



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



Mestrado

**EFEITO MODULATÓRIO DA MIRICETINA SOBRE A
SÍNDROME METABÓLICA E O COMPORTAMENTO DE
CAMUNDONGOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA**

CAIO FERNANDO FERREIRA COELHO

São Luís

2020

CAIO FERNANDO FERREIRA COELHO

**EFEITO MODULATÓRIO DA MIRICETINA SOBRE A
SÍNDROME METABÓLICA E O COMPORTAMENTO DE
CAMUNDONGOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador : Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes
Co-orientador: Dr. Lucas Martins França

São Luís
2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Coelho, Caio Fernando Ferreira.

Efeito modulatório da miricetina sobre a síndrome metabólica e o comportamento de camundongos com obesidade hipotalâmica / Caio Fernando Ferreira Coelho. - 2020.

80 f.

Coorientador(a): Lucas Martins França.

Orientador(a): Antônio Marcus de Andrade Paes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2020.

1. DHGNA. 2. L-glutamato monossódico. 3. Memória. 4. Miricetina. 5. Obesidade. I. França, Lucas Martins. II. Paes, Antônio Marcus de Andrade. III. Título.

CAIO FERNANDO FERREIRA COELHO

**EFEITO MODULATÓRIO DA MIRICETINA SOBRE A
SÍNDROME METABÓLICA E O COMPORTAMENTO DE
CAMUNDONGOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Dra. Cristiane Matté
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Gilberto Sousa Alves
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Profa. Dra. Adalgisa de Souza Paiva Ferreira
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, causa incausável do Universo, soberanamente justo e bom, por ter me posto na seara científica e por fazer de mim pequeno instrumento de saber.

Em segundo lugar, agradeço ao que tenho de base emocional, à minha mãe e ao meu irmão, em primeiro lugar, por estarem sempre comigo, serem sempre ombros para chorar e ouvir. Ao meu irmão, sobretudo, por não me deixar abater por meus próprios planos, e me retirar sempre do pessimismo e da sombra. À minha mãe por ser sempre amor, compreensão, mesmo diante dos dissabores diários de cada um. Agradeço à minha madrastra, que chamo carinhosamente de “pãe”, por ser sempre a pessoa que me ajuda a articular e planejar, por ser sempre esse braço que dá suporte. Agradeço ao meu pai, pois sem ele, nada do que sou ou penso científica e espiritualmente seria possível. Agradeço aos meus dois outros irmãos, aos muitos primos que compõem minha família e tornaram minha infância um júbilo, e agradeço aos avós e tios que estiveram ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador, Professor Marcus Paes, meu “pai científico”, e ao Lucas França, meu co-orientador, “meu irmão mais velho”, que me guiaram desde o segundo período da graduação em Medicina, e tanto reacenderam em mim a chama do saber científico. Agradeço ao professor Bruno, que tanto me incentivou em momentos difíceis de bancada e é um amigo querido, à Nathalee, Samira, Ludmilla, Karla e todos da família Lefisio, pois são aqueles com quem rio na rotina e no lazer. Agradecer em especial a Thamys e Savanna, com quem divido o corpo de mestrandos do Lefisio, que chamamos carinhosamente de “Meninas Superpoderosas”.

Quero agradecer aos meus amigos do colégio e da vida, cujo grupo carinhosamente chamamos de Kabarezal. Ao Nilson, meu amigo de poesia e música, aquele que me faz sair da vida que sozinha não basta. A Juliana Cutrim, a voz mais doce que já ouvi, do canto lírico aos conselhos através de cartas de tarô. Ao Carlos André, sempre atencioso e pronto para socorrer os amigos. Ao Rodrigo e Deysielle, casal que mora em coração, que sempre partilham de momentos únicos nas reuniões de amigos. A Thaís, aquela que conheci por último, mas que sempre está à frente das aventuras que fazemos. Ao Arthur, que divide comigo a mesma gana pela vida acadêmica. A Mariana Reis, a “Mari Vida Ilustrada”, que sempre me encantou e encanta a todos com seu amor e sua luz irradiante. À Otília Ribeiro, que carrega o peso de ser minha Janis Joplin, minha

Florence, minha Lana Del Rey, minha cantora de rock, e também amiga de madrugadas. Aos outros amigos que não foram citados, porque a folha é finita.

Agradeço aos meus amigos do mestrado, Nelmar, Pedro, que dividem comigo um sonho de fazer pesquisa, apesar dos dissabores. Queria deixar um agradecimento especial para Emilly, minha deusa da feirinha, com quem divido os fardos da pós-graduação em desmonte no país.

Agradeço à Capes, FAPEMA e CNPq, por financiarem as atividades do laboratório que componho, o Laboratório de Fisiologia Experimental da Universidade Federal do Maranhão, e nisso inclui-se meu projeto de mestrado. Agradeço, por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por ter me auxiliado e ser porta para galgar caminhos na carreira acadêmica.

“Nós vivemos no esquecimento de nossas metamorfoses
O dia é modorrento mas a noite é ativa
O ar fresco ao meio-dia a noite filtra e o usa
A noite não deixa poeira sobre nós
(...)

Estamos nós perto ou longe de nossa consciência
Ou são nossos limites nossas raízes nosso objetivo

O longo prazer entretanto de nossas metamorfoses
Esqueletos que se animam em muros empoeirados
Os encontros dados às formas insensíveis
À carne ingênua aos cegos videntes
(...)

Nós somos corpo a corpo nós somos terra a terra
Nós nascemos em todo canto nós somos sem limites”
(Paul Éluard, *Notre mouvement*, em *Le dur désir de durer*)

SUMÁRIO

Abreviações

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1.	Introdução	16
2.	Referencial Teórico.....	20
2.1.	Inflamação e resistência insulínica como marcos nas repercussões sistêmicas da obesidade.....	20
2.2	Miricetina: uma estratégia multialvo para uma doença multifatorial?.....	26
2.3	A obesidade induzida por L-glutamato monossódico como modelo de Síndrome Metabólica.....	30
3.	Objetivos.....	34
3.2	Objetivo geral	34
3.3	Objetivos específicos.....	34
4.	<i>ARTIGO: “Myricetin improves metabolic profile but not cognitive deficit associated to hypothalamic obesity in mice</i>	35
4.1	Introduction.....	37
4.2	Methods.....	38
4.2.1	Animals, obesity induction and myricetin treatment.....	38
4.2.2	Open Field Test (OFT).....	39
4.2.3	Elevated Plus Maze (EPM).....	39
4.2.4	Morris Water Maze (MWM).....	39
4.2.5	Histopathology analysis	39
4.2.6	Statistical analysis	40
4.3	Results	40
4.3.1	Myricetin attenuates metabolic syndrome and reverts NAFLD in MSG mice	40
4.3.2	Myricetin improves exploratory behavioral but not cognitive outcomes in MSG mice.....	41
4.4	Discussion.....	41

References.....	45
Figures and legends.....	51
5. Produção científica durante o mestrado.....	52
5.1 Artigos publicados em periódicos durante o mestrado.....	52
5.2 Participação em programas de internacionalização durante o mestrado.....	52
Referências	53
ANEXO A	70
ANEXO B	71
ANEXO C.....	76
ANEXO D.....	77
ANEXO E.....	78
ANEXO F.....	79
ANEXO G.....	80

Abreviações

DA: doença de Alzheimer

DM 2: diabetes *mellitus* tipo 2

DHGNA: Doença Hepática Gordurosa Não-alcoólica

DNL: síntese *de novo* de lipídeos

GH: hormônio do crescimento

GLUT2: transportador de glicose 2

GLUT4: transportador de glicose 4

GLP1: peptídeo semelhante a glucagon 1

IGF-1: fator de crescimento insulina-*like* 1

IL-6: interleucina 6

IRS1: substrato do receptor de insulina 1

JNK: c-Jun quinase

miRNA: micro RNA

MSG: L-glutamato monossódico

MTP: proteína de transferência de triglicerídeos microssômicos

NF- κ B: fator nuclear κ B

NRF2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

PDI: proteína dissulfeto isomerase

POMC: pró-opiomelanocortina

PPAR α : *peroxisome proliferator-activated receptor α*

RE: retículo endoplasmático

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase, quantitativa, em tempo real.

RNA_m: RNA mensageiro

ERO: espécies reativas de oxigênio

SIRT3: sirtuína 3

SM: síndrome metabólica

SREBP1c: fator de transcrição 1c ligante ao elemento regulador de esteroides

TG: triglicerídeo

TNF- α : fator de necrose tumoral α

VLDL: lipoproteínas de muito baixa densidade

XBP1s: proteína 1 de ligação à caixa X *spliced*

Lista de figuras

Introdução:

Figura 1. Compostos polifenóis identificados nas folhas de *Syzygium cumini* e seus mecanismos de ação sobre a Síndrome Metabólica. A miricetina é um dos compostos identificados nas folhas de *S. cumini* e aumenta a expressão de GLUT4, promovendo melhora da sensibilidade à insulina. Quercetina e rutina são secretagogos de insulina, agindo sobre os canais de Ca^{2+} tipo-L. A rutina também diminui a gliconeogênese. Nesse sentido, o ácido gálico, a quercetina e a rutina diminuem a síntese do colesterol por inibição da enzima HMG-CoA redutase hepática. Entretanto, a miricetina é o composto mais prevalente no extrato bruto das folhas de *S. cumini*.19

Referencial teórico:

Figura 1. Obesidade e desenvolvimento de patologias associadas à Síndrome Metabólica. A hipertrofia dos adipócitos no decurso da obesidade promove alteração de perfil de macrófagos residentes para macrófagos M1, que recrutam mais macrófagos. Há, portanto, maior liberação de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α), o que desencadeia resistência insulínica e leva à maior produção de leptina, menor liberação de adiponectina e maior fluxo de ácidos graxos livres na corrente sanguínea. Esta, por sua vez, favorece a entrada destes ácidos graxos em outros tecidos, conseqüente resistência insulínica periférica e advento da diabetes *mellitus* tipo 2. A resistência insulínica hepática e a hiperinsulinemia compensatória induzem maior lipogênese *de novo* e acúmulo de triglicérides nos hepatócitos sob a forma de vacúolos: tem-se a doença hepática gordurosa não-alcoólica.22

Figura 2. Cascata de eventos correlacionando desregulação metabólica periférica a demência. Hiperglicemia e dislipidemia podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo maior fluxo de ácidos graxos livres e produtos de glicosilação no cérebro. Inflamação crônica de baixo grau no cérebro leva a eventos como resistência insulínica cerebral, tornando o cérebro propenso ao déficit cognitivo e à doença de Alzheimer.25

Figura 3. Os flavonoides enquanto terapia multialvo. O conceito contemporâneo do mecanismo de ação de compostos bioativos como os flavonoides contrapõe-se ao conceito “tradicional” do mecanismo de ação de outras drogas. Enquanto drogas tradicionais são desenvolvidas para agir sobre um só alvo, levando à ausência de doença, pelo controle de determinado mecanismo fisiopatológico relacionado a esta, os flavonoides interferem sobre diversos processos patológicos, levando a uma maior habilidade de adaptação. Este processo terapêutico vai de encontro à fisiopatologia da Síndrome Metabólica e da DHGNA, uma vez que vários mecanismos fisiopatológicos contribuem para a progressão da doença.....27

Figura 4. Principais flavonóis encontrados na dieta. A miricetina apresenta maior número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático B.....28

Figura 5. Progressão da DHGNA e da Síndrome Metabólica em camundongos MSG. Os animais com obesidade MSG possuem hiperinsulinemia precoce e desenvolvimento de obesidade central a partir das 8 semanas de vida. Essas modificações estão relacionadas ao aparecimento de esteatose microvesicular a partir da mesma idade. De

fato, depósitos de gordura visceral estão independentemente correlacionados com o Escore de Atividade de DHGNA nesses animais. Ademais, a hipertrigliceridemia do modelo contribui para o acúmulo de TGs nos hepatócitos. Entre 16 e 24 semanas de vida, esses animais apresentam hiperglicemia e resistência insulínica, eventos que determinam a progressão da doença: *ballooning* e infiltrados inflamatórios, bem como esteatose macrovesicular podem estar presentes. Com a permanência dos distúrbios metabólicos (obesidade central, DM2 e hipertrigliceridemia), a doença progride para maior frequência de infiltrados inflamatórios e fibrose. Com 48 semanas, 1 ano de idade, os camundongos MSG já apresentam nódulos displásicos, o que pode estar relacionado ao carcinoma hepatocelular.....33

Artigo:

Figure 1. Body weight curve and obesity development by Lee Index. **A.** Body weight curve. **B.** Lee Index each 30 days of life. N = 8-16, mean ± SEM, a p <0.05 MSG vs CTR, b p <0.05 MSG vs. MCT, c p <0.05 MCT vs. CTR. Unpaired Student's *t* test for MSG vs. CTR (ages 30-90 days old). One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test (120-day old analysis).51

Figure 2. Morphometric parameters. **A.** Liver relative weight. **B.** Periepididymal fat pad. **C** Retroperitoneal fat pad **D.** Mesenteric fat pad. N = 8, mean ± SEM. a p <0.05 MSG vs CTR, b p <0.05 MSG vs. MCT. One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test. B.W. = body weight.....52

Figure 3. Impact of myricetin 30-day treatment on MSG dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **A.** Evolutionary curve for glycemia during mice lifetime. **B.** Evolutionary curve for triglyceridemia. **C.** Prediction of peripheral insulin resistance by TyG value. N = 8-16, mean ± SEM, a p <0.05 MSG vs CTR, b p <0.05 MSG vs. MCT, c p <0.05 MCT vs. CTR. Unpaired Student's *t* test for MSG vs. CTR (ages 30-90 days old). One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test (135-day old analysis).....53

