) 3001, <https://doi.org/10.3390/cells11193001>.
- [44] R.J. Rounbehler, W. Li, M.A. Hall, C. Yang, M. Fallahi, J.L. Cleveland, Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma, *Cancer Res.* 69 (2) (2009) 547–553, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2968>.
- [45] S.A.H. Ahmed, S.A. Ansari, E.P. Mensah-Brown, B.S. Emerald, The role of DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Clin. Epigenetics* 12 (1) (2020) 104, <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00896-4>.
- [46] R.M. Pascale, M.M. Simile, D.F. Calvisi, C.F. Feo, F. Feo, S-adenosylmethionine: from the discovery of its inhibition of tumorigenesis to its use as a therapeutic agent, *Cells* 11 (3) (2022) 409, <https://doi.org/10.3390/cells11030409>.
- [47] L. Ma, Y. Ni, Z. Wang, W. Tu, L. Ni, F. Zhuge, A. Zheng, L. Hu, Y. Zhao, L. Zheng, Z. Fu, Spermidine improves gut barrier integrity and gut microbiota function in diet-induced obese mice, *Gut Microbes* 12 (1) (2020) 1832857, <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1832857>.
- [48] E. Burgos-Morón, Z. Abad-Jiménez, A. Martínez de Marañón, F. Iannantuoni, I. Escribano-López, S. López-Domènec, C. Salom, A. Jover, V. Mora, I. Roldán, E. Solá, M. Rocha, V.M. Victor, Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues, *J. Clin. Med.* 8 (9) (2019) 1385, <https://doi.org/10.3390/jcm8091385>.
- [49] G.D. Albano, R.P. Gagliardo, A.M. Montalbano, M. Profta, Overview of the mechanisms of oxidative stress: impact in inflammation of the airway diseases, *Antioxidants* 11 (11) (2022) 2237, <https://doi.org/10.3390/antiox11112237>.
- [50] R.T.H. Tse, X. Ding, C.Y.P. Wong, C.K.L. Cheng, P.K.F. Chiu, C.F. Ng, The association between spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) and human malignancies, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (11) (2022) 5926, <https://doi.org/10.3390/ijms23115926>.
- [51] S.K.S. Hong, R. Chaturvedi, B.M. Piazuelo, L.A. Coburn, C.S. Williams, A. G. Delgado, R.A. Casero, D.A. Schwartz, K.T. Wilson, Increased expression and cellular localization of spermine oxidase in ulcerative colitis and relationship to disease activity, *Inflamm. Bowel Dis.* 16 (9) (2010) 1557–1566, <https://doi.org/10.1002/ibd.21224>.
- [52] H.D. Jeong, J.H. Kim, G.E. Kwon, S.T. Lee, Expression of polyamine oxidase in fibroblasts induces MMP-1 and decreases the integrity of extracellular matrix, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (18) (2022) 10487, <https://doi.org/10.3390/ijms231810487>.
- [53] S. Park, Y. Kim, J. Lee, J.Y. Lee, H. Kim, S. Lee, C.M. Oh, A systems biology approach to investigating the interaction between serotonin synthesis by tryptophan hydroxylase and the metabolic homeostasis, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (5) (2021) 2452, <https://doi.org/10.3390/ijms22052452>.
- [54] A.S. Correia, A. Cardoso, N. Vale, Oxidative stress in depression: the link with the stress response, neuroinflammation, serotonin, neurogenesis and synaptic plasticity, *Antioxidants* 12 (2) (2023) 470, <https://doi.org/10.3390/antiox12020470>.
- [55] I. Cervenka, L.Z. Agudelo, J.L. Ruas, Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health, *Science* 357 (6349) (2017) eaaf9794, <https://doi.org/10.1126/science.aaf9794>.
- [56] B.E. Leonard, HPA and immune axes in stress: involvement of the serotonergic system, *Neuroimmunomodulation* 13 (5–6) (2007) 268–276, <https://doi.org/10.1159/000104854>.
- [57] B. Leonard, M. Maes, Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36 (2) (2012) 764–785, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.005>.
- [58] J. Ren, N.N. Wu, S. Wang, J.R. Sowers, Y. Zhang, Obesity cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications, *Physiol. Rev.* 101 (4) (2021) 1745–1807, <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2020>.
- [59] V.S. Hahn, C. Petucci, M.S. Kim, K.C. Bedi Jr., H. Wang, S. Mishra, N. Koleini, E. J. Yoo, K.B. Margulies, Z. Arany, D.P. Kelly, D.A. Kass, K. Sharma, Myocardial metabolomics of human heart failure with preserved ejection fraction, *Circulation* 147 (15) (2023) 1147–1161, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.061846>.
- [60] A.V. Maltsev, E.V. Evdokimovskii, Y.M. Kokoz, α_2 -adrenoceptor signaling in cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats starts to impair already at early age, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 512 (4) (2019) 908–913, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.117>.
- [61] Y. Lin, L.N. Wang, Y.H. Xi, H.Z. Li, F.G. Xiao, Y.J. Zhao, Y. Tian, B.F. Yang, C.Q. Xu, L-arginine inhibits isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through nitric oxide and polyamine pathways, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103 (2) (2008) 124–130, <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00261.x>.
- [62] A.F. Bekebrede, J. Keijer, W.J.J. Gerrits, V.C.J. de Boer, The molecular and physiological effects of protein-derived polyamines in the intestine, *Nutrients* 12 (1) (2020) 197, <https://doi.org/10.3390/nut12010197>.
- [63] N. Kaludercic, J. Miale-Perez, N. Paolocci, A. Parini, F. Di Lisa, Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 73 (2014) 34–42, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.12.032>.
- [64] S.W. Watts, S.F. Morrison, R.P. Davis, S.M. Barman, Serotonin and blood pressure regulation, *Pharmacol. Rev.* 64 (2) (2012) 359–388, <https://doi.org/10.1124/pr.111.004697>.
- [65] C. Rouzaud-Laborde, C. Delmas, N. Pizzinat, F. Tortosa, C. Garcia, J. Miale-Perez, B. Payrastre, P. Sie, O. Spreux-Varoquaux, B. Sallerin, D. Carrie, M. Galinier, A. Parini, O. Lairez, Platelet activation and arterial peripheral serotonin turnover in cardiac remodeling associated to aortic stenosis, *Am. J. Hematol.* 90 (1) (2015) 15–19, <https://doi.org/10.1002/ajh.23855>.
- [66] J. Saito, E. Suzuki, Y. Tajima, K. Takami, Y. Horikawa, J. Takeda, Increased plasma serotonin metabolite 5-hydroxyindole acetic acid concentrations are associated with impaired systolic and late diastolic forward flows during cardiac cycle and elevated resistive index at popliteal artery and renal insufficiency in type 2 diabetic patients with microalbuminuria, *Endocr. J.* 63 (1) (2016) 69–76, <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ15-0343>.
- [67] J. Miale-Perez, Y. Santin, A. Parini, Monoamine oxidase-A, serotonin and norepinephrine: synergistic players in cardiac physiology and pathology, *J. Neural Transm.* 125 (2018) 1627–1634, <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1908-y>.
- [68] K. White, Y. Dempsey, M. Nilsen, A.F. Wright, L. Loughlin, M.R. MacLean, The serotonin transporter, gender, and 17 β oestradiol in the development of pulmonary arterial hypertension, *Cardiovasc. Res.* 90 (2) (2011) 373–382, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq408>.
- [69] M. Mauler, N. Herr, C. Schoenichen, T. Witsch, T. Marchini, C. Härdtner, C. Koentges, K. Kienle, V. Ollivier, M. Schell, L. Dorner, C. Wippel, D. Stallmann, C. Normann, H. Bugger, P. Walther, D. Wolf, I. Ahrens, T. Lämmermann, B. Ho-Tin-Noé, K. Ley, C. Bode, I. Hilgendorf, D. Duerschmied, Platelet serotonin aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury via neutrophil degranulation, *Circulation* 139 (7) (2019) 918–931, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033942>.
- [70] S. Azouzi, H. Santuz, S. Morandot, C. Pereira, F. Côté, O. Hermine, P. Amireault, Antioxidant and membrane binding properties of serotonin protect lipids from oxidation, *Biophys. J.* 112 (9) (2017) 1863–1873, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.03.037>.
- [71] J. Munoz-Castaneda, P. Montilla, F. Padillo, I. Bujalance, M. Munoz, J. Muntane, Role of serotonin in cerebral oxidative stress in rat, *Acta Neurobiol. Exp.* 66 (1) (2006) 1–6, <https://doi.org/10.55782/ane-2006-1581>.

Conclusão

Concluimos que o extrato do fruto da bergamota possui quantidades notáveis de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante por DPPH, ABTS e FRAP, e possui baixos níveis de carotenoides. Além disso, o perfil de aminas biogênicas do extrato de *Citrus bergamia* é composto por histamina, tiramina, triptamina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, serotonina, dopamina e agmatina, com destaque para as antioxidantes espermidina e agmatina. Ao mesmo tempo, o extrato do fruto da bergamota é hipotensivo, devido ao efeito sinérgico de seus compostos bioativos, demonstrando grande potencial para prevenir e/ou tratar a hipertensão.