Figure 4. Myricetin treatment reverts microvesicular steatosis of MSG obesity. Histopathology followed by NAFLD Activity Score. N = 8, mean ± SEM. a p <0.05 MSG vs CTR, b p <0.05 MSG vs. MCT, c p <0.05 MCT vs. CTR. One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test. H&E, 400x.....54

Figure 5. MSG mice exhibited impaired learning and spatial memory detected by Morris Water Maze. **A.** Latency to reach the platform. **B** Percentage of time expended in target zone. **C.** Percentage of entries into the target quadrant. N = 8, mean ± SEM. a p <0.05 MSG vs CTR, c p <0.05 MCT vs. CTR. One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test.....55

Figure 6. MSG mice presented defective thigmotaxis and less exploratory behavior, and myricetin treatment improved this frame. Open field test (A-D). **A.** Locomotor activity by traveled zones. **B.** Time expended in each zone of open field (thigmotaxis evaluation). **C.** Defecation. **D.** Rearing. **Elevated plus maze (E-H).** **E.** Entries in close arms. **F.** Entries in open arms. **G.** Number of crosses by center square. **H.** Rearing. N = 6-8, mean ± SEM. a p <0.05 MSG vs CTR, b p <0.05 MSG vs. MCT, c p <0.05 MCT vs. CTR. One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test.....56

RESUMO

Flavonoides podem ser apontados como potenciais terapias preventivas para obesidade, síndrome metabólica e suas comorbidades. Miricetina é um flavonoide com efeitos hipoglicemiante e anti-obesidade, além de alta atividade *scavenger* de espécies reativas de oxigênio. Roedores com obesidade induzida por L-glutamato monossódico (MSG) são um modelo de obesidade que desenvolve hiperinsulinemia precoce e mimetiza diabetes *mellitus* tipo 2, obesidade, dislipidemia, doença hepática gordurosa não-alcóolica e déficit cognitivo. Nesse sentido, este estudo objetivou investigar se a miricetina pode reverter ou melhorar aspectos comportamentais e metabólicos da obesidade induzida por MSG. Camundongos machos neonatos foram tratados com MSG por via subcutânea (4mg / kg) em dias alternados nos primeiros 10 dias de vida. Ao completarem 90 dias de vida, um grupo de camundongos MSG foi tratado com miricetina (50mg / kg) e outro com água destilada. Os animais controle, previamente com solução salina 0,9% por via subcutânea, também foram tratados com água destilada por gavagem. Após 30 dias de tratamento, os camundongos foram submetidos a testes comportamentais: campo aberto, labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris. A miricetina melhorou a hiperglicemia, sensibilidade à insulina, trigliceridemia, esteatose hepática e comportamento exploratório. Contudo, os animais MSG apresentaram déficit cognitivo que não foi impactado pelo tratamento com miricetina.

Palavras-chave: Miricetina, L-glutamato monossódico, Obesidade, Ansiedade, Memória, DHGNA

ABSTRACT

Flavonoids could be indicated as potential preventive therapy for obesity, metabolic syndrome and even their comorbidities. Myricetin is a flavonoid known for its hypoglycemic and anti-obesity effects, as well as its great scavenger capacity. Rodent obesity induced by monosodium L-glutamate (MSG) is a model of hypothalamic obesity which develops early hyperinsulinemia and mimetizes DM 2, obesity, dyslipidemia, NAFLD/NASH and cognitive deficit. Thus, this study aimed to investigate whether myricetin can revert or ameliorate metabolic and behavioral features in MSG-induced obesity. Newborn mice were treated with MSG subcutaneously (4 mg/kg) on alternate days in the first 10 days of life. After reaching 90 days of life, a group of MSG obese mice were treated with myricetin (50 mg/kg) or distilled water. Control animals, previously treated with neonatal subcutaneous injection of 0.9% saline solution, were treated with vehicle also. After 4 weeks of treatment, mice were submitted to behavior tests: open field maze, elevated plus maze and Morris water maze. After all tests were performed, animals were euthanized for collection of liver, serum and adipose tissue depots, for further analysis. Myricetin treatment was able to ameliorate hyperglycemia, insulin sensitivity, triglycerides levels, liver steatosis and exploratory behaviors. However, MSG exhibited cognitive impairment that was not improved by myricetin treatment.

Keywords: Myricetin, Monosodium L-glutamate, Obesity, Anxiety, Memory, NAFLD

1. INTRODUÇÃO

A obesidade e o sobrepeso têm ganhado notoriedade no mundo devido sua crescente prevalência, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, sendo considerada uma epidemia no século 21 (JAMES, 2009). A mudança de padrões alimentares e o estilo de vida preconizado nos centros urbanos são apontados como justificativa central para esse fenômeno, uma vez que países emergentes, em intensa urbanização, encontram-se na chamada “transição nutricional”, caracterizada pelo maior consumo de alimentos processados e carboidratos simples (ZOBEL; HANSEN; ROSSING; VON SCHOLTEN, 2016). No Brasil, por exemplo, estima-se que mais da metade da população adulta das capitais (53,8%) esteja em sobrepeso ou obesidade (BRASIL, 2019).

Não somente a obesidade, outras doenças ligadas aos hábitos alimentares e ao sedentarismo (diabetes *mellitus* tipo 2 – DM2, dislipidemia, doenças cardiovasculares) têm crescente prevalência no Brasil e onerado o Sistema Único de Saúde por suas complicações (SILVEIRA; VIEIRA; SOUZA, 2018; SILVEIRA; VIEIRA; JARDIM; SOUZA, 2016). Essas desordens endócrino-metabólicas podem estar isoladas ou associadas nos indivíduos; quando a segunda acontece, o paciente pode estar em uma condição chamada Síndrome Metabólica (SM) (GRUNDY; CLEEMAN; DANIELS; DONATO *et al.*, 2005). A SM é definida pela *American Heart Association* (AHA) desde 2005 como a presença de 3 dentre os 5 critérios diagnósticos: obesidade central (circunferência abdominal > 102 cm para homens e > 88 cm para mulheres), dislipidemia (HDL < 40 mg/dL para homens ou < 50 mg/dL para mulheres, triglicérides > 150 mg/dL), hipertensão arterial e resistência insulínica (DM2 ou intolerância à glicose) (GRUNDY; CLEEMAN; DANIELS; DONATO *et al.*, 2005). Ademais, o valor limite para circunferência abdominal varia de acordo com a etnia em questão: o valor corrigido para a etnia brasileira é de 92 cm para homens e 86 cm para mulheres (CARDINAL; VIGO; DUNCAN; MATOS *et al.*, 2018).

Entretanto, outras condições não incluídas nos critérios da AHA têm se mostrado importantes para o desfecho do paciente com SM: é o caso da Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (DHGNA) (YOUNOSSI; KOENIG; ABDELATIF; FAZEL *et al.*, 2016). A DHGNA é a repercussão hepática da SM, é independentemente associada à ocorrência de eventos cardiovasculares e sua prevalência global está estimada em 24% (CHALASANI; YOUNOSSI; LAVINE; CHARLTON *et al.*, 2018; YOUNOSSI; KOENIG; ABDELATIF; FAZEL *et al.*, 2016). Na América do Sul, estima-se que 34%

da população adulta tenha DHGNA (YOUNOSSI, 2018). Esta condição se inicia pelo acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos em forma de vacúolos (esteatose hepática simples), seja pela elevada síntese *de novo* de lipídeos (DNL), seja por *downregulation* de vias relacionadas à exportação/liberação dos triglicérides a partir dos hepatócitos (BRUNT; WONG; NOBILI; DAY *et al.*, 2015). Inicialmente benigna do ponto de vista histopatológico, a esteatose pode evoluir para inflamação e fibrose do tecido hepático (Esteato-hepatite Não-Alcoólica – EHNA) (BRUNT; WONG; NOBILI; DAY *et al.*, 2015). A partir da EHNA, a DHGNA pode levar à cirrose e, por conseguinte, ao carcinoma hepatocelular (BRUNT; WONG; NOBILI; DAY *et al.*, 2015; YOUNOSSI, 2018). De fato, a DHGNA já é apontada como a segunda causa de transplante hepático nos EUA, atrás apenas da Hepatite C (YOUNOSSI, 2018). Por fim, a DHGNA não possui terapia farmacológica direcionada à sua patologia, ainda que sejam usadas medicações direcionadas às comorbidades metabólicas dessa doença e a mudança de estilo de vida, estimulada (KOTHARI; DHAMI-SHAH; SHAH, 2019).

A SM está ainda implicada a problemas relacionados à perda cognitiva: a doença de Alzheimer (DA) tem como um dos principais fatores de risco o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM 2), visto que esta está presente em cerca de 60% dos pacientes, de forma a já ser chamada “diabetes tipo 3” (CHATTERJEE; PETERS; WOODWARD; ARANGO *et al.*, 2016; DE LA MONTE; WANDS, 2008). A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta áreas do córtex e do hipocampo, associada ao acúmulo de placas β -amiloides no espaço extracelular e ao acúmulo de proteína microtubular tau no neurônio (MASTERS; BATEMAN; BLENNOW; ROWE *et al.*, 2015). Já há evidências de estudos *post-mortem* que permitem sustentar a resistência insulínica cerebral como um evento precoce na DA (TALBOT; WANG; KAZI; HAN *et al.*, 2012).

Nesse contexto, o Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Maranhão tem realizado desde 2011 atividades de pesquisa relacionadas à elucidação de mecanismos fisiopatológicos da SM e à busca de novas terapias para as suas repercussões/comorbidades. Nesse sentido, dois objetos de estudo detêm especial atenção do nosso grupo de pesquisa: modelos roedores de obesidade/hipertrigliceridemia (por dieta rica em sacarose e por aplicação neonatal de L-glutamato monossódico) e a atividade modulatória das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre a SM.

S. cumini é uma espécie originária da Índia, da família Myrtaceae, e introduzida no Brasil a partir das rotas de navegação portuguesas, que conectavam a Ásia ao continente americano (MIGLIATO; BABY; ZAGUE; VELASCO *et al.*, 2006). A espécie

logo encontrou condições favoráveis no clima tropical brasileiro e pode ser encontrada nas Regiões Norte, Nordeste e Sudeste do país, sob o nome de “jamelão”, “jambolão” e “azeitona-roxa” (MIGLIATO; BABY; ZAGUE; VELASCO *et al.*, 2006). Amplamente citada na mitologia ayurvédica como fonte do “elixir da vida” e ainda como origem da cor da pele dos deuses, a espécie é usada na prática popular brasileira para tratamento de distúrbios metabólicos como a DM2, a obesidade e a dislipidemia (EDIRIWEERA; RATNASOORIYA, 2009; MIGLIATO; BABY; ZAGUE; VELASCO *et al.*, 2006; RAJASEKHARAN; NAIR, 2017). De fato, a espécie é reconhecida pelo Ministério da Saúde do Brasil como relevante do ponto de vista etnofarmacológico, sendo inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2009).

Os efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes das folhas de *S. cumini* já são descritos na literatura, inclusive por publicações do nosso grupo de pesquisa (Figura 1) (CHAGAS; COELHO; GASPAR; DA SILVA *et al.*, 2018; FRANÇA; COELHO; FREITAS; SOUZA *et al.*, 2019). Vários compostos podem estar associados aos efeitos observados, como taninos, ácidos fenólicos, terpenos e flavonoides (CHAGAS; FRANÇA; MALIK; PAES, 2015) (**Figura 1**). Em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, observou-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. cumini* reduz a trigliceridemia e a esteatose hepática de animais com obesidade induzida por MSG (FRANÇA; COELHO; FREITAS; SOUZA *et al.*, 2019; SANCHES; FRANÇA; CHAGAS; GASPAR *et al.*, 2016). Ao separar-se a fração acetato de etila deste extrato por partição, e realizar a caracterização fitoquímica desta fração, demonstrou-se que a miricetina sob a forma aglicona ou glicosilada é o flavonoide mais abundante, representando cerca de 20% da massa total, ao lado da quercetina e dos derivados de ácido gálico (CHAGAS; COELHO; GASPAR; DA SILVA *et al.*, 2018). Neste mesmo trabalho, o tratamento de animais com diabetes induzida por aloxana evidenciou o efeito hipoglicemiante desta fração (CHAGAS; COELHO; GASPAR; DA SILVA *et al.*, 2018). O presente trabalho, portanto, dá continuidade aos trabalhos do nosso grupo de pesquisa, visto que se propõe a demonstrar a participação da miricetina em efeitos observados nos estudos anteriores com o extrato das folhas de *S. cumini*.

A miricetina é um flavonoide pouco estudado em comparação aos outros dois componentes do extrato: poucos são os estudos demonstrando seu efeito antiesteatótico e antiamiloidogênico (DAS; STARK; MUSGRAVE; PUKALA *et al.*, 2016; ONO; YOSHIKE; TAKASHIMA; HASEGAWA *et al.*, 2003; XIA; LE; WANG; QIU *et al.*,

2016; XIA; QIU; CHEN; JIANG *et al.*, 2019) . Considerando que os polifenóis constituem uma alternativa terapêutica multialvo, é importante investigar quais mecanismos de ação podem estar implicados nos efeitos hepáticos, metabólicos e centrais da miricetina (PARK; CHONG; KIM, 2016). Assim, nosso estudo pretendeu avaliar os efeitos da miricetina sobre o modelo de obesidade induzida por MSG, um modelo de obesidade hipotalâmica que engloba os parâmetros metabólicos e cognitivos associados à SM – a serem mais detalhados na terceira seção do capítulo 2 (COELHO; FRANÇA; NASCIMENTO; DOS SANTOS *et al.*, 2018; JIN; LIN; LI; LIU *et al.*, 2018).

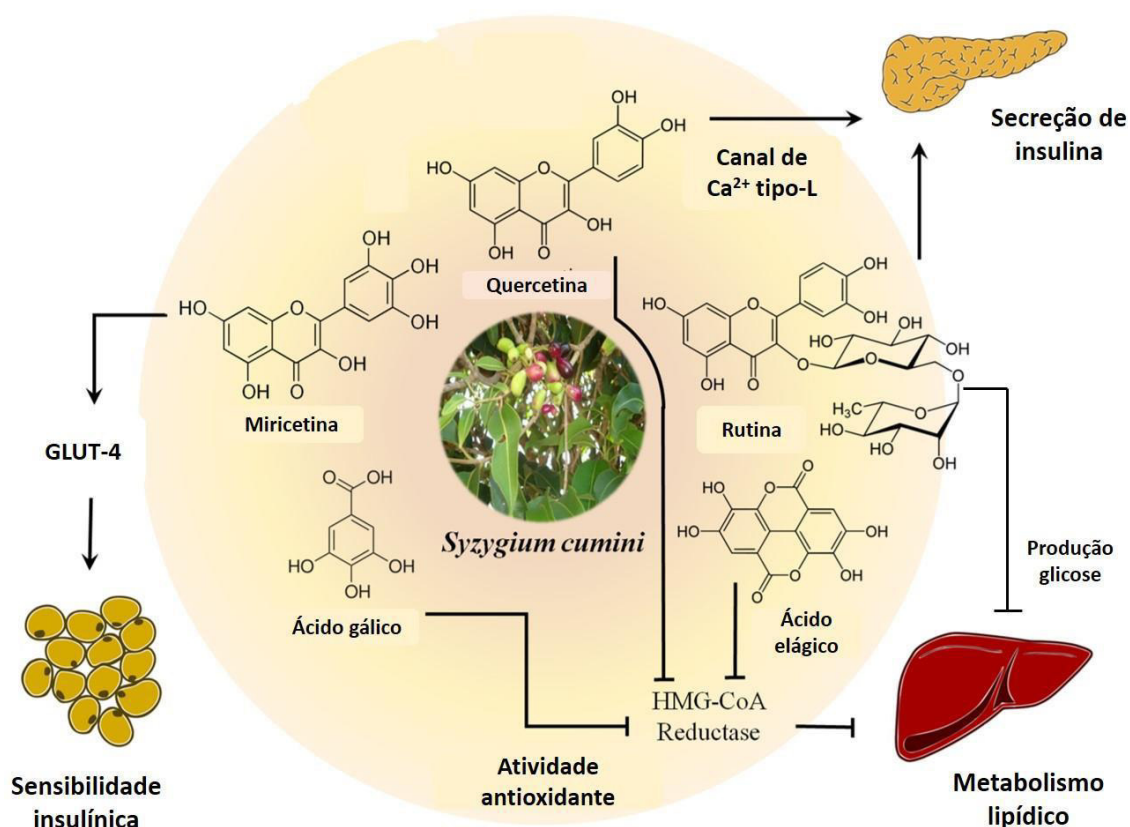


Figura 1. Compostos polifenólicos identificados nas folhas de *Syzygium cumini* e seus mecanismos de ação sobre a Síndrome Metabólica. A miricetina é um dos compostos identificados nas folhas de *S. cumini* e aumenta a expressão de GLUT-4, promovendo melhora da sensibilidade à insulina. Quercetina e rutina são secretagogos de insulina, agindo sobre os canais de Ca²⁺ tipo-L. A rutina também diminui a gliconeogênese. Nesse sentido, o ácido gálico, a quercetina e a rutina diminuem a síntese do colesterol por inibição da enzima HMG-CoA redutase hepática.

Fonte: Chagas et al. (2015), adaptado.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Inflamação e resistência insulínica como marcos nas repercussões sistêmicas da obesidade

O maior consumo de alimentos processados e ricos em frutose e ácidos graxos tem levado à maior prevalência de obesidade nos países desenvolvidos e em países em desenvolvimento (ZOBEL; HANSEN; ROSSING; VON SCHOLTEN, 2016). De fato, já existem metanálises que mostram a relação diretamente proporcional entre o consumo de carboidratos simples e a prevalência de obesidade nas últimas décadas (BRAY; POPKIN, 2014). A obesidade central, nesse sentido, é definida pelo aumento da cintura abdominal, parâmetro que varia de acordo com a etnia avaliada (RONN; ANDERSEN; LAURITZEN; CHRISTENSEN *et al.*, 2017). O aumento no valor desse parâmetro está ligado à hipertrofia do tecido adiposo visceral, o que leva à inflamação desse tecido e maior liberação de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea (YAZICI; SEZER, 2017).

Cerca de 10% das células do tecido adiposo saudável são macrófagos, que em estado fisiológico encontram-se em perfil M2, perfil anti-inflamatório (WEISBERG; MCCANN; DESAI; ROSENBAUM *et al.*, 2003). O aumento do acúmulo de lipídeos nas células adiposas leva à lipotoxicidade, por aumento da β -oxidação e consequente elevada geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MASLOV; NARYZHAYAYA; BOSHCHENKO; POPOV *et al.*, 2019). Esta lipotoxicidade leva tanto à disfunção mitocondrial dentro do adipócito quanto à ativação de vias pró-inflamatórias, de modo que o tecido adiposo libere mais citocinas como interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (MASLOV; NARYZHAYAYA; BOSHCHENKO; POPOV *et al.*, 2019). Estas citocinas são responsáveis pela mudança de perfil dos macrófagos do tecido adiposo de perfil M2 para perfil M1, perfil pró-inflamatório responsável pelo recrutamento de mais macrófagos, pelo advento da resistência insulínica no tecido adiposo e por maior liberação de IL-6 e TNF- α na corrente sanguínea, levando ao estabelecimento e à sustentação da inflamação de baixo grau (THOMAS; APOVIAN, 2017).

Entretanto, antes de adentrar na inflamação de baixo grau e na resistência insulínica, faz-se necessário compreender o tecido adiposo visceral como parte integrante do sistema endócrino. De fato, uma das funções do tecido adiposo é o controle da saciedade através da produção de leptina, cuja ação no hipotálamo sobre neurônios da POMC (pró-ópiomelanocortina) promove efeitos anorexígenos (COWLEY; SMART;

RUBINSTEIN; CERDAN *et al.*, 2001). Curiosamente, um dos principais mecanismos fisiopatológicos da obesidade e da síndrome metabólica se deve aos primeiros estudos com essa molécula: após o insucesso terapêutico de pacientes obesos ao tratamento com essa molécula, descobriu-se que estes pacientes apresentavam resistência à leptina e altos níveis séricos desse hormônio (PAZ-FILHO; MASTRONARDI; LICINIO, 2015).

A concentração de leptina está não apenas relacionada com maior tamanho dos adipócitos, como seu aumento é consequência da resistência insulínica dos mesmos (PALHINHA; LIECHOCKI; HOTTZ; PEREIRA *et al.*, 2019). A hiperleptinemia está intimamente relacionada à progressão da síndrome metabólica a partir da obesidade, contribuindo para a DM2 e para a DHGNA (CERNEA; ROIBAN; BOTH; HUTANU, 2018). Além disso, a resistência à leptina pode estar relacionada à ativação de vias pró-inflamatórias tanto no tecido hepático quanto em células musculares lisas vasculares, contribuindo para a esteato-hepatite e no processo de aterogênese (LIU; CHEN; CHEN; LAN, 2018; POLYZOS; KOUNTOURAS; ANASTASILAKIS; GELADARI *et al.*, 2014).

Outro importante fator secretado pelo tecido adiposo é a adiponectina, que apresenta função anti-inflamatória sistêmica e, por conta da obesidade, tem concentração diminuída (ATTIE; SCHERER, 2009). Este hormônio estimula o catabolismo de TGs no fígado e no músculo esquelético, de forma que sua concentração é inversamente correlacionada com a resistência insulínica (FURLER; GAN; POYNTEN; CHISHOLM *et al.*, 2006). O tecido adiposo visceral hipertrofiado, resistente à insulina, em estado de “inflamação de baixo grau” tem maiores taxas de lipólise, com maior liberação de ácidos graxos livres e menor produção de adiponectina (NATI; HADDAD; BIRKENFELD; KOCH *et al.*, 2016). Por fim, como função anti-inflamatória, seu principal mecanismo é inibir a liberação de TNF- α pelos macrófagos (LEAMY; EGNATCHIK; YOUNG, 2013).

A inflamação no tecido adiposo está relacionada à resistência insulínica, uma vez que as ações parácrinas dos macrófagos M1 levam a este quadro, pela ativação de quinases de resíduos de serina dos substratos de receptor de insulina (IRS), da *c-Jun N-terminal kinase*, e menor expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4) (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003; THOMAS; APOVIAN, 2017). A resistência insulínica neste tecido leva então à maior circulação de ácidos graxos livres e menor receptação destes no tecido adiposo, favorecendo o acúmulo de gordura ectópica e maior lipotoxicidade (YAZICI; SEZER, 2017). Destarte, o maior acúmulo de lipídeos em tecidos como

músculo e fígado, a maior circulação de leptina e citocinas pró-inflamatórias, bem como a menor liberação de adiponectina contribuem para a progressão de comorbidades relacionadas à obesidade e, portanto, à SM, como DM2, dislipidemias e DHGNA (**Figura 1**) (ATTIE; SCHERER, 2009).

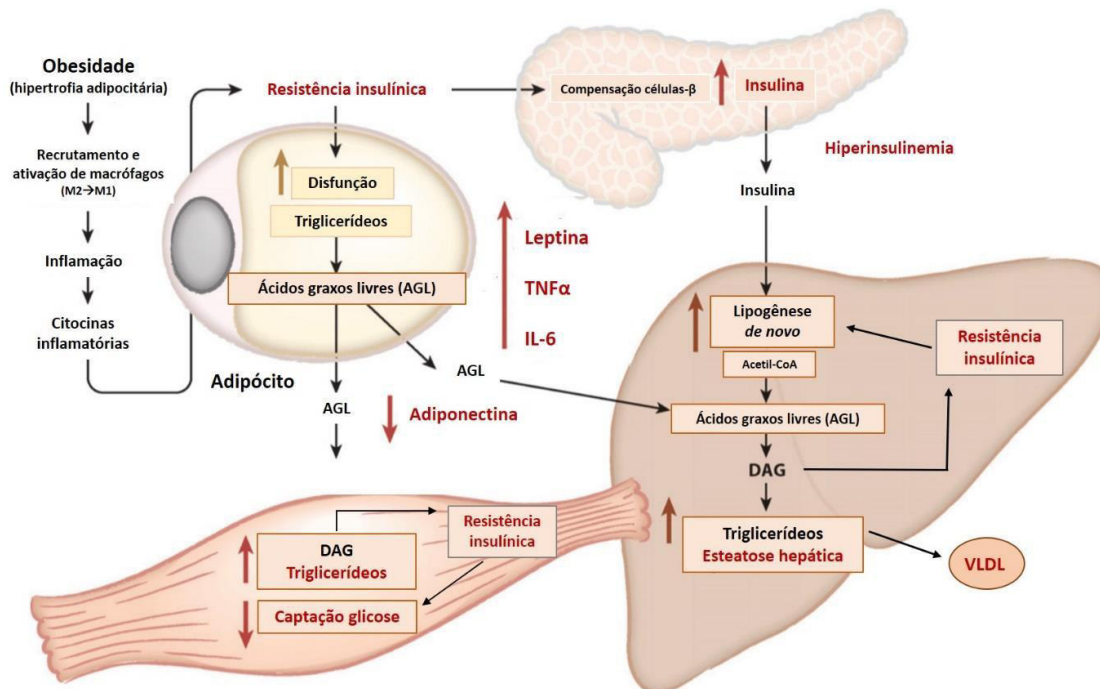


Figura 1. Obesidade e desenvolvimento de patologias associadas à Síndrome Metabólica. A hipertrofia dos adipócitos no decurso da obesidade promove alteração de perfil de macrófagos residentes para macrófagos M1, que recrutam mais macrófagos. Há, portanto, maior liberação de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α), o que desencadeia resistência insulínica e leva à maior produção de leptina, menor liberação de adiponectina e maior fluxo de ácidos graxos livres na corrente sanguínea. Esta, por sua vez, favorece a entrada destes ácidos graxos em outros tecidos, conseqüente resistência insulínica periférica e advento da diabetes *mellitus* tipo 2. A resistência insulínica hepática e a hiperinsulinemia compensatória induzem maior lipogênese *de novo* e acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos sob a forma de vacúolos: tem-se a doença hepática gordurosa não-alcoólica.

Fonte: Attie & Scherer (2009), adaptado.