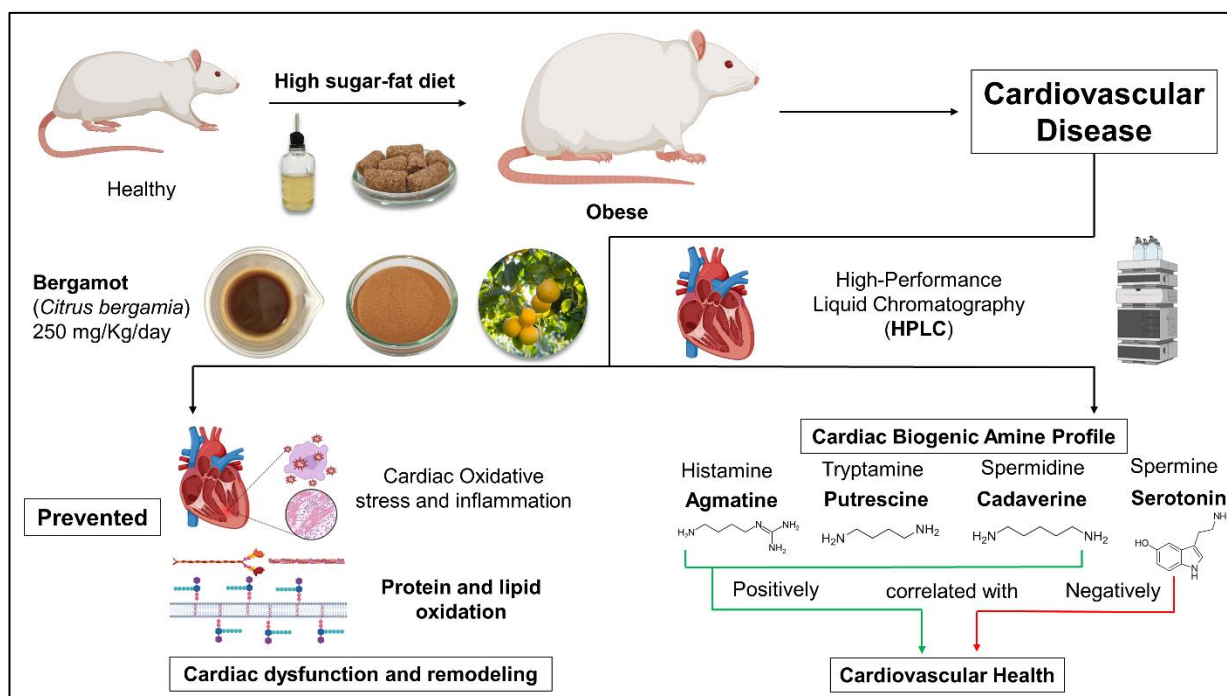
Adicionalmente, a suplementação de com o extrato do fruto bergamota previne remodelamento e disfunção cardíaca em ratos obesos. A suplementação do extrato do fruto bergamota tem grande potencial no combate a doenças cardíacas na obesidade através do controle do estresse oxidativo, porém, ainda é importante entender em quais estruturas proteicas e lipídicas do tecido cardíaco a bergamota atua. E, posteriormente, avaliar com estudos clínicos, o efeito da suplementação do extrato do fruto da bergamota nas doenças cardiovasculares decorrentes ou não da obesidade.

Por fim, este estudo mostra que o perfil de aminas biogênicas cardíacas é composto por triptamina, agmatina, putrescina, cadaverina, histamina, espermidina, espermina e serotonina. Além disso, a obesidade diminui os níveis de agmatina, putrescina, cadaverina e espermidina e aumenta os níveis de serotonina. Finalmente, concluimos que agmatina, putrescina e cadaverina estão correlacionadas com a saúde cardiovascular, enquanto serotonina está correlacionada com as doenças cardiovasculares. Futuramente, com mais pesquisas experimentais e clínicas sobre estas aminas biogênicas, elas poderão ser utilizadas como alvos terapêuticos e para diagnósticos menos invasivos, mais rápidos e mais precisos de doenças cardiovasculares decorrentes ou não da obesidade.

Considerações finais

Nestas breves considerações finais, serão verificadas as hipóteses deste trabalho. Em seguida, serão sugeridos novos estudos decorrentes dos achados desta dissertação.

A hipótese deste trabalho é que a suplementação de com o extrato de bergamota previne o desenvolvimento de disfunção cardíaca em ratos obesos por modular mediadores inflamatórios e indicadores do estresse oxidativo no miocárdio. Além disso, também é hipotetizado que a concentração de amins biogênicas no tecido cardíaco tem relação com a disfunção cardíaca. Ambas as hipóteses foram confirmadas. Foi visto que a suplementação com o extrato de bergamota preveniu o desenvolvimento de disfunção cardíaca em ratos obesos pelo controle de marcadores de inflamação e de estresse oxidativo cardíacos. De maneira complementar, foi visto que as concentrações cardíacas de putrescina, cadaverina e agmatina estão positivamente correlacionadas com a saúde cardiovascular, enquanto as concentrações cardíacas de serotonina estão positivamente correlacionadas com doenças cardiovasculares. A seguir, encontra um *Graphical Abstract* final representando os achados desta dissertação.



A partir dos achados desta dissertação, são sugeridos novos estudos visando avaliar em quais estruturas proteicas e lipídicas o extrato do fruto da bergamota age, diminuindo a inflamação e o estresse oxidativo cardíacos, e prevenindo a disfunção cardíaca gerada pela obesidade. Ao mesmo tempo, visto que não houve efeitos colaterais da bergamota, recomenda-se que seja avaliado o efeito do extrato do fruto da bergamota nas doenças cardiovasculares em estudos clínicos. Concomitantemente, recomendam-se novos estudos visando avaliar os níveis de aminas biogênicas no plasma, urina e saliva de pacientes com doenças cardiovasculares para confirmar as correlações encontradas neste estudo ou identificar novas. Da mesma maneira, recomenda-se a realização de novos estudos experimentais longitudinais avaliando os níveis das aminas biogênicas e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em diferentes momentos. Estes estudos trarão luz os mecanismos das correlações previamente observadas. Por fim, recomenda-se a realização de estudos visando modular o perfil de aminas biogênicas cardíaco (ou plasmático/urinário/salivar) como estratégia terapêutica para doenças cardiovasculares, provenientes ou não da obesidade.

Realizações no período

Durante o mestrado, várias atividades foram realizadas. Faz-se necessário registrar aqui, no fim desta dissertação, algumas destas, visando o reconhecimento do trabalho do pós-graduando. Os destaques deste período foram as premiações de 1º Lugar no Departamento de Nutrição na sessão de temas livres – E poster – do 43º Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo (SOCESP), segundo melhor poster e melhor apresentação oral no *1st International Workshop on Biotechnology in Healthcare: Paths to Innovation*; e, principalmente, as publicações nos periódicos. No mestrado, foram realizadas 9 publicações, sendo 5 com o aluno como primeiro autor. A seguir, encontram-se as revistas e os DOIs (Digital Object Identifier) destas publicações:

- *Journal of Functional Foods*, 2024
(<https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106042>);
- *Pharmacological Research - Natural Products*, 2024
(<https://doi.org/10.1016/j.prenap.2024.100022>);
- *Revista Brasileira de Hipertensão*, 2024
(<http://dx.doi.org/10.47870/1519-7522/202431016-10>);
- *Vascular Pharmacology*, 2024
(<https://doi.org/10.1016/j.vph.2024.107412>);
- *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2023
(<https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111908>);
- *Livers*, 2023 (<https://doi.org/10.3390/livers3020017>);
- *Atherosclerosis*, 2023
(<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.856>);
- *Atherosclerosis*, 2023
(<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.598>);
- *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2023
(<https://doi.org/10.36660/abc.20220770>).

Adicionalmente, o aluno tirou a nota máxima (A) em todas as disciplinas que cursou, atingindo 21 créditos, sendo 12 obrigatórios; obteve 107 créditos em atividades complementares, sendo 12 obrigatórios; concluiu o curso de Pós-graduação *Lato Sensu* em Nutrição Clínica, Esportiva e Exames Laboratoriais com carga horária de 390 horas; foi ouvinte em 62 eventos científicos, sendo um na Alemanha (91th *European Atherosclerosis Society Congress*), em 2023, e outro nos Estados Unidos (A *Hypertension Summer School* in Chicago-IL, do *American Journal of Hypertension*), em 2024; ministrou 17 aulas/palestras; realizou um estágio de docência na pós-graduação; teve 34 participações/apresentações de trabalhos científicos (com duas apresentações no 91th *EAS Congress* em *Mannheim*, na Alemanha); com 8 premiações, sendo 2 em eventos internacionais; organizou 5 eventos científicos; participou de 8 atividades de extensão; orientou 2 atividades em estágio curricular de nutrição;

orientou 7 estagiários em nutrição clínica no consultório; tutorou, em espanhol, o estágio de duas intercambistas internacionais; e melhorou sua fluência em inglês, alcançando nota 600 no TOEFL ITP, com classificação B2-C1 de acordo com o *Common European Framework of Reference* (CEFR), representando um nível intermediário/avançado de fluência.

Por fim, com a finalidade de divulgação científica à comunidade, o “Resumo para sociedade” desta dissertação foi enviado por *Whatsapp* para cerca de 15 pessoas com idade entre 15 e 60 anos. Esta pequena amostra representa a sociedade em geral, ou seja, o público sem “contato direto” com o ambiente acadêmico. A seguir, encontram-se algumas respostas obtidas após esta amostra ser questionada em relação a quão entendível/compreensível o texto estava:

I) “Deu para entender tudo bonitinho”;

II) “Caramba, muito boom! 🤖🤖”;

III) “Pelo pouco conhecimento q tenho; está perfeito. Objetivo e informativo. Sem blá blá blá. Ou seja, está muito bem elaborado e de fácil compreensão. Parabéns!!!”;

IV) “Eu tb achei excelente. Muito claro e direto, sem encheção de linguiça. Não ficou cansativo e despertou interesse”

Logo, a partir destes relatos, nota-se que o “Resumo para a sociedade” atingiu seu propósito e foi capaz de comunicar com assertividade, clareza e coloquialidade os achados desta dissertação de mestrado.