No fígado, há acúmulo de triglicerídeos (TGs) sob a forma de vacúolos, o que caracteriza o início da DHGNA: a esteatose hepática (BRUNT; WONG; NOBILI; DAY *et al.*, 2015). A partir dessa forma benigna, pode evoluir para inflamação do tecido hepático, com infiltrados de neutrófilos e linfócitos, bem como mudança de perfil das células de Kupffer para um perfil pró-inflamatório (M1) (NATI; HADDAD; BIRKENFELD; KOCH *et al.*, 2016). Os hepatócitos ativam mecanismos pró-apoptóticos e perdem a morfologia original, tornando-se mais semelhantes aos adipócitos: a

degeneração globosa, ou balonização (BRUNT; WONG; NOBILI; DAY *et al.*, 2015). Então, progride-se a uma forma mais avançada da DHGNA: a EHNA. Nessa fase, as células estreladas do fígado já são ativadas e principiam a produção de colágeno tipo 1 (NATI; HADDAD; BIRKENFELD; KOCH *et al.*, 2016; WREE; BRODERICK; CANBAY; HOFFMAN *et al.*, 2013). Entretanto, esse acúmulo não se dá apenas devido ao afluxo de TGs e ácidos graxos livres, provenientes do tecido adiposo: ocorre aumento também da DNL por conta da resistência insulínica hepática.

A captação de glicose nos hepatócitos não é regulada pela insulina, uma vez que seu transportador de glicose, GLUT2, não depende da ativação por esse hormônio (THORENS, 2015). No entanto, a insulina é responsável pela regulação de duas atividades no fígado: a síntese *de novo* de lipídeos e a gliconeogênese (KAMAGATE; DONG, 2008). O receptor de insulina possui dois substratos que ativam cascatas relacionadas a cada uma dessas funções: o IRS1, para ativar a lipogênese, e o IRS2, que promove *downregulation* da gliconeogênese (KAMAGATE; DONG, 2008; RAMETTA; MOZZI; DONGIOVANNI; MOTTA *et al.*, 2013). A resistência insulínica seletiva ao IRS-2, aliado ao contexto de hiperinsulinemia, leva a uma maior taxa de DNL, levando à produção de TG estocado sob a forma de vacúolos de lipídeos, isto é, esteatose (RAMETTA; MOZZI; DONGIOVANNI; MOTTA *et al.*, 2013). De fato, a resistência insulínica tende a se instalar antes no fígado que em outros tecidos, como músculo esquelético, na história natural da DM2 (FRANCH-NADAL; CABALLERIA; MATA-CASES; MAURICIO *et al.*, 2018). Além disso, a cascata ativada pela IRS-2 promove a fosforilação da FOXO1, que assim permanece no citoplasma (RAMETTA; MOZZI; DONGIOVANNI; MOTTA *et al.*, 2013). Quando a FOXO1 não é fosforilada, seja em condições fisiológicas, seja pela resistência insulínica seletiva do IRS2, ocorre transcrição de genes lipogênicos, o que exacerba a DNL (KAMAGATE; DONG, 2008).

A DNL elevada de fato é um evento que conecta resistência insulínica hepática à hipertrigliceridemia (KAMAGATE; DONG, 2008). Esta última, aliada ao maior afluxo de ácidos graxos livres provenientes do tecido adiposo, levam ao acúmulo de lipídeos no tecido muscular esquelético (ATTIE; SCHERER, 2009). A maior β -oxidação neste tecido e consequente maior geração de EROs podem levar à resistência insulínica neste tecido (DI MEO; IOSSA; VENDITTI, 2017). Além disso, ambas promovem disfunção mitocondrial das células musculares, que também pode estar implicada na menor sensibilidade à insulina e desenvolvimento da DM2 (SAMJOO; SAFDAR; HAMADEH; GLOVER *et al.*, 2013). De fato, o dano mitocondrial está implicado na maior produção

de H₂O₂, que pode levar à maior ativação de JNK e, portanto, levar à resistência insulínica (DI MEO; IOSSA; VENDITTI, 2017). De maneira contrária, o estresse oxidativo que a DM2 promove no tecido muscular esquelético também é capaz de levar ao dano mitocondrial (BONNARD; DURAND; PEYROL; CHANSEAUME *et al.*, 2008). O resultado final é a menor translocação de GLUT4 para membrana, menor captação de glicose pelo tecido muscular e, portanto, maiores níveis de glicose séricos (XU; SONG; ZHANG; JIAO *et al.*, 2015).

A hiperglicemia e a hiperinsulinemia compensatória podem levar também ao quadro de resistência insulínica cerebral, ainda que a captação de glicose em neurônios não dependa da ação da insulina (HAYDEN, 2019; HUSSAIN; JAIN; SAMAIYA, 2019). No entanto, a insulina regula processos relacionados ao crescimento neuronal, à plasticidade sináptica, ao reparo neuronal, ao dobramento de proteínas e autofagia (BEDSE; DI DOMENICO; SERVIDDIO; CASSANO, 2015). Além disso, altos níveis de insulina plasmática podem levar ao acúmulo de proteína β amiloide, implicada na fisiopatologia clássica da DA, por competição direta com enzimas de degradação (NEUMANN; ROJO; NAVARRETE; FARÍAS *et al.*, 2008). Altas concentrações séricas de glicose também têm sido correlacionadas com a hiperfosforilação da proteína tau, outro evento fisiopatológico na evolução do DA (HUANG; TIAN; ZHANG; ZHU *et al.*, 2020).

O quadro de resistência insulínica pode ainda aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, o que gera maior fluxo de insulina e glicose ao tecido cerebral, desencadeando maior produção de citocinas pró-inflamatórias mediada por astrócitos e células microgliais (HUANG; TIAN; ZHANG; ZHU *et al.*, 2020; RAPOPORT, 2001; SPIELMAN; BAHNIWAL; LITTLE; WALKER *et al.*, 2015). Contribuindo para esse quadro, a dislipidemia pode promover destas células gliais a partir da ativação do receptor *Toll-like 4*, a partir do maior fluxo de ácidos graxos livres para o cérebro (**Figura 2**) (FERREIRA; FERNANDES; VIEIRA; DE FELICE, 2018). Tal qual no fígado e no tecido adiposo, as células microgliais mudam de perfil M2 para M1, liberando mais TNF- α e IL-6 (TANG; LE, 2015). O desfecho da neuroinflamação é o estresse do retículo endoplasmático e ativação de vias pró-apoptóticas (FERREIRA; FERNANDES; VIEIRA; DE FELICE, 2018).

Ainda se debate se os mecanismos de resistência insulínica e, principalmente, de neuroinflamação poderiam explicar a correlação contundente entre transtornos de humor e obesidade/síndrome metabólica (MANSUR; BRIETZKE; MCINTYRE, 2015). De fato,

pacientes com transtorno de humor também apresentam concentrações séricas de TNF- α e IL-6 elevadas (DOWLATI; HERRMANN; SWARDFAGER; LIU *et al.*, 2010; MUNKHOLM; VINBERG; VEDEL KESSING, 2013). Sabe-se ainda que a obesidade e os distúrbios de humor compartilham muitos fatores de risco, principalmente aqueles que se pronunciam na infância do indivíduo (MANSUR; BRIETZKE; MCINTYRE, 2015). No que tange aos modelos animais, ratos com obesidade induzida por dietas ricas em gordura exibem padrão de comportamento depressivo em testes (SHARMA; FULTON, 2013). Ademais, é descrito que tanto paciente obesos quanto pacientes com distúrbios de humor apresentam desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com altos níveis de glicocorticoides sendo reportados para ambos (MANSUR; BRIETZKE; MCINTYRE, 2015).

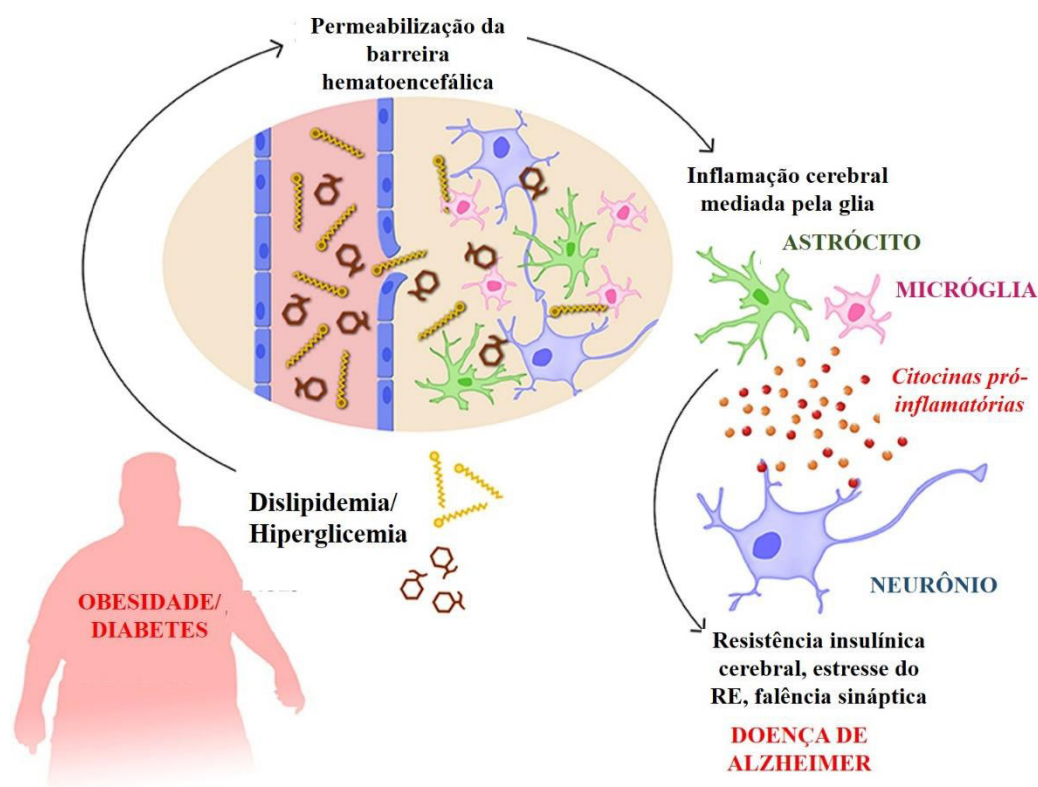


Figura 2. Cascata de eventos correlacionando desregulação metabólica periférica a demência. Hiperglicemia e dislipidemia podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, permitindo maior fluxo de ácidos graxos livres e produtos de glicosilação no cérebro. Inflamação crônica de baixo grau no cérebro leva a eventos como resistência insulínica cerebral, tornando o cérebro propenso ao déficit cognitivo e à doença de Alzheimer.

Fonte: Ferreira et. al (2018), adaptado.

2.2 Miricetina: uma estratégia multialvo para uma doença multifatorial?

Uma vez que sua fisiopatologia envolve muitos sistemas, a SM carece de estratégias terapêuticas que cerceiem as múltiplas variáveis para sua progressão. Nesse sentido, os polifenóis são importantes candidatos na terapia adjuvante da SM, uma vez que possuem múltiplos alvos, promovendo melhor adaptação do sistema biológico frente à doença (**Figura 3**) (VAN DE WIER; KOEK; BAST; HAENEN, 2017). Dentre os polifenóis mais estudados, destacam-se os flavonoides, que se caracterizam por um esqueleto de 15 carbonos, distribuídos em dois anéis fenólicos e um anel heterocíclico (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997). Flavonoides são compostos presentes em vários componentes dietéticos, como frutas, folhas, sementes e castanhas (ROSS; KASUM, 2002). Sua classificação baseia-se nas diferenças de um anel C aglicona, nas seguintes classes: flavonas, flavononas, flavonóis, isoflavonas, catequinas e antocianinas (ROSS; KASUM, 2002). A variedade de grupos que podem se ligar ao anel heterocíclico determinam, portanto, uma miríade de propriedades biológicas e de alvos enquanto mecanismo de ação (VAN DE WIER; KOEK; BAST; HAENEN, 2017). Estes não se limitam às EROs, uma vez que os flavonoides também possuem efeitos metabólicos e anti-inflamatórios (VAN DE WIER; KOEK; BAST; HAENEN, 2017).

Dentre os flavonoides estudados, o grupo dos flavonóis apresenta aqueles com maior atividade *scavenger* de EROs, e, dentre eles, a miricetina é a molécula que apresenta maior atividade antioxidante, por seu maior número de grupamentos hidroxila no anel aromático B (**Figura 4**) (CROZIER; BURNS; AZIZ; STEWART *et al.*, 2000; XIE; MOU; LIN; XU *et al.*, 2013). Além disso, a miricetina é o composto de maior concentração em muitos componentes dietéticos comuns, como cenoura, espinafre e couve-flor, além de estar na composição de várias plantas medicinais (SULTANA; ANWAR, 2008). Por ser pouco estudada, apenas recentemente a miricetina teve suas propriedades físicoquímicas descritas. A miricetina apresenta-se significativamente ionizada em pH fisiológico (7,4), porém apresenta um caráter hidrofóbico. Entretanto, soluções tampões de pH ácido (1.0-3.0), a miricetina apresenta alta solubilidade. Por apresentar lenta absorção, em ratos foi demonstrado que ela é preferencialmente absorvida no duodeno, uma região pouco ácida do intestino delgado (XUE; GUO; QIAN; DUAN *et al.*, 2011).

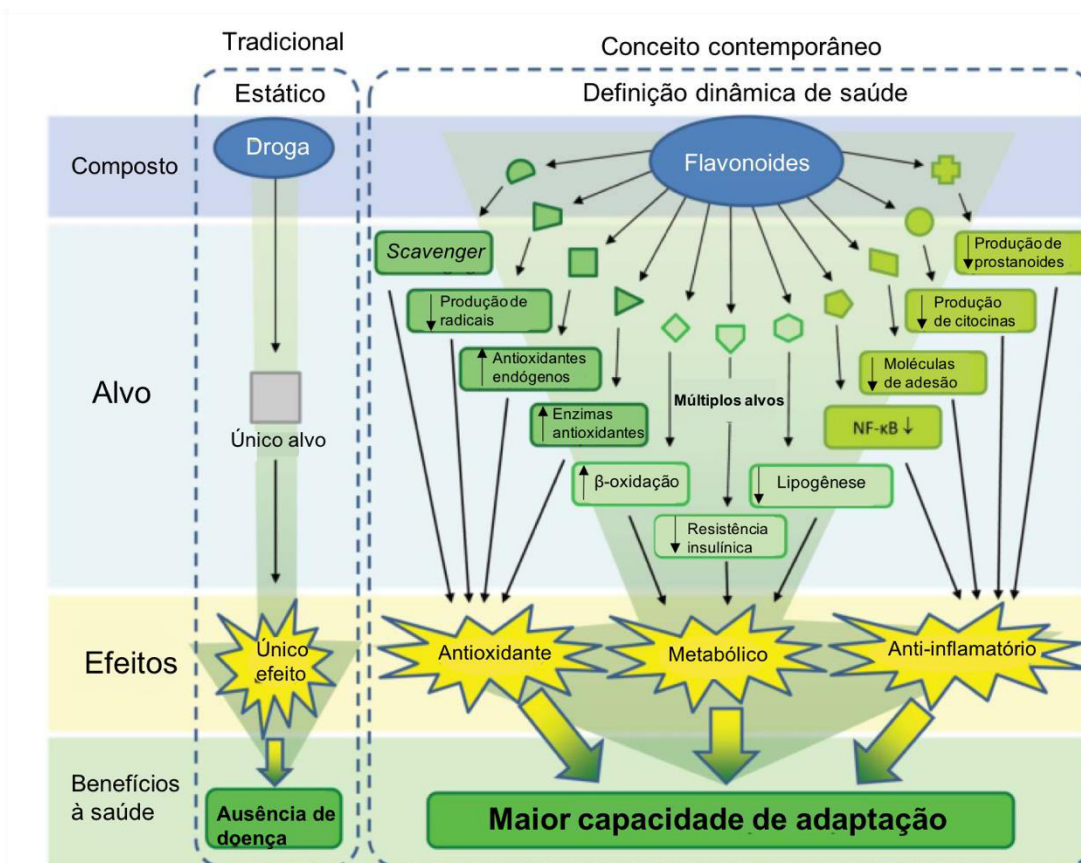


Figura 3. Os flavonoides enquanto terapia multialvo. O conceito contemporâneo do mecanismo de ação de compostos bioativos como os flavonoides contrapõe-se ao conceito “tradicional” do mecanismo de ação de outras drogas. Enquanto drogas tradicionais são desenvolvidas para agir sobre um só alvo, levando à ausência de doença, pelo controle de determinado mecanismo fisiopatológico relacionado a esta, os flavonoides interferem sobre diversos processos patológicos, levando a uma maior habilidade de adaptação. Este processo terapêutico vai de encontro à fisiopatologia da Síndrome Metabólica e da DHGNA, uma vez que vários mecanismos fisiopatológicos contribuem para a progressão da doença.

Fonte: Wier et. al (2017), adaptado.

Por apresentar baixa absorção, um estudo em ratos demonstrou baixa biodisponibilidade da miricetina por via oral: 9,62 e 9,74% em doses de 50 e 100mg/Kg, respectivamente (DANG; LIN; XIE; DUAN *et al.*, 2014). A miricetina pode também aumentar a biodisponibilidade e as propriedades farmacocinéticas de drogas co-administradas, visto que ela inibe proteínas do citocromo P450, como CYP3A4 e a CYP2C9 (CHOI; LI; CHOI, 2010; LI; LIM; KIM; CHOI, 2011). Já foi demonstrado que a miricetina poderia aumentar a biodisponibilidade de losartana por esses mecanismos (CHOI; LI; CHOI, 2010).

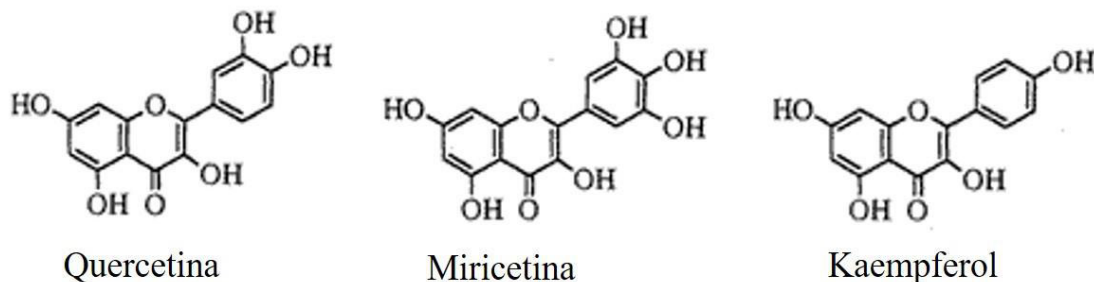


Figura 4. Principais flavonóis encontrados na dieta. A miricetina apresenta maior número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático B.

Fonte: Crozier et al (2000), adaptado.

Apesar de menos estudada que os outros integrantes do grupo dos flavonóis, a miricetina possui seu efeito antiobesidade bem descrito. Neste sentido, a miricetina adicionada à dieta por 12 semanas promoveu perda ponderal em animais com obesidade induzida por dieta rica em gordura (CHOI, H. N.; KANG, M. J.; LEE, S. J.; KIM, J. I., 2014). Em duas semanas de tratamento por via intraperitoneal, a miricetina é capaz de aumentar a expressão de SIRT3 e o metabolismo mitocondrial em tecido adiposo (AKINDEHIN; JUNG; KIM; SON *et al.*, 2018). Além disso, por ativar PPAR α em tecido adiposo branco, ela aumenta as taxas de lipólise e redução da gordura visceral. Ademais, pode inibir a captação de metilglicose pelas células adiposas a partir da competição direta com os transportadores GLUT4 (STROBEL; ALLARD; PEREZ-ACLE; CALDERON *et al.*, 2005). Por sua vez, a miricetina pode suprimir a diferenciação de pré-adipócitos, prevenindo a hiperplasia do tecido adiposo (WANG; WANG; YANG; YOU *et al.*, 2015). Pode ainda diminuir a liberação de citocinas pró-inflamatórias provenientes destes tecidos, uma vez que diminui a ativação do fator de transcrição NF-Kb (LIAO; ZHU; FENG; NI *et al.*, 2017).

Estudos populacionais têm demonstrado a relação inversa entre consumo de miricetina e incidência de DM2 (YAO; LI; GU; ZHANG *et al.*, 2019). Nesse sentido, foi demonstrado que a miricetina possui efeito agonista sobre o receptor de GLP-1, conferindo melhora da função das células, prevenindo episódios hipoglicêmicos e regulando a homeostase da glicose (LI; ZHENG; YI; LIU *et al.*, 2017). Já foi demonstrado que o composto promove aumento da expressão de GLUT4 no músculo e no tecido adiposo (LIU; TZENG; LIOU; LAN, 2007). Além disso, um estudo *ex vivo* de nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato bruto das folhas de *S. cumini*, cuja maior proporção de flavonoides é em miricetina, foi capaz de melhorar a função de células β -

pancreáticas em ratos com obesidade MSG (SANCHES; FRANCA; CHAGAS; GASPAR *et al.*, 2016). Por esses efeitos, a miricetina tem sido proposta como terapia de prevenção à cardiomiopatia diabética (WANG; WU; YANG; DONG, 2019). Em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina, foi demonstrado que um tratamento de 6 meses com miricetina melhorou a hipertrofia e a fibrose cardíacas relacionadas à cardiomiopatia diabética (LIAO; ZHU; FENG; NI *et al.*, 2017).

Por esses efeitos sobre o metabolismo, a miricetina tem sido proposta como potencial terapia para a DHGNA (VAN DE WIER; KOEK; BAST; HAENEN, 2017). A ação dessa molécula diretamente no tecido hepático também está envolvida, visto que em estudo *in vitro* com células HepG2, este flavonol demonstra capacidade antioxidante e antiesteatótica, o que se confirma em estudos *in vivo*, com redução da esteatose e das concentrações hepáticas de TGs e colesterol (CHANG; TZENG; LIOU; CHANG *et al.*, 2012; CHOI, H.-N.; KANG, M.-J.; LEE, S.-J.; KIM, J.-I., 2014; ZHANG; XIE; JIA; CAI *et al.*, 2011). Esse efeito está relacionado à menor expressão de SREBP-1 e 2, bem como ativação do miR-146b, diminuindo a expressão de genes lipogênicos e aumentando a β -oxidação (XIA; QIU; CHEN; JIANG *et al.*, 2019). Este efeito pode se dever à ativação da PPAR- α e redução dos FFA (CHANG; TZENG; LIOU; CHANG *et al.*, 2012). Através da ativação de NRF2, aumenta a expressão proteica de enzimas de defesa antioxidante (XIA; LE; WANG; QIU *et al.*, 2016). Apenas os estudos supracitados apresentam os efeitos *in vivo* do tratamento com a miricetina, de forma que mais mecanismos de ação podem estar subjacentes em seu efeito antiesteatótico desta molécula.

Por fim, a miricetina pode apresentar efeitos sobre o déficit cognitivo, uma vez que possui atividade anti-amiloidogênica descrita *in vitro* (ONO; YOSHIKE; TAKASHIMA; HASEGAWA *et al.*, 2003). Em camundongos com déficit cognitivo induzido por D-galactose, o tratamento via oral com miricetina na dose de 100mg/Kg/dia por 8 semanas conseguiu melhorar parâmetros avaliados no labirinto de Morris, como o tempo de latência para achar a plataforma e o tempo no quadrante alvo (LEI; CHEN; ZHANG; FU *et al.*, 2012). Em camundongos com déficit cognitivo por estresse, o tratamento intraperitoneal com 50mg/Kg de miricetina pode melhorar apenas o tempo no quadrante alvo (WANG; WANG; MA, 2016). O tratamento intracerebroventricular com 5mg/Kg de miricetina foi capaz de melhorar a aprendizagem de ratos com Alzheimer induzido por estreptozotocina, bem como o número de neurônios em CA3 do hipocampo (RAMEZANI; DARBANDI; KHODAGHOLI; HASHEMI, 2016), mostrando que o

composto pode atuar ainda como preventor da doença de Alzheimer, ou do déficit cognitivo brando, associados à DM2.

No que diz respeito a outros efeitos da miricetina sobre o sistema nervoso central, apenas um estudo demonstra efeito ansiolítico deste flavonol, sem descrever um mecanismo para esta ação (GUPTA; SHARMA; BANSAL; KAUR, 2018). Entretanto, sabe-se que a quercetina, de estrutura similar à miricetina, apresenta efeito de inibição da monoamino oxidase, o que poderia explicar parte do efeito citado (DHIMAN; MALIK; SOBARZO-SANCHEZ; URIARTE *et al.*, 2019).

2.3 A obesidade induzida por L-glutamato monossódico como modelo de Síndrome Metabólica

O tratamento com MSG nos primeiros 10 dias de vida em roedores promove lesões no núcleo arqueado e na eminência mediana do hipotálamo (OLNEY, 1969). A depender da concentração da solução, pode ocorrer ainda lesão no núcleo ventromedial (OLNEY, 1969; SASAKI; SHIMADA; IIZUKA; SUZUKI *et al.*, 2011; ZHANG; KUCHAR; MOZES, 1994). A lesão se dá pela necrose de neurônios dopaminérgicos da via tuberoinfundibular e, provavelmente, neurônios da POMC que emitem projeções para o complexo dorsomotor do vago e núcleo do trato solitário (NEMEROFF; GRANT; BISSETTE; ERVIN *et al.*, 1977). Por conta disso, os animais MSG apresentam menor secreção de GH/IGF-1, hiperleptinemia e hipotireoidismo (DHINDSA; OMRAN; BHUP, 1981; PERELLO; GAILLARD; CHISARI; SPINEDI, 2003; YAMAMOTO; MATSUO; UESHIMA; INOUE *et al.*, 1993).

Ademais, esses animais desenvolvem hipertonia vagal, com elevação do tônus parassimpático e conseqüente hiperinsulinemia precoce (BALBO; GRAVENA; BONFLEUR; DE FREITAS MATHIAS, 2000). Dessa forma, os animais MSG exibem obesidade central, elevada taxa de lipólise do tecido adiposo visceral, hipertrigliceridemia e resistência insulínica enquanto adultos jovens (BALBO; GRASSIOLLI; RIBEIRO; BONFLEUR *et al.*, 2007). Em uma certa idade, o animal MSG desenvolve DM2, idade que varia de espécie e linhagem utilizada (CANTELLI; SOARES; RIBEIRO; BALBO *et al.*, 2017; COELHO; FRANÇA; NASCIMENTO; DOS SANTOS *et al.*, 2018; NAGATA; SUZUKI; IIZUKA; TABUCHI *et al.*, 2006). Precoce também no animal MSG é o desenvolvimento de esteatose hepática microvesicular (COELHO; FRANÇA; NASCIMENTO; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Enquanto modelo de esteatose hepática, os roedores com obesidade MSG já foram utilizados em diversos estudos pré-clínicos para DHGNA (FRANÇA; COELHO; FREITAS; SOUZA *et al.*, 2019; FUJIMOTO; TSUNEYAMA; FUJIMOTO; SELMI *et al.*, 2012; SASAKI; SHIMADA; IIZUKA; SUZUKI *et al.*, 2011; YAMAZAKI; USUI; KANATANI; MATSUYA *et al.*, 2009). A DHGNA no animal MSG reproduz o contexto metabólico, os achados histopatológicos e a história natural da doença, sendo um modelo útil para o estudo dessa passagem de esteatose simples para EHNA, bem como do advento da fibrose e de nódulos displásicos (TSUNEYAMA; NISHIDA; BABA; TAIRA *et al.*, 2014). Camundongos com obesidade MSG desenvolvem esteatose microvesicular já aos 60 dias de vida (COELHO; FRANÇA; NASCIMENTO; DOS SANTOS *et al.*, 2018). Com seis meses de vida, esses animais apresentam infiltrado inflamatório com predominância de macrófagos e neutrófilos, semanas seguintes eles apresentam fibrose e infiltrados linfocitários (COELHO; FRANÇA; NASCIMENTO; DOS SANTOS *et al.*, 2018; FUJIMOTO; TSUNEYAMA; FUJIMOTO; SELMI *et al.*, 2012; NAKANISHI; TSUNEYAMA; FUJIMOTO; SALUNGA *et al.*, 2008). Com 54 semanas de idade então, esses animais já apresentam tecido hepático com achados histopatológicos de cirrose e nódulos displásicos (NAKANISHI; TSUNEYAMA; FUJIMOTO; SALUNGA *et al.*, 2008).