Referências bibliográficas

- ABALENIKHINA, Y. V., *et al.* Pregnan X Receptor Functioning under Conditions of Nitrosative Stress. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, v. 16(2), p. 140-147, 2022.
- ABDULRAZZAQ, Y. M.; BASTAKI, S. M.; ADEGHATE, E. Histamine H3 receptor antagonists – Roles in neurological and endocrine diseases and diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 150, p. 112947, 2022.
- ABOT, A., *et al.* Reactive oxygen species/reactive nitrogen species as messengers in the gut: Impact on physiology and metabolic disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 37(4-6), p. 394-415, 2022.
- ACHARJEE, S., *et al.* Mechanisms of DNA methylation and histone modifications. *Progress in molecular biology and translational science*, v. 197, p. 51-92, 2023.
- ADETUNJI, J. A. *et al.* The protective roles of citrus flavonoids, naringenin, and naringin on endothelial cell dysfunction in diseases. *Heliyon*, 2023.
- ADORISIO, S. *et al.* Biological effects of bergamot and its potential therapeutic use as an anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer agent. *Pharmaceutical Biology*, v. 61, n. 1, p. 639-646, 2023.
- AGISTA, A. Z. *et al.* Tryptamine, a Microbial Metabolite in Fermented Rice Bran Suppressed Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in a Murine Macrophage Model. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 19, p. 11209, 2022.
- AGREGÁN, R. *et al.* Sustainability and functional foods: challenges and opportunities. *Strategies to Improve the Quality of Foods*, p. 1-31, 2024.
- AHMED, B.; SULTANA, R.; GREENE, M. W. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 137, p. 111315, 2021.
- AIMO, A. *et al.* Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: from pathophysiology to therapeutic strategies. *European Journal of Preventive Cardiology*, v. 27, n. 5, p. 494-510, 2020.
- AKAGAWA, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological

implications, and analytical approaches. *Free Radical Research*, v. 55, n. 4, p. 307-320, 2021.

ALBUS, C.; HAASS, M. Main Features of Cardiac Diseases. In: *Psychocardiology: A practical guide for doctors and psychologists*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 1-40, 2022.

ALDINUCCI, D., BORGHESE, C., & CASAGRANDE, N. The CCL5/CCR5 axis in cancer progression. *Cancers*, v. 12(7), p. 1765, 2020.

ALI, A. H., *et al.* Endorphin: function and mechanism of action. *Science Archives*, v. 2(1), p. 9-13, 2021

ALIYU, M. *et al.* Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. *International Immunopharmacology*, v. 111, p. 109130, 1 out. 2022.

ALLEN, R. C. The industrial revolution: A very short introduction (Vol. 509). *Oxford University Press*, 2017.

ALLY, A., *et al.* Role of neuronal nitric oxide synthase on cardiovascular functions in physiological and pathophysiological states. *Nitric Oxide*, v. 102, p. 52-73, 2020.

AL-MANSOORI, L.; *et al.* Role of inflammatory cytokines, growth factors and adipokines in adipogenesis and insulin resistance. *Inflammation*, v. 2022, p. 1-4, 1 fev. 2022.

ALMEIDA, C. M. *et al.* Latest advances in sensors for optical detection of relevant amines: insights into lanthanide-based sensors. *Journal of Materials Chemistry C*, v. 10, n. 41, p. 15263-15276, 2022.

ALVAREZ, F., *et al.* Mechanisms of TREG cell adaptation to inflammation. *Journal of Leucocyte Biology*, v. 108(2), p. 559-571, 2020.

ANTÓN, S. C. Natural history of *Homo erectus*. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, v. 122(S37), p. 126-170, 2003.

ASKIN, L.; ABUS, S.; TANRIVERDI, O. Resistin and cardiovascular disease: a review of the current literature regarding clinical and pathological relationships. *Current Cardiology Reviews*, v. 18, n. 1, 3 mar.

2022.

AVERILL-BATES, D. A. The antioxidant glutathione. In *Vitamins and hormones*. Academic Press, v. 121, p. 109-141, 2023.

BABKINA, I. I., SERGEEVA, S. P., & GORBACHEVA, L. R. The role of NF- κ B in neuroinflammation. *Neurochemical Journal*, v. 15(2), p. 114-128, 2021.

BÄHR, I., *et al.* Obesity-associated alterations of natural killer cells and immunosurveillance of cancer. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 245, 2020.

BALDINI, F. *et al.* Adipocyte hypertrophy parallels alterations of mitochondrial status in a cell model for adipose tissue dysfunction in obesity. *Life Sciences*, v. 265, p. 118812, 2021.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation*, v. 2010, n. 1, p. 802078, 2010.

BAO, X. *et al.* Ornithine decarboxylation system of shewanella baltica regulates putrescine production and acid resistance. *Journal of Food Protection*, v. 84, n. 2, p. 303-309, 2021.

BARAN, J. *et al.* Mast Cells as a Target—A Comprehensive Review of Recent Therapeutic Approaches. *Cells*, v. 12, n. 8, p. 1187, 2023.

BARON, G. *et al.* Analytical profile and antioxidant and anti-inflammatory activities of the enriched polyphenol fractions isolated from bergamot fruit and leave. *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 141, 2021.

BAR-YOSEF, O., & BELFER-COHEN, A. From Africa to Eurasia—early dispersals. *Quaternary International*, v. 75(1), p. 19-28, 2001.

BASHEER, C., *et al.* Hydrazone-based ligands for micro-solid phase extraction-high performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in orange juice. *Journal of chromatography A*, v. 1218(28), p. 4332-4339, 2011.

BASÍLIO, L. S. P. *et al.* New beverage based on grapes and purple-fleshed sweet potatoes: Use of non-standard tubers. *Food Bioscience*, v. 47, p.

101626-101636, 2022.

BATTINENI, G. *et al.* Impact of obesity-induced inflammation on cardiovascular diseases (CVD). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 9, p. 4798, 30 abr. 2021.

BEVERLY, J. K.; BUDOFF, M. J. Atherosclerosis: pathophysiology of insulin resistance, hyperglycemia, hyperlipidemia, and inflammation. *Journal of diabetes*, v. 12, n. 2, p. 102-104, 2020.

BHAGWAT, A. C.; SAROJ, S. D. Polyamine as a microenvironment factor in resistance to antibiotics. *Critical Reviews in Microbiology*, p. 1-10, 2023.

BIDEYAN, L., NAGARI, R., & TONTONNOZ, P. Hepatic transcriptional responses to fasting and feeding. *Genes & development*, v. 35(9-10), p. 635-657, 2021.

BLACK, E. Globalization of the food industry: Transnational food corporations, the spread of processed food, and their implications for food security and nutrition, 2016.

BOGUSLAVSKYI, A. *et al.* Phospholemman phosphorylation regulates vascular tone, blood pressure, and hypertension in mice and humans. *Circulation*, v. 143, n. 11, p. 1123-1138, 2021.

BORGES, C. V. *et al.* Tryptophan and biogenic amines in the differentiation and quality of honey. *International Journal of Tryptophan Research*, v. 15, p. 1-12, 2022.

BOSELLI, F., FREUND, J. B., & VERMOT, J. Blood flow mechanics in cardiovascular development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 72, p. 2545-2559, 2015.

BOUCHARD, C., BLAIR, S. N., & HASKELL, W. L. Physical activity and health. *Human Kinetics*, 2012.

BOYLE, E. K., & WOOD, B. Human evolutionary history. In *Evolutionary Neuroscience*, p. 733-752, 2020.

BRUD, W. S. Industrial uses of essential oils. In: *Handbook of Essential Oils*. CRC Press, p. 1029-1040, 2020

BRUNET, M., *et al.* A new hominid from the Upper Miocene of Chad, Central

Africa. *Nature*, v. 418(6894), p. 145-151, 2002.

BUDRONI, V., & VERSTEEG, G. A. Negative regulation of the innate immune response through proteasomal degradation and deubiquitination. *Viruses*, v. 13(4), p. 584, 2021.

CAMPOLO, N., *et al.* 3-Nitrotyrosine and related derivatives in proteins: precursors, radical intermediates and impact in function. *Essays in biochemistry*, v. 64(1), p. 111-133, 2020.

CANTON, M.; *et al.* Reactive oxygen species in macrophages: sources and targets. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 734229, 30 set. 2021.

CARRESI, C. *et al.* The effect of natural antioxidants in the development of metabolic syndrome: Focus on bergamot polyphenolic fraction. *Nutrients*, v. 12, n. 5, p. 1504, 2020.

CARRIÓN, J. S., ROSE, J., & STRINGER, C. Early human evolution in the western Palaeartic: ecological scenarios. *Quaternary Science Reviews*, v. 30(11-12), p. 1281-1295, 2011.

CARUSILLO, A., & MUSSOLINO, C. DNA damage: from threat to treatment. *Cells*, v. 9(7), p. 1665, 2020.

CASTELLANO-CASTILLO, D. *et al.* Epigenetic regulation of white adipose tissue in the onset of obesity and metabolic diseases. *Obesity Reviews*, v. 21, n. 11, p. e13054, nov. 2020.

CAUTELA, D. *et al.* Global warming threatens the world production of bergamot essential oil. *Industrial Crops and Products*, v. 172, p. 113986, 2021.

CAVALLI, G. *et al.* Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity Reviews*, v. 20, n. 3, p. 102763, 1 mar. 2021.

CEDIEL, G., *et al.* Ultra-processed foods drive to unhealthy diets: evidence from Chile. *Public health nutrition*, v. 24(7), p. 1698-1707, 2021.

CHECA, J.; ARAN, J. M. Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes. *Journal of Inflammation Research*, p. 1057-1073, 2020.

CHELLAPPA, S. L., & AESCHBACH, D. Sleep and anxiety: From mechanisms to interventions. *Sleep medicine reviews*, v. 61, p. 101583, 2022.

CHO, S. *et al.* Cardioprotection by the adiponectin receptor agonist ALY688 in a preclinical mouse model of heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 171, p. 116119, 2024.

CHOI, H. M.; DOSS, H. M.; KIM, K. S. Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 4, p. 1219, 12 fev. 2020.

CHOUDHARY, S. *et al.* Cellular responses, osmotic adjustments, and role of osmolytes in providing salt stress resilience in higher plants: Polyamines and nitric oxide crosstalk. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 42, n. 2, p. 539-553, 2023.

CIARCIÀ, G., *et al.* Vitamin E and non-communicable diseases: a review. *Biomedicines*, v. 10(10), p. 2473, 2022.

CIUCĂ-ANGHEL, D. M. *et al.* Understanding the Mechanisms of Action and Effects of Drugs of Abuse. *Molecules*, v. 28, n. 13, p. 4969, 2023.

CLEVEN, L. *et al.* The association between physical activity with incident obesity, coronary heart disease, diabetes and hypertension in adults: a systematic review of longitudinal studies published after 2012. *BMC public health*, v. 20, p. 1-15, 2020.

COKER, T. *et al.* How could different obesity scenarios alter the burden of type 2 diabetes and liver disease in Saudi Arabia?. *Obesity Facts*, v. 16, n. 6, p. 559-566, 2023.

ČOLAK, E.; PAP, D. The role of oxidative stress in the development of obesity and obesity-related metabolic disorders. *Journal of Medical Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 1, 2021.

COMAI, S. *et al.* Tryptophan in health and disease. *Advances in Clinical Chemistry*, v. 95, p. 165-218, 2020.

COMAS-BASTÉ, O. *et al.* Histamine intolerance: The current state of the art. *Biomolecules*, v. 10, n. 8, p. 1181, 2020.

- CORKEY, B. E. Reactive oxygen species: role in obesity and mitochondrial energy efficiency. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 378(1885), p. 20220210, 2023.,
- CORPAS, F. J., GONZÁLEZ-GORDO, S., & PALMA, J. M. Protein nitration: A connecting bridge between nitric oxide (NO) and plant stress. *Plant Stress*, v. 2, p. 100026, 2021,
- DAI, Y. *et al.* Unraveling Mechanistic Insights into the Role of Microbiome in Neurogenic Hypertension: A Comprehensive Review. *Pathology-Research and Practice*, p. 154740, 2023.
- DAIBER, A., *et al.* Redox-related biomarkers in human cardiovascular disease-classical footprints and beyond. *Redox Biology*, v. 42, p. 101875, 2021.
- DE ARAÚJO, J. M. *et al.* The direct and indirect costs of cardiovascular diseases in Brazil. *PLoS One*, v. 17, n. 12, p. e0278891, 2022.
- DE FANO, M. *et al.*, G. Adipose tissue plasticity in response to pathophysiological cues: A connecting link between obesity and its associated comorbidities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 10, p. 5511, 14 maio 2022.
- DE LORENZO, A. *et al.* Obesity: A preventable, treatable, but relapsing disease. *Nutrition*, v. 71, p. 110615, 2020.
- DE OLIVEIRA DOS SANTOS, A. R. *et al.* Adipokines, myokines, and hepatokines: crosstalk and metabolic repercussions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 5, p. 2639, 5 mar. 2021.
- DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. *et al.* Classification of enzymes and catalytic properties. In: Biomass, biofuels, biochemicals. *Elsevier*, p. 11-30, 2020.
- DELLA VEDOVA, L., *et al.* Chemical, nutritional and biological evaluation of a sustainable and scalable complex of phytochemicals from bergamot by-products. *Molecules*, v. 28(7), p. 2964, 2023.
- DEMIRCI-CEKIC, S. *et al.* Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 209, p.

114477, 5 fev. 2022.

DENG, Y. *et al.* The role and mechanism of citrus flavonoids in cardiovascular diseases prevention and treatment. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 62(27), p. 7591-7614, 2022.

DONIA, T.; KHAMIS, A. Management of oxidative stress and inflammation in cardiovascular diseases: mechanisms and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 26, p. 34121-34153, 2021.

DOUNOUSI, E., *et al.* Association between PCSK9 levels and markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in a population of nondialysis chronic kidney disease patients. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2021(1), p. 6677012, 2021.

DRANE, A. L. *et al.* Evaluation of relationships between results of electrocardiography and echocardiography in 341 chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Veterinary Research*, v. 81, n. 6, p. 488-498, 2020.

DU, Y., *et al.* Naringenin: a promising therapeutic agent against organ fibrosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2021(1), p. 1210675, 2021.

DUAN, W. *et al.* Serotonin 2A receptor (5-HT_{2A}R) agonists: psychedelics and non-hallucinogenic analogues as emerging antidepressants. *Chemical Reviews*, v. 124, n. 1, p. 124-163, 2023.

DUCA, G.; TRAVIN, S. Reactions' mechanisms and applications of hydrogen peroxide. *American Journal of Physical Chemistry*, v. 9, n. 2, p. 36-44, 2020.

EGGER, G., & DIXON, J. Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. *BioMed research international*, v. 2014(1), p. 731685, 2014.

EHLTING, C.; WOLF, S. D.; BODE, J. G. Acute-phase protein synthesis: a key feature of innate immune functions of the liver. *Biological Chemistry*, v. 402, n. 9, p. 1129-45, 26 ago. 2021.

EKINCI, G. Economic impacts of cardiovascular diseases: an econometric evaluation in Turkey. *Iranian Journal of Public Health*, v. 52, n. 1, p. 118, 2023.

ELIEH ALI KOMI, D.; WÖHRL, S.; BIELORY, L. Mast cell biology at molecular level: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 58, p. 342-365, 2020.

ELKHATIM, K. A. S.; ELAGIB, R. A.; HASSAN, A. B. Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits. *Food Science & Nutrition*, v. 6, n. 5, p. 1214-1219, 2018.

EL-RADHI, A. S.; EL-RADHI, A. S. The Chest. In: *Avoiding Misdiagnosis in Pediatric Practice*. p. 15-37, 2021.

ENGWA, G. A.; NWEKE, F. N.; MWAMUYE, Y. Anti-inflammatory potential of xanthenes and the molecular mechanisms. In: *Anti-inflammatory potential of nanoparticles*. Elsevier, 2022. p. 433-446.

ESCH, T., & STEFANO, G. B. Endogenous reward mechanisms and their importance in stress reduction, exercise and the brain. *Archives of Medical science*, v. 6(3), p. 447-455, 2010.

FANG, Y., *et al.* Establishment, immunological analysis, and drug prediction of a prognostic signature of ovarian cancer related to histone acetylation. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 947252, 2022

FARDET, A., & ROCK, E. Ultra-processed foods and food system sustainability: what are the links?. *Sustainability*, v. 12(15), p. 6280, 2020.

FERRETTI, A., *et al.* Migraine, Allergy, and Histamine: Is There a Link?. *Journal of Clinical Medicine*, v. 12(10), p. 3566, 2023.

FILCEK, M. The Neuroarchitecture Technology of Vinci Power Nap: A Revolution in Fast Stress Reduction, Newborns Protection, Well-being and Sleep Regeneration also for People with Trauma, Depression and PTSD in Smart Cities. *Journal of Psychiatry and Psychiatric Disorders*, v. 6(2), p. 61-104, 2022.

FIORANI, M., *et al.* Histamine-producing bacteria and their role in

gastrointestinal disorders. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 17(7), p. 709-718, 2023.

FRISTON, D., *et al.* Leptin and fractalkine: novel subcutaneous cytokines in burn injury. *Disease models & mechanisms*, v. 13(4), p. dmm042713, 2020

GAO, S., *et al.* Histamine induced high mobility group box-1 release from vascular endothelial cells through H1 receptor. *Frontiers in immunology*, v. 13, p. 930683, 2022.

GARCIA-CAPARROS, P., *et al.* Oxidative stress and antioxidant metabolism under adverse environmental conditions: a review. *The Botanical Review*, v. 87, p. 421-466, 2021.

GASMI, A., *et al.* Obesity and insulin resistance: associations with chronic inflammation, genetic and epigenetic factors. *Current medicinal chemistry*, v. 28(4), p. 800-826, 2021.

GATTUSO, A., *et al.* Quality Evaluation of Bergamot Juice Produced in Different Areas of Calabria Region. *Foods*, v. 13(13), p. 2080, 2024.

GE, M.; *et al.* The vicious cycle of renal lipotoxicity and mitochondrial dysfunction. *Frontiers in physiology*, v. 11, p. 732, 7 jul. 2020.

GĘGOTEK, A., & SKRZYDLEWSKA, E. Ascorbic acid as antioxidant. *Vitamins and Hormones*, v. 121, p. 247-270, 2023.

GENDRE, T. *et al.* The role of copper homeostasis in macrophage polarization. *Biochemical Society Transactions*, v. 49, n. 5, p. 2105-2119, 2021.

GENG, Y. *et al.* How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease?. *Hepatology international*, v. 15, p. 21-35, fev. 2021.

GHEMRAWI, R.; KHAIR, M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 17, p. 6127, 25 ago. 2020.

GORSKA-PONIKOWSKA, M., *et al.* Modification of DNA structure by reactive nitrogen species as a result of 2-methoxyestradiol-induced

neuronal nitric oxide synthase uncoupling in metastatic osteosarcoma cells. *Redox Biology*, v. 32, p. 101522, 2020

GOVENDER, I., *et al.* Palpitations: Evaluation and management by primary care practitioners. *South African Family Practice*, v. 64(1), p. 5449, 2022.

GRAESSLER, B., *et al.* Effects of different training interventions on heart rate variability and cardiovascular health and risk factors in young and middle-aged adults: A systematic review. *Frontiers in physiology*, v. 12, p. 657274, 2021.

GRIENDLING, K. K., *et al.* Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, v. 119(5), p. e39-e75, 2016.

GROSSO, G., *et al.* Anti-inflammatory nutrients and obesity-associated metabolic-inflammation: state of the art and future direction. *Nutrients*, v. 14(6), p. 1137, 2022.

GULLO, G., DATTOLA, A., & ZAPPIA, R. First observations of graft combination on bergamot fruit quality, Femminello cultivar. *Fruits*, v. 75(4), p. 170-179, 2020

GUZEL, T., & MIROWSKA-GUZEL, D. The role of serotonin neurotransmission in gastrointestinal tract and pharmacotherapy. *Molecules*, v. 27(5), p. 1680, 2022.

HALL, K. D. From dearth to excess: the rise of obesity in an ultra-processed food system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 378(1885), p. 20220214, 2023.

HALLORAN, K. M., STENHOUSE, C., WU, G., & BAZER, F. W. Arginine, agmatine, and polyamines: key regulators of conceptus development in mammals. *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in Gene Expression, Metabolic Regulation, and Exercising Performance*, p. 85-105, 2021.

HAN, S. W., & SHIN, J. S. Aromatic L-amino acid decarboxylases:

mechanistic features and microbial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 106(12), p. 4445-4458, 2022.

HASAN, M. M. *et al.* Spermine: its emerging role in regulating drought stress responses in plants. *Cells*, v. 10, n. 2, p. 261, 2021.