Entretanto, pouco se tem usado o modelo em investigações fisiopatológicas acerca da DHGNA. Em ratos Wistar com obesidade MSG, já se demonstrou que o acúmulo de TGs no fígado está relacionado à *downregulation* do eixo XBP1s-PDI-MTP e menor exportação de VLDL (FRANÇA; FREITAS; CHAGAS; COELHO *et al.*, 2014). Em outro estudo, em camundongos MSG de 16 semanas de vida, os hepatócitos apresentavam maior expressão de TNF- α , chave para a ativação de células de Kupffer (YAMAZAKI; USUI; KANATANI; MATSUYA *et al.*, 2009). E de fato, nessa idade esses animais apresentam um padrão *boderline* de DHGNA, em que podem ser classificados com esteatose simples ou EHNA (**Figura 5**). Uma das limitações do modelo é o fato de não ser induzido por dieta, uma vez que mesmo o MSG administrado não pode ser correlacionado ao MSG consumido em produtos onde é usado como aditivo (NAKANISHI; TSUNEYAMA; FUJIMOTO; SALUNGA *et al.*, 2008). Já a outra está ligada a uma limitação de muitos outros modelos de DHGNA em roedores: a prevalência da esteatose microvesicular sobre a macrovesicular (TSUNEYAMA; NISHIDA; BABA; TAIRA *et al.*, 2014). Esteatose microvesicular predominante é um padrão de DHGNA

pediátrica, mas em pacientes adultos, pode estar relacionada à severidade da doença (KLEINER; MAKHLOUF, 2016).

Além de desenvolverem aspectos da SM, roedores MSG apresentam quando adultos altas concentrações de proteína β -amiloide e hiperfosforilação da proteína tau no hipocampo, associadas a hiperinsulinemia e hiperglicemia (JIN; LIN; LI; LIU *et al.*, 2018; MADHAVADAS; KUTTY; SUBRAMANIAN, 2014). Esses animais desenvolvem ainda déficit cognitivo e distúrbios na citoarquitetura de células piramidais de CA1 do hipocampo (BEAS-ZARATE; PEREZ-VEGA; GONZALEZ-BURGOS, 2002; OLVERA-CORTES; LOPEZ-VAZQUEZ; BEAS-ZARATE; GONZALEZ-BURGOS, 2005). No entanto, em estudos farmacológicos no sentido de avaliar o potencial do modelo como mimetizador do *crosstalk* entre DM2 e AD, ou a funcionalidade não foi avaliada através de testes de memória, ou esse ganho não foi obtido apesar da reversão dos aspectos histopatológicos (DIEF; KAMHA; BARAKA; ELSHORBAGY, 2014; SPOLCOVA; MIKULASKOVA; HOLUBOVA; NAGELOVA *et al.*, 2015). Roedores MSG apresentam déficits de neurodesenvolvimento, uma vez que desenvolvem reflexos importantes de forma deficiente durante a infância, muito embora estes possam ser melhorados com ambiente enriquecido (HORVATH; REGLODI; VADASZ; FARKAS *et al.*, 2013). Além da hiperglicemia e da hipersinsulinemia, o modelo MSG apresenta outros distúrbios endócrino-metabólicos associados com o desenvolvimento de déficit cognitivo: a deficiência em GH, a hipercortisolemia e a dislipidemia (COELHO; FRANÇA; NASCIMENTO; DOS SANTOS *et al.*, 2018; NEMEROFF; GRANT; BISSETTE; ERVIN *et al.*, 1977).

Uma vez que desenvolve hipercortisolemia, hipotireoidismo e menor receptação de serotonina em seu córtex, o animal MSG é descrito como um animal que exibe baixa atividade locomotora espontânea e comportamentos de ansiedade (KISS; HAUSER; TAMAS; LUBICS *et al.*, 2007; NEMEROFF; GRANT; BISSETTE; ERVIN *et al.*, 1977; QUINES; ROSA; DA ROCHA; GAI *et al.*, 2014). Além disso, ratos com obesidade MSG apresentaram comportamento depressivo quando submetidos a teste de nado forçado (QUINES; ROSA; DA ROCHA; GAI *et al.*, 2014). Entretanto, os estudos divergem quanto ao fato de roedores MSG apresentar comportamentos ansiosos ou “ansiolítico”, uma vez que este animal demonstra menor comportamento exploratório e menor tigmotaxia (comportamento típico dos roedores de estarem mais próximos a lugares fechados ou paredes pelo estímulo do toque) (HLINAK; GANDALOVICOVA; KREJCI, 2005; KUZNETSOVA; AMSTISLAVSKAYA; BULYGINA; IL'NITSKAYA *et al.*,

2007). Nesse sentido, um estudo avaliou que a anfetamina normaliza a atividade locomotora espontânea de camundongos fêmeas com indução de MSG (DAWSON; LORDEN, 1981). Contudo, estudos com avaliação de monoaminas restringem-se ao baixo teor dopaminérgico que este modelo exibe no hipotálamo (DAWSON; LORDEN, 1981; JOHNSTON; TESONE; NEGRO-VILAR, 1984).

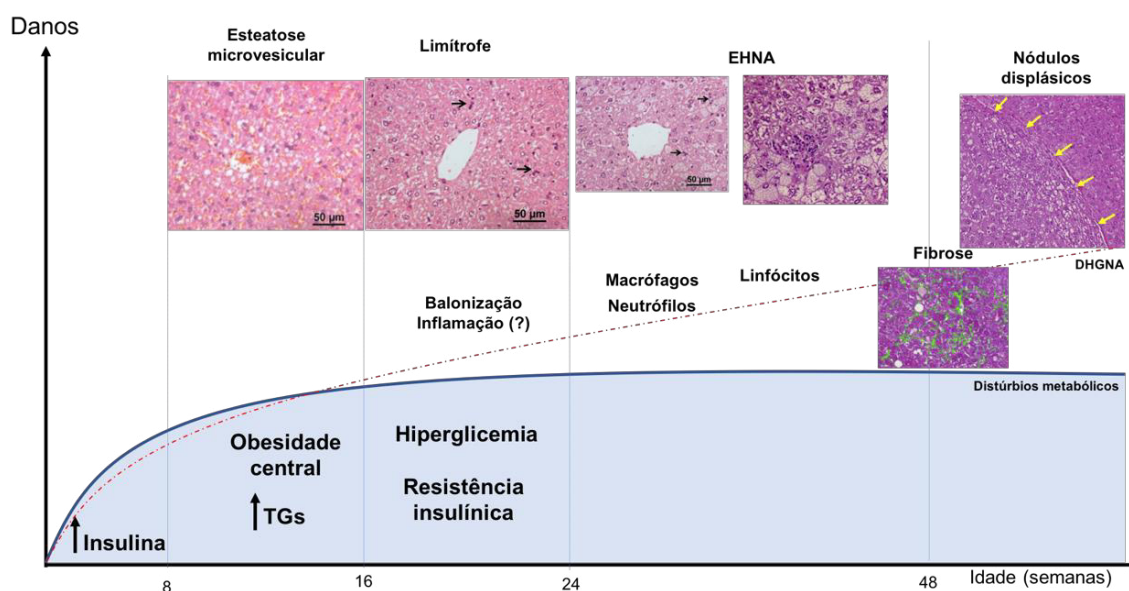


Figura 5. Progressão da DHGNA e da Síndrome Metabólica em camundongos MSG. Os animais com obesidade MSG possuem hiperinsulinemia precoce e desenvolvimento de obesidade central a partir das 8 semanas de vida. Essas modificações estão relacionadas ao aparecimento de esteatose microvesicular a partir da mesma idade. De fato, depósitos de gordura visceral estão independentemente correlacionados com o Escore de Atividade de DHGNA nesses animais. Ademais, a hipertrigliceridemia do modelo contribui para o acúmulo de TGs nos hepatócitos. Entre 16 e 24 semanas de vida, esses animais apresentam hiperglicemia e Resistência Insulínica, evento que determinam a progressão da doença: *ballooning* e infiltrados inflamatórios, bem como esteatose macrovesicular podem estar presentes. Com a permanência dos distúrbios metabólicos (obesidade central, DM2 e hipertrigliceridemia), a doença progride para maior frequência de infiltrados inflamatórios e fibrose. Com 48 semanas, 1 ano de idade, os camundongos MSG já apresentam nódulos displásicos, o que pode estar relacionado ao carcinoma hepatocelular.

(Imagem do autor)

Fonte para lâminas em HE: Coelho et al. (2018); Nakanishi et al. (2008)

Fonte para a imagem em Tricromo de Masson: Nakanishi et al. (2008)

3. OJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos modulatórios do tratamento com miricetina sobre os parâmetros metabólicos e comportamentais de animais com obesidade induzida por MSG.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito do tratamento com miricetina sobre glicemia, dislipidemia e esteatose hepática de camundongos com obesidade MSG.

- Avaliar o impacto do tratamento com miricetina sobre o desempenho de camundongos com obesidade MSG em testes de memória e ansiedade.

4. ARTIGO: “Myricetin improves metabolic profile but not cognitive deficit associated to hypothalamic obesity in mice”

Caio Fernando Ferreira Coelho¹, Ivana Letícia Santos Souza¹, Bruno Serra Pinto¹, Nathalee Liberal Ribeiro¹; Lucas Martins França¹, Vinicyus Teles Chagas¹; Antonio Marcus de Andrade Paes^{1*}.

¹Laboratory of Experimental Physiology, Health Sciences Graduate Program, Federal University of Maranhão.

***Corresponding author**

Antonio Marcus de Andrade Paes, PhD.

Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, N. 1966. São Luís, MA, 65080-805 (Brazil)

marcuspaes@ufma.br

Journal

Food Research International

Fator de Impacto (2018): 3,578

Qualis Medicina I: A2

Highlights

- Myricetin treatment improves hyperglycemia, but not cognitive deficit in MSG obese mice.
- Myricetin treatment ameliorated microvesicular steatosis in a hypothalamic obesity model.
- MSG obese mice have a lack of thigmotaxis and exploratory behavior, reverted by myricetin treatment.

Abstract

Flavonoids could be indicated as potential preventive therapy for obesity, metabolic syndrome and even their comorbidities. Myricetin is a flavonoid known for its hypoglycemic and anti-obesity effects, as well as its great scavenger capacity. Rodent obesity induced by monosodium L-glutamate (MSG) is a model of hypothalamic obesity which develops early hyperinsulinemia and mimetizes DM 2, obesity, dyslipidemia, NAFLD/NASH and cognitive deficit. Thus, this study aimed to investigate whether myricetin can revert or ameliorate metabolic and behavioral features in MSG-induced obesity. Newborn mice were treated with MSG subcutaneously (4mg / kg) on alternate days in the first 10 days of life. After reaching 90 days of life, a group of MSG obese mice were treated with myricetin (50mg / kg) or distilled water. Control animals, previously treated with neonatal subcutaneous injection of 0.9% saline solution, were treated with vehicle also. After 39 days of treatment, mice were submitted to behavior tests: open field maze, elevated plus maze and Morris water maze. After all tests were performed, animals were euthanized for collection of liver, serum and adipose tissue depots, for further analysis. Myricetin treatment was able to ameliorate hyperglycemia, insulin sensitivity, triglycerides levels, liver steatosis and exploratory behaviors. However, MSG exhibited cognitive impairment that was not improved by myricetin treatment.

Keywords: Myricetin, Monosodium L-glutamate, Obesity, Anxiety, Memory, NAFLD

4.1 Introduction

Obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) have emerged as epidemic diseases worldwide (Jaacks et al., 2019; Zhou et al., 2016). Usually, obesity may lead to T2DM, and these two entities comprise diagnostic criteria for metabolic syndrome (MetS), alongside hypertension and dyslipidemia (Alberti et al., 2009). MetS may unleash or be aside of comorbidities not comprised in its current definition, such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), mild cognitive deficit and Alzheimer's disease (AD) (Chatterjee et al., 2016; Younossi et al., 2019). In addition, obesity is related to mood disorders, since overweight can lead to neuroinflammation and anxiety/depressive symptoms (Mansur, Brietzke, & McIntyre, 2015). Consequently, MetS patients are usually subjected to polypharmacy regimens, which bring higher side effects and elevated costs to public health system (Boudreau et al., 2009).