HASSANSHAHI, A. *et al.* Perspectives on agmatine neurotransmission in acute and chronic stress-related conditions. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 15, p. 1560-1574, 2023.

HEBY, O. Polyamines and cell differentiation. In: *The Physiology of Polyamines*, Volume I. CRC Press, 2021. p. 83-94.

HENNING, R. J. Obesity and obesity-induced inflammatory disease contribute to atherosclerosis: a review of the pathophysiology and treatment of obesity. *American journal of cardiovascular disease*, v. 11, n. 4, p. 504, 2021.

HENNING, T., & WEBER, D. Redox biomarkers in dietary interventions and nutritional observation studies-From new insights to old problems. *Redox Biology*, v. 41, p. 101922, 2021.

HERRADA, A. A. *et al.* Adipose tissue macrophages as a therapeutic target in obesity-associated diseases. *Obesity Reviews*, v. 22, n. 6, p. e13200, jun. 2021.

HIGGINS, M. R., IZADI, A., & KAVIANI, M. Antioxidants and exercise performance: with a focus on vitamin E and C supplementation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17(22), p. 8452, 2020.

HO, H. J.; SHIRAKAWA, H. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Cells*, v. 12, n. 1, p. 88, 25 dez. 2022.

HOLBERT, C. E., *et al.* Polyamines in cancer: Integrating organismal metabolism and antitumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, v. 22(8), p. 467-480, 2022.

HOSSEIN MALEKI, M., *et al.* Evaluating the potential of phytochemicals as natural substitute for synthetic antioxidant: a review. *Asian Journal of*

Research in Biochemistry, v. 10(1), p. 36-62, 2022.

HUANG, P., *et al.* Putrescine accelerates the differentiation of bone marrow derived dendritic cells via inhibiting phosphorylation of STAT3 at Tyr705. *International Immunopharmacology*, v. 116, p. 109739, 2023.

HUGHES, W. E., BEYER, A. M., & GUTTERMAN, D. D. Vascular autophagy in health and disease. *Basic Research in Cardiology*, v. 115(4), p. 41, 2020.

HYVÖNEN, M. T. *et al.* Hydroxylamine analogue of agmatine: Magic bullet for arginine decarboxylase. *Biomolecules*, v. 10, n. 3, p. 406, 2020.

ISLAM, M. A. *et al.* Putrescine, spermidine, and spermine play distinct roles in rice salt tolerance. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 19, n. 3, p. 643-655, 2020.

ISLAM, M. J., *et al.* Exogenous putrescine attenuates the negative impact of drought stress by modulating physio-biochemical traits and gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris L.*). *PloS One*, v. 17(1), p. e0262099, 2022.

JAGANNATHAN, R., *et al.* Global updates on cardiovascular disease mortality trends and attribution of traditional risk factors. *Current diabetes reports*, v. 19, p. 1-12, 2019.

JAQUES, E. The life and behavior of living organisms: A general theory. *Bloomsbury Publishing USA*, 2001.

JARJOUR, M., *et al.* Care gaps in adherence to heart failure guidelines: clinical inertia or physiological limitations?. *Heart Failure*, v. 8(9), p. 725-738, 2020.

JAUD, M. *et al.* Translational regulations in response to endoplasmic reticulum stress in cancers. *Cells*, v. 9, n. 3, p. 540, 26 fev. 2020.

JENA, A. B., *et al.* Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 162, p. 114606, 2023.

JOHNSON, V. R., *et al.* Food as medicine for obesity treatment and management. *Clinical therapeutics*, v. 44(5), p. 671-681, 2022.

JOMOVA, K., *et al.* Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress,

and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Archives of toxicology*, v. 97(10), p. 2499-2574, 2023.

JONES, L. A., *et al.* The ever-changing roles of serotonin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 125, p. 105776, 2020.

JRAGH, D., *et al.* Vasodilator Effect of Trace Amines, 3-Iodothyronamine, and RO5263397 in the Rat Perfused Kidney: Comparison with Tryptamine. *Pharmacology*, v. 108(4), p. 368-378, 2023.

JUAN, C. A., *et al.* The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International journal of molecular sciences*, v. 22(9), p. 4642, 2021.

JUNG, B. C., & KANG, S. Epigenetic regulation of inflammatory factors in adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1866(11), p. 159019, 2021.

JUNG, H. N.; JUNG, C. H. The role of anti-inflammatory adipokines in cardiometabolic disorders: Moving beyond adiponectin. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 24, p. 13529, 16 dez. 2021.

KALINICHENKO, L. S. *et al.* Serotonin Signaling through Lipid Membranes. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 15, n. 7, p. 1298-1320, 2024.

KAMIYA, K., *et al.* Multidisciplinary cardiac rehabilitation and long-term prognosis in patients with heart failure. *Circulation: Heart Failure*, v. 13(10), p. e006798, 2020

KANOVA, M.; KOHOUT, P. Serotonin—Its synthesis and roles in the healthy and the critically ill. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 9, p. 4837, 2021.

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 320, n. 3, p. C375-91, 1 mar. 2021.

KHALID, M. *et al.* Insulin signal transduction perturbations in insulin

resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 16, p. 8590, 10 ago. 2021.

KHORAMIPOUR, K. *et al.* Adiponectin: Structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition. *Nutrients*, v. 13, n. 4, p. 1180, 2 abr. 2021.

KIERNAN, K.; MACIVER, N. J. The role of the adipokine leptin in immune cell function in health and disease. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 622468, 29 jan. 2021.

KIMBEL, W. H. THE ORIGIN OF HOMO. In *The First Humans—Origin and Early Evolution of the Genus Homo: Contributions from the Third Stony Brook Human Evolution Symposium and Workshop October 3–October 7, 2006* (pp. 31-37). *Springer Netherlands*, 2009.

KINGSTON, J. D. Shifting adaptive landscapes: progress and challenges in reconstructing early hominid environments. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, v. 134(S45), p. 20-58, 2007.

KIRICHENKO, T. V. *et al.* The role of adipokines in inflammatory mechanisms of obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 23, p. 14982, 29 nov. 2022.

KNAUS, U. G. Oxidants in physiological processes. *Reactive oxygen species: Network pharmacology and therapeutic applications*, p. 27-47, 2021.

KO, K. H. Origins of human intelligence: The chain of tool-making and brain evolution. *Anthropological Notebooks*, 22(1), 2016.

KOJTA, I., CHACIŃSKA, M., & BŁACHNIO-ZABIELSKA, A. Obesity, bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance. *Nutrients*, 12(5), 1305, 2020.

KORAC, B., *et al.* Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Redox Biology*, v. 42, p. 101887, 2021.

KUCZYŃSKA, M., JAKUBEK, P., & BARTOSZEK, A. More than just antioxidants: Redox-active components and mechanisms shaping redox

- signalling network. *Antioxidants*, v. 11(12), p. 2403, 2022.
- KWAIFA, I. K. *et al.*. Endothelial dysfunction in obesity-induced inflammation: molecular mechanisms and clinical implications. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, p. 291, 2020.
- LAM, P. L., *et al.* The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. *Chemico-Biological Interactions*, v. 320, p. 109023, 2020.
- LAMIQUIZ-MONEO, I., *et al.* Effect of bergamot on lipid profile in humans: A systematic review. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 60(18), p. 3133-3143, 2020.
- LEMIEUX, I., & DESPRÉS, J. P. Metabolic syndrome: past, present and future. *Nutrients*, v. 12(11), p. 3501, 2020.
- LEMMER, I. L., *et al.* A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Molecular metabolism*, v. 47, p. 101169, 1 maio 2021.
- LI, D., *et al.* Novel histone post-translational modifications in diabetes and complications of diabetes: the underlying mechanisms and implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 156, p. 113984, 2022.
- LI, Y. E.; REN, J. Association between obstructive sleep apnea and cardiovascular diseases: OSA and CVD risk. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 54, n. 7, p. 882, 2022.
- LIANG, X., *et al.* Highly efficient biosynthesis of spermidine from L-homoserine and putrescine using an engineered *Escherichia coli* with NADPH self-sufficient system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 106(17), p. 5479-5493, 2022.
- LIEBERMAN, D. E. Human locomotion and heat loss: an evolutionary perspective. *Comprehensive Physiology*, v. 5(1), p. 99-117. 2011.
- LIEBERMAN, D. Exercised: The science of physical activity, rest and health. *Penguin UK*, 2020.
- LIMA, A., *et al.* Thermal tolerance role of novel polyamine, caldopentamine, identified in fifth instar *Bombyx mori*. *Amino Acids*, v.

55(2), p. 287-298, 2023.

LIMBERG, J. K.; SOARES, R. N.; PADILLA, J. Role of the Autonomic Nervous System in the Hemodynamic Response to Hyperinsulinemia—Implications for Obesity and Insulin Resistance. *Current diabetes reports*, v. 22, n. 4, p. 169-175, 2022.

LIU, L., *et al.* The role and research progress of the balance and interaction between regulatory T cells and other immune cells in obesity with insulin resistance. *Adipocyte*, v. 10(1), p. 66-79, 2021.

LIU, N., *et al.* The mechanism of secretion and metabolism of gut-derived 5-hydroxytryptamine. *International journal of molecular sciences*, v. 22(15), p. 7931, 2021.

LIU, Q. *et al.* Impact of H3 receptor antagonists on neuroinflammation and oxidative stress in Parkinson's disease models. *Journal of Neuroinflammation*, v. 18, n. 1, p. 1-19, 2021.

LIU, Y. *et al.* Development of an integrated process for the production of high-purity cadaverine from lysine decarboxylase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 95, n. 5, p. 1542-1549, 2020.

LOPASCHUK, G. D., *et al.* Cardiac energy metabolism in heart failure. *Circulation research*, v. 128(10), p. 1487-1513, 2021.

LU, J., *et al.* Adaptive response of triploid Fujian oyster (*Crassostrea angulata*) to nanoplastic stress: Insights from physiological, metabolomic, and microbial community analyses. *Chemosphere*, p. 140027, 2023.

LUENGO, J. M.; OLIVERA, E. R. Catabolism of biogenic amines in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, v. 22, n. 4, p. 1174-1192, 2020.

LUO, L.; LIU, M. Adiponectin: Friend or foe in obesity and inflammation. *Medical Review*, v. 2, n. 4, p. 349-62, 26 ago. 2022.

LUO, Y., & LIN, H. Inflammation initiates a vicious cycle between obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Immunity, Inflammation and Disease*, v. 9(1), p. 59-73, 2021.

MACDOUGALL, K. B.; FALCONER, T. M.; MACINTOSH, B. R. Efficiency

of cycling exercise: Quantification, mechanisms, and misunderstandings. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, v. 32, n. 6, p. 951-70, jun. 2022.

MADDOX, T. M., *et al.* 2021 update to the 2017 ACC expert consensus decision pathway for optimization of heart failure treatment: answers to 10 pivotal issues about heart failure with reduced ejection fraction: a report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 77(6), p. 772-810, 2021

MAESHIMA, K., IIDA, S., & TAMURA, S. Physical nature of chromatin in the nucleus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 13(5), p. a040675, 2021.

MAIUOLO, J., *et al.* Effects of bergamot polyphenols on mitochondrial dysfunction and sarcoplasmic reticulum stress in diabetic cardiomyopathy. *Nutrients*, v. 13(7), p. 2476, 2021.

MAIUOLO, J., *et al.* The employment of genera *Vaccinium*, *Citrus*, *Olea*, and *Cynara* polyphenols for the reduction of selected anti-cancer drug side effects. *Nutrients*, v. 14(8), p. 1574, 2022.

MALEKI, S. J., CRESPO, J. F., & CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, v. 299, p. 125124, 2019.

MALEKMOHAMMAD, K.; BEZSONOV, E. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Role of lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis: focus on molecular and cellular mechanisms. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 8, p. 707529, 6 set. 2021.

MALINA, R. M., BOUCHARD, C., & BAR-OR, O. Growth, maturation, and physical activity. *Human kinetics*, 2004.

MAN, A. W., *et al.* Dietary supplements and vascular function in hypertensive disorders of pregnancy. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, p. 1-17, 2023.

MARLOWE, F. W. Hunter-gatherers and human evolution. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews: Issues, News, and Reviews*, v. 14(2), p. 54-67, 2005.

- MARTIN-MARTIN, I., *et al.* Biochemical characterization of AeD7L2 and its physiological relevance in blood feeding in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*. *The FEBS journal*, v. 288(6), p. 2014-2029, 2021.
- MAS-BARGUES, C., *et al.* Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 709, p. 108941, 2021.
- MATEI, D., *et al.* The endocannabinoid system and physical exercise. *International journal of molecular sciences*, v. 24(3), p. 1989, 2023.
- MATURANA, P. *et al.* Crystal structure of Escherichia coli agmatinase: Catalytic mechanism and residues relevant for substrate specificity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 9, p. 4769, 2021.
- MAURYA, R.; NAMDEO, M. Superoxide dismutase: A key enzyme for the survival of intracellular pathogens in host. *Reactive Oxygen Species*, 14 out, 2021.
- MCMICHAEL, A. J., *et al.* Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The lancet*, v. 370(9594), p. 1253-1263, 2007.
- MENIKDIWELA, K. R., *et al.* Mechanisms linking endoplasmic reticulum (ER) stress and microRNAs to adipose tissue dysfunction in obesity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 56(5), p. 455-481, 2021.
- MENZEL, A., *et al.* Common and novel markers for measuring inflammation and oxidative stress ex vivo in research and clinical practice—which to use regarding disease outcomes?. *Antioxidants*, v. 10(3), p. 414, 2021
- MERRITT, J. L., *et al.* Clinical manifestations and management of fatty acid oxidation disorders. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 21, p. 479-493, 2020.
- MICHAILIDOU, Z.; GOMEZ-SALAZAR, M.; ALEXAKI, V. I. Innate immune cells in the adipose tissue in health and metabolic disease. *Journal of Innate Immunity*, v. 14, n. 1, p. 4-30, 3 jan. 2022.

- MOADAB, F., KHORRAMDELAZAD, H., & ABBASIFARD, M. Role of CCL2/CCR2 axis in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Life Sciences*, v. 269, p. 119034, 2021.
- MOCCIARO, G.; GASTALDELLI, A. Obesity-related insulin resistance: the central role of adipose tissue dysfunction. In: From Obesity to Diabetes. Cham: *Springer International Publishing*, 2022. p. 145-164.
- MOGHADDAM, R. H., *et al.* Naringenin and naringin in cardiovascular disease prevention: A preclinical review. *European Journal of Pharmacology*, v. 887, p. 173535, 2020.
- MORAIS, J. B. S., *et al.* Adipose tissue dysfunction: impact on metabolic changes?. *Hormone and Metabolic Research*, v. 54(12), p. 785-794, 2022.
- MORIGNY, P., *et al.* Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 17(5), p. 276-295, 2021.
- MORIGUCHI, T.; TAKAI, J. Histamine and histidine decarboxylase: Immunomodulatory functions and regulatory mechanisms. *Genes to Cells*, v. 25, n. 7, p. 443-449, 2020.
- MULTARI, S., *et al.* Monitoring the changes in phenolic compounds and carotenoids occurring during fruit development in the tissues of four citrus fruits. *Food Research International*, v. 134, p. 109228, 2020.
- MURALA, S., THAKKAR, M. M., & BOLLU, P. C. Histamine. In *Neurochemistry in Clinical Practice* (pp. 133-147). Cham: *Springer International Publishing*. 2022.
- MURAWSKA-CIAŁOWICZ, E., *et al.* BDNF impact on biological markers of depression—role of physical exercise and training. *International journal of environmental research and public health*, v. 18(14), p. 7553, 2021.
- NAJJAR, S. A., HUNG, L. Y., & MARGOLIS, K. G. Serotonergic Control of Gastrointestinal Development, Motility, and Inflammation. *Comprehensive Physiology*, v. 13(3), p. 4851, 2023.

- NEGRI, S. *et al.* The case of tryptamine and serotonin in plants: a mysterious precursor for an illustrious metabolite. *Journal of Experimental Botany*, v. 72, n. 15, p. 5336-5355, 2021.
- NEUMANN, J., *et al.* Cardiac roles of serotonin (5-HT) and 5-HT-receptors in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24(5), p. 4765, 2023.
- NEUMANN, J., *et al.* The roles of cardiovascular H₂-histamine receptors under normal and pathophysiological conditions. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 732842, 2021.
- NGUYEN, S. M. T., *et al.* Mechanisms governing anaphylaxis: inflammatory cells, mediators, endothelial gap junctions and beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22(15), p. 7785, 2021.
- NI, Y. Q., & LIU, Y. S. New insights into the roles and mechanisms of spermidine in aging and age-related diseases. *Aging and disease*, v. 12(8), p. 1948, 2021.
- NILSSON, R., & LIU, N. A. Nuclear DNA damages generated by reactive oxygen molecules (ROS) under oxidative stress and their relevance to human cancers, including ionizing radiation-induced neoplasia part I: physical, chemical and molecular biology aspects. *Radiation Medicine and Protection*, v. 1(3), p. 140-152, 2020.
- NORGAN, N. G. The beneficial effects of body fat and adipose tissue in humans. *International journal of obesity*, v. 21(9), p. 738-746, 1997.
- OBRADOVIC, M. *et al.* Leptin and obesity: role and clinical implication. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 585887, 18 maio 2021.
- OH, C.M., *et al.* Mitochondrial quality control in the heart: new drug targets for cardiovascular disease. *Korean Circulation Journal*, v. 50(5), p. 395-405, 2020.
- ÖZOGUL, Y., & ÖZOGUL, F. Biogenic amines formation, toxicity, regulations in food. *Biogenic amines in food: Analysis, occurrence and toxicity*, p. 1-17, 2019.
- PACINELLA, G., CIACCIO, A. M., & TUTTOLOMONDO, A. Endothelial

dysfunction and chronic inflammation: the cornerstones of vascular alterations in age-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23(24), p. 15722, 2022.

PAESLACK, N., *et al.* Microbiota-derived tryptophan metabolites in vascular inflammation and cardiovascular disease. *Amino Acids*, v. 54(10), p. 1339-1356, 2022

PÁEZ ESTEBAN, A. N., *et al.* Direct and indirect costs of caring for patients with chronic non-communicable diseases. *Aquichan*, v. 20(2), 2020.

PAHLAVANI, H. A. Possible role of exercise therapy on depression: effector neurotransmitters as key players. *Behavioural brain research*, v. 114791, 2023.

PANIC, A., *et al.* Oxidative stress in obesity and insulin resistance. *Exploration of Medicine*, v. 3(1), p. 58-70, 2022

PANULA, P. Histamine receptors, agonists, and antagonists in health and disease. *Handbook of Clinical Neurology*, v. 180, p. 377-387, 2021.

PARK, C. S., & SHASTRI, N. The role of T cells in obesity-associated inflammation and metabolic disease. *Immune Network*, v. 22(1), 2022.

PARK, I. H., & KIM, M. M. Spermidine inhibits MMP-2 via modulation of histone acetyltransferase and histone deacetylase in HDFs. *International journal of biological macromolecules*, v. 51(5), p. 1003-1007, 2012.

PARK, J. H., *et al.* Sedentary lifestyle: overview of updated evidence of potential health risks. *Korean journal of family medicine*, v. 41(6), p. 365, 2020.

PARK, S. S.; SEO, Y. K. Excess accumulation of lipid impairs insulin sensitivity in skeletal muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 6, p. 1949, 12 mar. 2020.

PARKER, C. H., *et al.* The pyrophilic primate hypothesis. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, v. 25(2), p. 54-63, 2016.

PARKHITKO, A. A., *et al.* Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging*

cell, v. 18(6), p. e13034, 2019.

PASCHOU, S. A., *et al.* Thyroid disorders and cardiovascular manifestations: an update. *Endocrine*, v. 75(3), p. 672-683, 2022.

PEI, J., *et al.* Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation. *Frontiers in pharmacology*, v. 14, p. 1147414, 2023.