For their multitarget properties, flavonoids have been proposed as therapeutic adjuvants in MetS (Van De Wier, Koek, Bast, & Haenen, 2017). Unique flavonoids have been identified as secondary metabolites present in different parts of edible plants, occurring in either glycoside or aglycone forms (Ahmed & Eun, 2018). These compounds can scavenge reactive oxygen species and enhance endogenous antioxidant defenses, attenuating lipoperoxidation-derived cell damage (Cao, Sofic, & Prior, 1997; Pallauf, Duckstein, Hasler, Klotz, & Rimbach, 2017). They represent a large family of low-molecular weight polyphenols and are classified into six subclasses: flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidins, and flavanols (Ross & Kasum, 2002). Among them, flavonols display the strongest scavenger activity, and are reported to have biological beneficial effects, such as anti-inflammatory, anti-obesity and hypoglycemic (Van De Wier et al., 2017). Quercetin and kaempferol are flavonols consistently studied as co-adjuvants for MetS-comorbidities therapy (Russo, Picconi, Malandrucchio, & Frontoni, 2019). However, other compounds like myricetin – the most concentrated flavonol in common dietary products, such as spinach, cauliflower, carrot, apple and strawberry (Sultana & Anwar, 2008) – have deserved less attention (Russo et al., 2019).

Monosodium L-glutamate (MSG) induced obesity has been used for MetS preclinical studies, from plant extracts to new synthetic molecules (França et al., 2019; Sasaki et al., 2011; Yamazaki et al., 2009). MSG subcutaneous injection in newborn rodents causes hypothalamic damages on arcuate nucleus, median eminence and ventromedial nucleus (Olney, 1969). For consequence, these animals develop early

hyperinsulinemia, hyperglycemia, dyslipidemia and central obesity, i.e., MetS (Balbo, Gravena, Bonfleur, & de Freitas Mathias, 2000; Coelho et al., 2018). Besides, MSG rodents were described to exhibit steatosis/steatohepatitis and cognitive deficit, with histopathological similarities to human NAFLD and AD manifestations (Coelho et al., 2018; Jin et al., 2018; Nakanishi et al., 2008). Despite MSG is largely used as food additive, its oral administration at human average doses does not promote such lesions (Tordoff, Aleman, & Murphy, 2012).

Thus, considering that the MSG obesity model allies both metabolic and cognitive disturbances associated to MetS, we took advantage of this model to seek the hypothesis that 30-day treatment with myricetin improves metabolic, behavioral and cognitive outcomes in hypothalamic obese mice.

4.2 Methods

4.2.1 *Animals, obesity induction and myricetin treatment*

Male Swiss mice pups (n= 24) were treated with 4g/Kg/day of MSG or 0.9% saline solution, subcutaneous via, in alternate days, during the first ten days of life (Olney, 1969). They were housed at 25°C, 12h light/dark cycle, food and water ad libitum. After weaning, at 21 days of life, food was weighted twice a week for assessment of relative diet consumption, each week. Each 30 days of life, blood samples were collected by tail to assess fasting glucose, by glucometer (Accu Chek Active Glucometer, Roche, Basilea, Swiss) and fasting triglycerides, by kit according manufacturer instructions (Labtest, MG, Brazil). TyG Index (Simental-Mendía, Rodríguez-Morán, & Guerrero-Romero, 2008) and Lee Index (Bernardis & Patterson, 1968) were also calculated as previously reported. When the animals reached 90 days of life, MSG obese animals were divided into two groups: MCT, treated for 30 days with myricetin (Hunan Nutramax Inc., vine tea extract 98% myricetin) suspended in distilled water at dosage of 50 mg/Kg by gavage, and MSG, which received the same volume of distilled water by gavage. At 120 days of life, animals performed behavioral tests until 135 days of life. After that, they were euthanized for collection of fat pads (retroabdominal, periepididimal and mesenteric), liver and blood samples.

4.2.2 Open Field Test (OFT)

A chamber 30 cm (length) x 30 cm (width) x 30 cm (height), bottom of wood and sides of glass was used. The bottom was virtually divided into 9 squares 10 cm x 10 cm. Rodents were placed onto the central square and shot for 5 minutes. For each animal, fecal boli and rearings were counted at the end of session. After that, time in inner zone and outer zone were calculated on the videos.

4.2.3 Elevated Plus Maze (EPM)

The apparatus used for this test has the shape of a +, with two open arms (30 cm x 5 cm) and two closed arms (30 cm x 5 cm, and walls of 15 cm height), and a central square of 5 cm x 5 cm. The whole apparatus is elevated to a height of 50 cm above the floor. Rodents were placed onto the central square and shot for 5 minutes. After that, videos were double-blinded analyzed and some parameters were calculated: crosses by central square, entries in open arms, entries in close arms and number of rearings.

4.2.4 Morris Water Maze (MWM)

This test was performed in a tank (90 cm of diameter, water 20°C), divided in 4 quadrants, each one with a geometric form (different colors too), and one among them with an acrylic platform placed 2cm above the water. Animals were trained for 5 consecutive days to reach the platform from each geometric form. After finding the platform or 1 minute, animals were placed for 30 seconds. At sixth day, the platform was removed, animals were placed on central point in tank and animals were shot for 2 minutes. After that, time in the matched quadrant and the number of entries in it were calculated. Latency time to reach the platform was measured from training session videos.

4.2.5 Histopathology analysis

Liver samples were sectioned and fixed in paraformaldehyde 10% solution, embedded in paraffin, and cut in a micrometer in slices of 5µm. Tissues sectioned were then stained with hematoxylin-eosin for further analysis. During analysis, NAFLD activity score was applied, according (Kleiner et al., 2005).

4.2.6 Statistical analysis

Student's t-test was performed using the software GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA), using one-way ANOVA with Newmann-Keuls post-test for multiple comparison or unpaired Student t-test. Data were expressed in mean \pm SEM.

4.3 Results

4.3.1 Myricetin attenuates metabolic syndrome and reverts NAFLD in MSG mice

MSG obese mice were lighter than control animals throughout the observational period (Figure 1A). However, since the 30th day of life, MSG mice were obese (361.3 ± 3.9 g/3.cm⁻¹), i.e., they got a greater Lee Index value in comparison to CTR (333.2 ± 4.5 g/3.cm⁻¹). Upon the treatment, MCT mice had a Lee Index value (349.5 ± 6.8 , g/3.cm⁻¹) significantly lower than MSG mice (376.1 ± 9.1 , g/3.cm⁻¹), but still higher than CTR (313.2 ± 3.2 , g/3.cm⁻¹), what demonstrates that myricetin treatment reduced body mass (Figure 1B), albeit has not impacted body weight (Figure 1A). Myricetin also reduced the relative weight of periepididymal fat pad (CTR: 0.25 ± 0.03 ; MSG: 0.52 ± 0.03 ; MCT: 0.39 ± 0.03 g/10 g B.W.; Figure 2B), but not the other ones (Figure 2C and D). Liver weight did not differ among groups (Figure 2A).

Myricetin treatment improved hyperglycemia and hypertriglyceridemia in MSG obese mice (Figure 3). MSG mice had lower serum triglycerides (CTR: 88.2 ± 9.4 mg/dL; MSG: 66.1 ± 3.9 mg/dL) and glucose levels (CTR: 126.7 ± 3.2 mg/dL; MSG: 108.5 ± 4.8 mg/dL) at 30 days old (Figure 3A and B), evolving to hypertriglyceridemia at 60 days old (CTR: 99.6 ± 9.2 mg/dL; MSG: 135.8 ± 11.8 mg/dL). However, MSG obese mice became hyperglycemic only at 135 days old (CTR: 99.8 ± 4.1 mg/dL; MSG: 145.1 ± 14.6 mg/dL). On the other hand, myricetin avoided hyperglycemia development in MCT (100.3 ± 10.4 mg/dL). Besides, 45-day myricetin treatment reverted hypertriglyceridemia (CTR: 70.1 ± 6.0 mg/dL; MSG: 91.6 ± 9.7 mg/dL; MCT: 61.1 ± 9.1 mg/dL). Furthermore, myricetin restored peripheral insulin sensitivity, as depicted from the decreased TyG value (CTR: 8.1 ± 0.1 ; MSG: 8.9 ± 0.2 mg/dL; MCT: 7.9 ± 0.3 mg/dL). Finally, MSG mice displayed microvesicular steatosis, which was completely reverted by myricetin treatment (Figure 4).

4.3.2 Myricetin improves exploratory behavioral but not cognitive outcomes in MSG mice

MSG mice had marked learning and memory deficit when compared to control animals, as verified in MWM (Figure 5). As showed in figure 5A, latency to reach the platform was significantly longer for MSG mice in comparison to CTR from the second to fifth day of training (second day: 45.0 ± 4.4 vs. 8.9 ± 1.7 s; fifth day: 30.3 ± 5.0 vs. 11.3 ± 3.3 s). In addition, MSG mice had fewer entries in target quadrant on their last day of test (CTR: 39.9 ± 2.9 ; MSG: 22.5 ± 3.8 % of entries, Figure 5B). Alike, the time spent in the target quadrant followed the same trend (Figure 5B). Myricetin treatment did not change these parameters, since MCT mice performance in MWM was similar to MSG group (Figure 5).

In OFT, MSG mice exhibited less thigmotaxis than CTR ones, since they remained more time into the inner zone (CTR: 59.2 ± 4.9 ; MSG: 91.7 ± 12.5 s; Figure 6B). Myricetin treatment reverted this behavior because of MCT mice thigmotaxis was even higher than CTR (CTR: 239.9 ± 4.7 ; MSG: 208.3 ± 12.5 ; MCT: 270.1 ± 7.4 s; Figure 6B). Still, MSG mice evacuated more fecal boli than CTR, a behavior attenuated in MCT animals (CTR: 0.4 ± 0.4 ; MSG: 2.8 ± 0.9 ; MCT: 1.7 ± 0.6 ; Figure 6C). However, no statistical difference was found in other parameters like traveled squares and rearing (Figure 6A and D). On the other hand, in EPM, rearing count was significantly lower in MSG group, as compared to CTR and MCT (CTR: 16.7 ± 1.7 ; MSG: 10.4 ± 0.6 ; MCT: 16.4 ± 1.7 ; Figure 6H), although no difference had been found in motor activity parameters (Figure 6E-G).

4.4 Discussion

Myricetin is an abundant flavonol in many foods and medicinal plants (Sultana & Anwar, 2008). Characterized by the presence of three -OH groups at 3',4' and 5' positions on aromatic ring B, myricetin presents greater oxidant scavenger capacity in comparison to its counterparts quercetin and kaempferol (Park, Chong, & Kim, 2016). Myricetin is quite hydrophobic and its absorption from gastrointestinal tract is limited since its bioavailability was calculated in 9.62% upon an acute oral dosis of 50 mg/Kg dose in rats (Dang et al., 2014). Therefore, in this study we demonstrated that 30-day sub-chronic oral treatment with myricetin improved MetS-associated metabolic parameters, such as peripheral insulin resistance, central obesity and hepatic steatosis, as well as increased

exploratory behavior in MSG obese mice. However, myricetin was not able to ameliorate the cognitive deficit characteristically presented by this MetS animal model.

MSG neonatally treated rodents are described as a hypothalamic normo/hypophagic model of obesity (Nikoletseas, 1977; Tanaka, Shimada, Nakao, & Kusunoki, 1978). Besides, as they have described deficiency in growth hormone secretion, these animals have lighter body weight despite higher fat mass when compared to controls (Nemeroff et al., 1977). In this sense, myricetin treatment decreased fat accumulation herein depicted by the lower Lee Index and periepididymal fat pad found in MCT mice. It has been demonstrated that myricetin enhances mitochondrial metabolism and SIRT3 activation in white adipose tissue (Akindehin et al., 2018). In addition, oral administration of myricetin at a higher dose of 100 mg/Kg/day for 16 weeks to high fat diet-fed mice has been shown to diminish all the assessed fat pads (Xia et al., 2019), an effect seemingly ascribed to higher lipolysis subsequent to inhibition of catechol-O-methyltransferase (Zhu & Jia, 2014). Finally, myricetin ameliorates peripheral insulin sensitivity in both white adipose tissue and skeletal muscle by enhancement of GLUT4 protein expression (Liu, Tzeng, Liou, & Lan, 2007).

In this study, peripheral insulin resistance was predicted through calculation of TyG index, whose values demonstrated that myricetin 30-day treatment was able to restore insulin sensitivity in MSG mice. This index has been validated as a reliable tool for insulin sensitivity assessment by comparison to euglycemic clamp and HOMA-IR in both humans and rodents (Guerrero-Romero et al., 2010; Nunes-Souza et al., 2016). Additionally, MCT group also restored serum levels of glucose and triglycerides, as well as hepatic steatosis. MSG obese rodents characteristically present hypertriglyceridemia consequent to microvesicular steatosis and upregulation of VLDL secretory machinery (França et al., 2014). In previous studies, our group demonstrated that an extract from *Syzygium cumini* leaves, which is rich in myricetin derivatives, improved pancreatic β -cells function, peripheral insulin resistance, hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in MSG obese rats (França et al., 2019; Sanches et al., 2016). Nevertheless, a new *S. cumini* leaf extract, containing 20% of its polyphenol-content as myricetin, was shown to prevent hyperglycemia in alloxan-induced diabetic rats (Chagas et al., 2018).

Thus far, we demonstrated that myricetin treatment improved several MetS features found in MSG mice, in a very similar way to that demonstrated for HFD obese mice (Choi, Kang, Lee, & Kim, 2014). However, distinctly from dietary obesity models, MSG obesity is rather based on parasympathetic hypertonia and insulin over-secretion

(Balbo et al., 2000). This fact allows us to speculate that myricetin also interferes on neural mechanisms involved in MetS comorbidities pathophysiology. Therefore, we next assessed myricetin effects on behavioral and cognitive limitations typically found in MSG rodents.