PÉREZ-TORRES, I., *et al.* Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity. *International journal of molecular sciences*, v. 22(4), p. 1786, 2021.

PIACENZA, L., *et al.* The superoxide radical switch in the biology of nitric oxide and peroxynitrite. *Physiological Reviews*, v. 102(4), p. 1881-1906, 2022.

PICHÉ, M. E., TCHERNOF, A., & DESPRÉS, J. P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases. *Circulation research*, v. 126(11), p. 1477-1500, 2020.

PODKOWIŃSKA, A., & FORMANOWICZ, D. Chronic kidney disease as oxidative stress-and inflammatory-mediated cardiovascular disease. *Antioxidants*, v. 9(8), p. 752, 2020.

POETSCH, M. S.; STRANO, A.; GUAN, K. Role of leptin in cardiovascular diseases. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, p. 354, 16 jun. 2020.

PONTZER, H., WOOD, B. M., & RAICHLEN, D. A. Hunter-gatherers as models in public health. *Obesity Reviews*, v. 19, p. 24-35, 2018.

POPOVIC, D., *et al.* Defining the importance of stress reduction in managing cardiovascular disease-the role of exercise. *Progress in cardiovascular diseases*, v. 70, p. 84-93, 2022.

POWELL-WILEY, T. M., *et al.* Obesity and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, v. 143(21), p. e984-e1010, 2021.

PRADO, A. F., *et al.* Matrix metalloproteinases and arterial hypertension: role of oxidative stress and nitric oxide in vascular functional and structural alterations. *Biomolecules*, v. 11(4), p. 585, 2021.

- PRANDI, F. R., *et al.* Mechanisms of cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy: molecular abnormalities and phenotypical variants. *Heart Failure Reviews*, v. 28(3), p. 597-606, 2023.
- PRASUN, P. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 10, p. 165838, 1 out. 2020.
- PRESCOTT, J. A., MITCHELL, J. P., & COOK, S. J. Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease. *Biochemical Journal*, v. 478(13), p. 2619-2664, 2021.
- PRETI, R., BERNACCHIA, R., & VINCI, G. Chemometric evaluation of biogenic amines in commercial fruit juices. *European Food Research and Technology*, v. 242, p. 2031-2039, 2016.
- QIAO, C., *et al.* Functional characterization of a catalytically promiscuous tryptophan decarboxylase from camptothecin-producing *Camptotheca acuminata*. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, p. 987348, 2022.
- RABADIA, J. P., *et al.* Cardiovascular System, Its Functions and Disorders. In *Cardioprotective Plants* (pp. 1-34). *Singapore: Springer Nature Singapore*, 2024.
- RAMAZI, S., ALLAHVERDI, A., & ZAHIRI, J. Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. *Journal of biosciences*, v. 45(1), p. 135, 2020.
- RAMOS-LOPEZ, O. *et al.* Epigenetic signatures underlying inflammation: An interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflammation Research*, v. 70, p. 29-49, jan. 2021.
- RAMOS-MOLINA, A., GARCÍA-MARTÍNEZ, M., & LÓPEZ-MIRANDA, J. M. Biogenic amines in cardiovascular disease: Potential role in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 48, p. 1-10, 2019.
- REN, J., & XIAO, H. Exercise for mental well-being: exploring Neurobiological

- advances and intervention effects in depression. *Life*, v. 13(7), p. 1505, 2023.
- REN, J., *et al.* Obesity cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Physiological reviews*, v. 101(4), p. 1745-1807, 2021.
- REN, Y. *et al.* Adipokines, hepatokines and myokines: focus on their role and molecular mechanisms in adipose tissue inflammation. *Frontiers in Endocrinology*, v. 13, p. 873699, 14 jul. 2022.
- RICHARD, A. J., *et al.* Adipose tissue: physiology to metabolic dysfunction. *Endotext* [Internet], 2020.
- RIUS-PÉREZ, S., *et al.* Nuclear factor kappa B signaling complexes in acute inflammation. *Antioxidants & redox signaling*, v. 33(3), p. 145-165, 2020.
- RUDRA, S. G., *et al.* Food industry waste: mine of nutraceuticals. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 4(1), p. 205-229, 2015.
- RUSSO, C., *et al.* Bergamot Byproducts: A Sustainable Source to Counteract Inflammation. *Nutrients*, v. 16(2), p. 259, 2024.
- RUSSO, P., *et al.* Microorganisms able to produce biogenic amines and factors affecting their activity. 2019.
- SAGAR, N. A. *et al.* Polyamines: functions, metabolism, and role in human disease management. *Medical Sciences*, v. 9, n. 2, p. 44, 2021.
- SAHEERA, S., *et al.* Histamine 2 receptors in cardiovascular biology: A friend for the heart. *Drug discovery today*, v. 27(1), p. 234-245, 2022.
- SAINI, R. K. *et al.* Bioactive compounds of citrus fruits: A review of composition and health benefits of carotenoids, flavonoids, limonoids, and terpenes. *Antioxidants*, v. 11(2), p. 239, 2022.
- SALEHI, B., *et al.* Hesperetin's health potential: Moving from preclinical to clinical evidence and bioavailability issues, to upcoming strategies to overcome current limitations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 62(16), p. 4449-4464, 2022.
- SALZANO, G. *et al.* Obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome:

- relationship with obesity and management in obese patients. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, v. 41, n. 2, p. 120, 2021.
- SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F., *et al.* Polyamines in mammalian pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 76(20), p. 3987-4008, 2019.
- SARASA, S. B., *et al.* A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): its production and role in microbes. *Current microbiology*, v. 77, p. 534-544, 2020.
- SARIKAYA, E., & DOĞAN, S. Glutathione peroxidase in health and diseases. Glutathione system and oxidative stress in health and disease, v. 49, 2020.
- SARITHA, S. Factors associated with adherence to guideline-directed treatment among heart failure patients in Kerala (Doctoral dissertation, SCTIMST), 2021.
- SARKAR, P., *et al.* Structure, dynamics and lipid interactions of serotonin receptors: excitements and challenges. *Biophysical reviews*, v. 13, p. 101-122, 2021.
- SCANES, C. G. Carbohydrate metabolism. In *Sturkie's avian physiology* (pp. 613-645). *Academic Press*, 2022.
- SCHICK, K. D., & TOTH, N. P. Making silent stones speak: Human evolution and the dawn of technology. *Simon and Schuster*, 1994.
- SCHWÄRZLER, J. *et al.* The pathophysiology of MASLD: an immunometabolic perspective. *Expert review of clinical immunology*, v. 20, n. 4, p. 375-86, 2 abr. 2024.
- SCIOLI, M. G., *et al.* Oxidative stress and new pathogenetic mechanisms in endothelial dysfunction: potential diagnostic biomarkers and therapeutic targets. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9(6), p. 1995, 2020.
- SEJBUK, M., MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I., & WITKOWSKA, A. M. Sleep quality: a narrative review on nutrition, stimulants, and physical activity as important factors. *Nutrients*, v. 14(9), p. 1912, 2022.
- SELLERS, W. I., *et al.* Stride lengths, speed and energy costs in walking of *Australopithecus afarensis*: using evolutionary robotics to predict locomotion

of early human ancestors, 2005.

SEVERINO, P., *et al.* Ischemic heart disease and heart failure: role of coronary ion channels. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21(9), p. 3167, 2020.

SHAH, W. *et al.* Obesity prevalence factors associated with sympathetic overactivity and hypertension. *Neurology and Clinical Neuroscience*, v. 11, n. 6, p. 310-315, 2023.

SHAITO, A., *et al.* Oxidative stress-induced endothelial dysfunction in cardiovascular diseases, 2022.

SHAO, C., *et al.* Coronary artery disease: from mechanism to clinical practice. *Coronary Artery Disease: Therapeutics and Drug Discovery*, p. 1-36, 2020.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Frontiers in physiology*, v. 11, p. 694, 2 jul. 2020.

SHARMEEN, J. B., *et al.* Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules*, v. 26(3), p. 666, 2021.

SHARP, T. & BARNES, N. M. Central 5-HT receptors and their function; present and future. *Neuropharmacology*, v. 177, p. 108155, 2020.

SHIN, J. H. *et al.* Adipokine human Resistin promotes obesity-associated inflammatory intervertebral disc degeneration via pro-inflammatory cytokine cascade activation. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 8936, 27 maio 2022.

SHIRAKAWA, K., & SANO, M. T cell immunosenescence in aging, obesity, and cardiovascular disease. *Cells*, v. 10(9), p. 2435, 2021.

SHOMAN, Y., *et al.* Reference ranges of 8-isoprostane concentrations in exhaled breath condensate (EBC): a systematic review and meta-analysis. *International journal of molecular sciences*, v. 21(11), p. 3822, 2020.

SIEPMANN, M., *et al.* Heart rate variability: a measure of cardiovascular

health and possible therapeutic target in dysautonomic mental and neurological disorders. *Applied Psychophysiology and Biofeedback*, v. 47(4), p. 273-287, 2022.

SINGH, S.; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *International Immunopharmacology*, v. 101, p. 107598, 1 dez. 2021.

SMOLINSKA, S., *et al.* Histamine: a mediator of intestinal disorders—a review. *Metabolites*, v. 12(10), p. 895, 2022.

SOBHANI, M., *et al.* Immunomodulatory; anti-inflammatory/antioxidant effects of polyphenols: a comparative review on the parental compounds and their metabolites. *Food Reviews International*, v. 37(8), p. 759-811, 2021.

SOKAL-DEMBOWSKA, A., *et al.* Can Nutraceuticals Support the Treatment of MASLD/MASH, and thus Affect the Process of Liver Fibrosis?. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 10, p. 5238, 11 maio 2024.

SOSLAU, G. Cardiovascular serotonergic system: Evolution, receptors, transporter, and function. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, v. 337(2), p. 115-127, 2022.

STADLER, J. T.; MARSCHE, G. Obesity-related changes in high-density lipoprotein metabolism and function. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 23, p. 8985, 2020.

STERELNY, K. From hominins to humans: how sapiens became behaviourally modern. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 366(1566), p. 809-822, 2011.

STOLARSKA, E., *et al.* Polyamines as Universal Bioregulators across Kingdoms and Their role in Cellular Longevity and Death. *Critical Reviews in Plant Sciences*, p. 1-21, 2023.

STRINGER, C. The origin and evolution of Homo sapiens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 371(1698), p. 20150237, 2016.

SU, J., *et al.* Luteolin ameliorates hypertensive vascular remodeling through inhibiting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015(1), p. 364876, 2015.

SUAREZ-ROCA, H., *et al.* Baroreceptor modulation of the cardiovascular system, pain, consciousness, and cognition. *Comprehensive Physiology*, v. 11(2), p. 1373, 2021.

SUEN, J., *et al.* Effect of student-led health interventions on patient outcomes for those with cardiovascular disease or cardiovascular disease risk factors: a systematic review. *BMC Cardiovascular Disorders*, v. 20, p. 1-10, 2020.

SUSSER, L. I., & RAYNER, K. J. Through the layers: How macrophages drive atherosclerosis across the vessel wall. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 132(9), 2022.

ŚWIĄTKIEWICZ, I., *et al.* The role of oxidative stress enhanced by adiposity in cardiometabolic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24(7), p. 6382, 2023.

SZUKIEWICZ, D. CX3CL1 (Fractalkine)-CX3CR1 Axis in Inflammation-Induced Angiogenesis and Tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*, v. 25(9), p. 4679, 2024.

SZUKIEWICZ, D. Molecular mechanisms for the vicious cycle between insulin resistance and the inflammatory response in obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24(12), p. 9818, 2023.

TABAS, I., & BORNFELDT, K. E. Intracellular and intercellular aspects of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Circulation research*, v. 126(9), p. 1209-1227, 2020.

TAHERKHANI, S.; SUZUKI, K.; RUHEE, R. T. A brief overview of oxidative stress in adipose tissue with a therapeutic approach to taking antioxidant supplements. *Antioxidants*, v. 10, n. 4, p. 594, 13 abr. 2021.

TALLIS, J.; *et al.* Age-related skeletal muscle dysfunction is aggravated by obesity: an investigation of contractile function, implications and

- treatment. *Biomolecules*, v. 11, n. 3, p. 372, 2 mar. 2021.
- TANAKA, M. Improving obesity and blood pressure. *Hypertension Research*, v. 43, n. 2, p. 79-89, 2020.
- TANG, G., *et al.* Spermidine is critical for growth, development, environmental adaptation, and virulence in *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 765398, 2021.
- THEOFILIS, P. *et al.* Inflammatory mechanisms contributing to endothelial dysfunction. *Biomedicines*, v. 9, n. 7, p. 781, 2021.
- TOKGOZOGLU, L., *et al.* Diet, lifestyle, smoking. *Prevention and Treatment of Atherosclerosis: Improving State-of-the-Art Management and Search for Novel Targets*, p. 3-24, 2020.
- TRIPOSKIADIS, F., *et al.* Pathogenesis of chronic heart failure: cardiovascular aging, risk factors, comorbidities, and disease modifiers. *Heart failure reviews*, v. 27(1), p. 337-344, 2022.
- TSIGALOU, C., *et al.* Interplay between mediterranean diet and gut microbiota in the interface of autoimmunity: an overview. 2020.
- UDELSON, J. E., & STEVENSON, L. W. The future of heart failure diagnosis, therapy, and management. *Circulation*, v. 133(25), p. 2671-2686, 2016.
- UN NISA, K.; REZA, M. I. Key relevance of epigenetic programming of adiponectin gene in pathogenesis of metabolic disorders. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, v. 20, n. 4, p. 506-17, 1 maio 2020.
- URBANIAK, S. K., *et al.* 8-Oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a potential biomarker for gestational diabetes mellitus (GDM) development. *Molecules*, v. 25(1), p. 202, 2020.
- VAIRETTI, M. *et al.* Changes in glutathione content in liver diseases: an update. *Antioxidants*, v. 10, n. 3, p. 364, 28 fev. 2021.
- VALENSI, P. Autonomic nervous system activity changes in patients with

hypertension and overweight: role and therapeutic implications.

Cardiovascular diabetology, v. 20, n. 1, p. 170, 2021.

VALUSSI, M., et al. Bergamot oil: Botany, production, pharmacology.

Encyclopedia, v. 1(1), p. 152-176, 2021.

VANZAN, L., et al. Mechanisms of histone modifications. *In Handbook of epigenetics* (pp. 27-54). Academic Press, 2023.

VARRA, F. N. et al. Molecular and pathophysiological relationship between obesity and chronic inflammation in the manifestation of metabolic dysfunctions and their inflammation-mediating treatment options. *Molecular Medicine Reports*, v. 29, n. 6, p. 1-27, 1 jun. 2024.

WANG, F.; et al. Effects of exercise-induced ROS on the pathophysiological functions of skeletal muscle. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2021, n. 1, p. 3846122, 2021.

WANG, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, Y. Inflammatory and immune responses in metabolic syndrome: Mechanisms and therapeutic targets. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 18, n. 9, p. 1-15, 2022.

WANG, S., et al. The Research Progress of Vascular Aging Related Diseases. *Journal of Innovations in Medical Research*, v. 2(6), p. 36-44, 2023.

WANG, Y. et al. Advances in the microbial synthesis of the neurotransmitter serotonin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 107, n. 15, p. 4717-4725, 2023.

WARD, C. V. Interpreting the posture and locomotion of *Australopithecus afarensis*: where do we stand?. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, v. 119(S35), p. 185-215, 2002.

WARE, W. A., BONAGURA, J. D., & SCANSEN, B. A. The normal cardiovascular system. *In Cardiovascular Disease in Companion Animals* (pp. 3-32). CRC Press. 2021.

WASILEWSKA, N.; LEBENSZTEJN, D. Non-alcoholic fatty liver disease and lipotoxicity. *Clinical and Experimental Hepatology*, v. 7, n. 1, p. 1-6,

25 mar. 2021.

WEI, Z. *et al.* Effects of Spermidine on Cell Proliferation, Migration, and Inflammatory Response in Porcine Enterocytes. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, v. 27, n. 6, 2022.

WHITE-WILLIAMS, C., *et al.* Addressing social determinants of health in the care of patients with heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, v. 141(22), p. e841-e863, 2020.

WIEROŃSKA, J. M., CIEŚLIK, P., & KALINOWSKI, L. Nitric oxide-dependent pathways as critical factors in the consequences and recovery after brain ischemic hypoxia. *Biomolecules*, v. 11(8), p. 1097, 2021.

WISOR, M. R. Determination of biogenic amines in decomposition odor using gas chromatography mass spectrometry. *Western Carolina University*, 2021.

WOLAK, T., *et al.* Effect of tomato nutrient complex on blood pressure: A double blind, randomized dose–response study. *Nutrients*, v. 11(5), p. 950, 2019.

WRANGHAM, R. W., & CARMODY, R. N. Human adaptation to the control of fire. *Evolutionary Anthropology*, 2010

WROŃSKI, A., & WÓJCIK, P. Impact of ROS-dependent lipid metabolism on psoriasis pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23(20), p. 12137, 2022.

WU, G., *et al.* Role of L-arginine in nitric oxide synthesis and health in humans. *Amino acids in nutrition and health: Amino acids in gene expression, metabolic regulation, and exercising performance*, p. 167-187, 2021.

WU, H., & BALLANTYNE, C. M. Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity. *Circulation research*, v. 126(11), p. 1549-1564, 2020.

XAVIER, F. E. Nitrergic perivascular innervation in health and diseases: Focus on vascular tone regulation. *Acta Physiologica*, v. 230(1), p. e13484, 2020.

- XU, M., *et al.* Ccr12 deficiency deteriorates obesity and insulin resistance through increasing adipose tissue macrophages infiltration. *Genes & Diseases*, v. 9(2), p. 429-442, 2022.
- YANG, A., & MOTTILLO, E. P. Adipocyte lipolysis: from molecular mechanisms of regulation to disease and therapeutics. *Biochemical Journal*, v. 477(5), p. 985-1008, 2020.
- YE, J. J.; BIAN, X.; LIM, J.; MEDZHITOV, R. Adiponectin and related C1q/TNF-related proteins bind selectively to anionic phospholipids and sphingolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, n. 29, p. 17381-8, 21 jul. 2020.
- YERRA, V. G., & ADVANI, A. Role of CCR2-positive macrophages in pathological ventricular remodelling. *Biomedicines*, v. 10(3), p. 661, 2022.
- YU, J., *et al.* Phenylethanolamine N-methyltransferase in health and diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 15, p. 671899, 2021.
- YUE, J., & LÓPEZ, J. M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *International journal of molecular sciences*, v. 21(7), p. 2346, 2020.
- YUNG, J. H. M., & GIACCA, A. Role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in obesity and type 2 diabetes. *Cells*, v. 9(3), p. 706, 2020.
- ZAHEDI, K.; BARONE, S.; SOLEIMANI, M. Polyamines and their metabolism: from the maintenance of physiological homeostasis to the mediation of disease. *Medical Sciences*, v. 10, n. 3, p. 38, 2022.
- ZARKOVIC, N. Roles and Functions of ROS and RNS in Cellular Physiology and Pathology. *Cells*, v. 9(3), p. 767, 2020.
- ZHANG, D., LI, J., & LI, T. Agmatine mitigates palmitate (PA)-induced mitochondrial and metabolic dysfunction in microvascular endothelial cells. *Human & Experimental Toxicology*, v. 41, p. 09603271221110857, 2022.
- ZHAO, S.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, leptin and cardiovascular disorders. *Circulation research*, v. 128, n. 1, p. 136-49, 8 jan. 2021.
- ZHENG, W., *et al.* Role of endoplasmic reticulum stress in hepatic

glucose and lipid metabolism and therapeutic strategies for metabolic liver disease. *International Immunopharmacology*, v. 113, p. 109458, 2022.

ZHENG, Y., *et al.* Immune aging—A mechanism in autoimmune disease. In *Seminars in immunology* (Vol. 69, p. 101814). *Academic Press*. 2023, September.