Cognitive deficit found in MSG rodents has been associated to hyperglycemia and tau protein hyperphosphorylation at adulthood (Jin et al., 2018). However, myricetin treatment did not amend MCT mice performance in MWM, despite the abovementioned metabolic improvement. It allows us to suggest that hyperglycemia can be a contributor for neurodegeneration in MSG obesity, but its prevention may not be enough to avoid this outcome. Indeed, pioglitazone treatment decreased β -amyloid aggregates and brain FasL mRNA expression, without an effective impact on spatial learning of MSG rats (Dief, Kamha, Baraka, & Elshorbagy, 2014). Furthermore, MSG treated pups have been described to present delayed neurological reflex (Fisher, Turner, Pineault, Kleim, & Saari, 1991), and cytoarchitectural alterations in pyramidal neurons from hippocampal CA1 at 60 days old (Beas-Zarate, Perez-Vega, & Gonzalez-Burgos, 2002), which seemly makes MSG mice cognitive deficit irresponsible to therapeutic approaches based on metabolic improvement.

Once MSG mice have high serum levels of corticosterone, hypothyroidism and greater serotonin uptake, this model presents lower spontaneous motor activity and anxiety-like behaviors (Kiss et al., 2007; Nemeroff et al., 1977; Quines et al., 2014). Nonetheless, anxiety-like behaviors in MSG rodents are contradictory, because some studies show them to present less thigmotaxis, i.e., “anxiolytic” behavior (Hlinak, Gandalovicova, & Krejci, 2005; Kiss et al., 2007; Kuznetsova et al., 2007). Our study reaches similar findings, since MSG mice exhibited less thigmotaxis in spite of increased defecation, which is a useful indicator of emotional anxiety-like behavior otherwise (Miller, Schultz, Gulati, Su, & Pletcher, 2010). Besides, MSG mice had fewer rearing number than CTR ones in EPM, without differences in open and close arms entries. Rearing is a behavior related to exploratory activity, but it is conflicting in literature whether this behavior is anxious or anxiolytic (Fernandez Espejo, 1997).

Myricetin treatment rescued both thigmotaxis and rearing behaviors in our MSG mice. For the best of our knowledge, this is the first report for the influence of myricetin in exploratory behavior. Thigmotaxis and rearing behaviors are related to brain dopamine concentrations, as well as D1 and D2 activities (Blanchard et al., 1998; Simon, Dupuis, & Costentin, 1994). MSG obese rats were shown to have lower concentrations of

dopamine in the hypothalamus (Johnston, Tesone, & Negro-Vilar, 1984), while amphetamine administration increased locomotor activity in MSG obese female mice (Dawson & Lorden, 1981). The flavonoid silymarin enhanced dopamine and serotonin concentrations in cerebral cortex of depressive mice, improving exploratory behavior in OFT (Thakare et al., 2018). Quercetin, in addition, has been proposed as an inhibitor of monoamine oxidases (Dhiman, Malik, Sobarzo-Sanchez, Uriarte, & Khatkar, 2019), supporting its excitatory property on central nervous system. Thus, considering the aforementioned structural similarities between quercetin and myricetin, our data allow us to suggest that myricetin could share this effect on monoamines metabolism, which would be responsible for the herein assessed behaviors.

In conclusion, our study consistently showed that 45-day myricetin treatment improved several metabolic outcomes associated to MetS in MSG obese mice. However, no improvement was observed for the cognitive deficit typically displayed by this model. In spite of all the literature resources supporting cognitive decline as a mid-to-long term consequence of metabolic disturbances (Chatterjee et al., 2016; de la Monte & Wands, 2008), the inefficacy of myricetin on this outcome deserves further investigations. Future studies must assess whether the neurotoxicity caused by neonatal exposure to MSG injures other neuronal pathways than the currently known hypothalamic nuclei, which would make its cognitive deficit irreversible. Otherwise, the only study evaluating central effects of myricetin was performed in lean mice (Gupta, Sharma, Bansal, & Kaur, 2018), which urges for additional studies using distinct animal models of MetS associated behavioral and cognitive impairments. Last but not least, our study consistently supports the complementary and alternative usage of myricetin as an affordable and healthy therapeutic tool for the treatment of MetS and most of its comorbidities.

Acknowledgments

The authors are especially grateful to LeFisio's staff for all technical support during the experimental procedures. This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico, Tecnológico e Inovação do Estado do Maranhão (FAPEMA; n° APP-UNIVERSAL-01571/16) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance code 001). C.F.F.C. and I.L.S.S. received fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Ahmed, M., & Eun, J. B. (2018). Flavonoids in fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58 (18), 3159-3188.
- Akindehin, S., Jung, Y. S., Kim, S. N., Son, Y. H., Lee, I., Seong, J. K., Jeong, H. W., & Lee, Y. H. (2018). Myricetin Exerts Anti-Obesity Effects through Upregulation of SIRT3 in Adipose Tissue. *Nutrients*, 10 (12).
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., & Smith, S. C., Jr. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120 (16), 1640-1645.
- Balbo, S. L., Gravena, C., Bonfleur, M. L., & de Freitas Mathias, P. C. (2000). Insulin secretion and acetylcholinesterase activity in monosodium l-glutamate-induced obese mice. *Hormone Research in Paediatrics*, 54 (4), 186-191.
- Beas-Zarate, C., Perez-Vega, M., & Gonzalez-Burgos, I. (2002). Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. *Brain Res*, 952 (2), 275-281.
- Bernardis, L., & Patterson, B. (1968). Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of Endocrinology*, 40 (4), 527-528.
- Blanchard, R. J., Hebert, M. A., Dulloog, L., Kaawalooa, N., Nishimura, O., & Blanchard, D. C. (1998). Acute cocaine effects on stereotype and defense: an ethoexperimental approach. *Neurosci Biobehav Rev*, 23 (2), 179-188.
- Boudreau, D. M., Malone, D. C., Raebel, M. A., Fishman, P. A., Nichols, G. A., Feldstein, A. C., Boscoe, A. N., Ben-Joseph, R. H., Magid, D. J., & Okamoto, L. J. (2009). Health care utilization and costs by metabolic syndrome risk factors. *Metab Syndr Relat Disord*, 7 (4), 305-314.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*, 22 (5), 749-760.
- Chagas, V. T., Coelho, R. M. R. d. S., Gaspar, R. S., da Silva, S. A., Mastrogiovanni, M., Mendonça, C. d. J., Ribeiro, M. N. d. S., Paes, A. M. d. A., & Trostchansky, A. (2018). Protective effects of a polyphenol-rich extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaf on oxidative stress-induced diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2018.
- Chatterjee, S., Peters, S. A., Woodward, M., Mejia Arango, S., Batty, G. D., Beckett, N., Beiser, A., Borenstein, A. R., Crane, P. K., Haan, M., Hassing, L. B., Hayden, K. M., Kiyohara, Y., Larson, E. B., Li, C. Y., Ninomiya, T., Ohara, T., Peters, R., Russ, T. C., Seshadri, S., Strand, B. H., Walker, R., Xu, W., & Huxley, R. R. (2016). Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia. *Diabetes Care*, 39 (2), 300-307.
- Choi, H. N., Kang, M. J., Lee, S. J., & Kim, J. I. (2014). Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Nutr Res Pract*, 8 (5), 544-549.
- Coelho, C., França, L., Nascimento, J., Dos Santos, A., Azevedo-Santos, A., Nascimento, F., & Paes, A. (2018). Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver

- disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice. *Journal of developmental origins of health and disease*, 1-8.
- Dang, Y., Lin, G., Xie, Y., Duan, J., Ma, P., Li, G., & Ji, G. (2014). Quantitative determination of myricetin in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its absolute bioavailability. *Drug Res (Stuttg)*, 64 (10), 516-522.
- Dawson, R., Jr., & Lorden, J. F. (1981). Behavioral and neurochemical effects of neonatal administration of monosodium L-glutamate in mice. *J Comp Physiol Psychol*, 95 (1), 71-84.
- de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *Journal of diabetes science and technology*, 2 (6), 1101-1113.
- Dhiman, P., Malik, N., Sobarzo-Sanchez, E., Uriarte, E., & Khatkar, A. (2019). Quercetin and Related Chromenone Derivatives as Monoamine Oxidase Inhibitors: Targeting Neurological and Mental Disorders. *Molecules*, 24 (3).
- Dief, A. E., Kamha, E. S., Baraka, A. M., & Elshorbagy, A. K. (2014). Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: A potential role for cyclic AMP protein kinase. *NeuroToxicology*, 42, 76-82.
- Fernandez Espejo, E. (1997). Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Brain Res*, 86 (1), 105-112.
- Fisher, K. N., Turner, R. A., Pineault, G., Kleim, J., & Saari, M. J. (1991). The postweaning housing environment determines expression of learning deficit associated with neonatal monosodium glutamate (M.S.G.). *Neurotoxicol Teratol*, 13 (5), 507-513.
- França, L. M., Coêlho, C. F. F., Freitas, L. N. C., Souza, I. L. S., Chagas, V. T., Debbas, V., Lima, T. M. d., Souza, H. P. d., Laurindo, F. R. M., & Paes, A. M. d. A. (2019). Syzygium cumini Leaf Extract Reverts Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2019.
- França, L. M., Freitas, L. N. C., Chagas, V. T., Coêlho, C. F. F., Barroso, W. A., Costa, G. C., Silva, L. A., Debbas, V., Laurindo, F. R. M., & de Andrade Paes, A. M. (2014). Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 443 (2), 725-730.
- Guerrero-Romero, F., Simental-Mendia, L. E., Gonzalez-Ortiz, M., Martinez-Abundis, E., Ramos-Zavala, M. G., Hernandez-Gonzalez, S. O., Jacques-Camarena, O., & Rodriguez-Moran, M. (2010). The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (7), 3347-3351.
- Gupta, V., Sharma, R., Bansal, P., & Kaur, G. (2018). Bioactivity-guided isolation of potent anxiolytic compounds from leaves of Citrus paradisi. *Ayu*, 39 (1), 21-28.
- Hlinak, Z., Gandalovicova, D., & Krejci, I. (2005). Behavioral deficits in adult rats treated neonatally with glutamate. *Neurotoxicol Teratol*, 27 (3), 465-473.
- Jaacks, L. M., Vandevijvere, S., Pan, A., McGowan, C. J., Wallace, C., Imamura, F., Mozaffarian, D., Swinburn, B., & Ezzati, M. (2019). The obesity transition: stages of the global epidemic. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 7 (3), 231-240.
- Jin, L., Lin, L., Li, G. Y., Liu, S., Luo, D. J., Feng, Q., Sun, D. S., Wang, W., Liu, J. J., Wang, Q., Ke, D., Yang, X. F., & Liu, G. P. (2018). Monosodium glutamate exposure during the neonatal period leads to cognitive deficits in adult Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett*, 682, 39-44.

- Johnston, C. A., Tesone, M., & Negro-Vilar, A. (1984). Steroid-monoamine feedback interactions in discrete brain regions using as a model the monosodium glutamate (MSG)-lesioned rat. *Life Sci*, *34* (13), 1287-1297.
- Kiss, T., Hauser, D., Tamás, A., Lubics, A., Rácz, B., Horvath, Z., Farkas, J., Zimmermann, F., Stepien, A., Lengvari, I., & Reglodi, D. (2007). Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotoxicity research*, *12*, 85-93.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y. C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., & Sanyal, A. J. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *41* (6), 1313-1321.
- Kuznetsova, E. G., Amstislavskaya, T. G., Bulygina, V. V., Il'nitskaya, S. I., Tibeikina, M. A., & Skrinskaya, Y. A. (2007). Effects of administration of sodium glutamate during the neonatal period on behavior and blood corticosterone levels in male mice. *Neurosci Behav Physiol*, *37* (8), 827-833.
- Liu, I. M., Tzeng, T. F., Liou, S. S., & Lan, T. W. (2007). Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. *Life Sci*, *81* (21-22), 1479-1488.
- Mansur, R. B., Brietzke, E., & McIntyre, R. S. (2015). Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, *52*, 89-104.
- Miller, B. H., Schultz, L. E., Gulati, A., Su, A. I., & Pletcher, M. T. (2010). Phenotypic characterization of a genetically diverse panel of mice for behavioral despair and anxiety. *PLoS One*, *5* (12), e14458.
- Nakanishi, Y., Tsuneyama, K., Fujimoto, M., Salunga, T. L., Nomoto, K., An, J. L., Takano, Y., Iizuka, S., Nagata, M., Suzuki, W., Shimada, T., Aburada, M., Nakano, M., Selmi, C., & Gershwin, M. E. (2008). Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. *J Autoimmun*, *30* (1-2), 42-50.
- Nemeroff, C. B., Grant, L. D., Bissette, G., Ervin, G. N., Harrell, L. E., & Prange Jr, A. J. (1977). Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. *Psychoneuroendocrinology*, *2* (2), 179-196.
- Nikoletseas, M. M. (1977). Obesity in exercising, hypophagic rats treated with monosodium glutamate. *Physiol Behav*, *19* (6), 767-773.
- Nunes-Souza, V., Cesar-Gomes, C. J., Da Fonseca, L. J., Guedes Gda, S., Smaniotto, S., & Rabelo, L. A. (2016). Aging Increases Susceptibility to High Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in C57BL/6 Mice: Improvement in Glycemic and Lipid Profile after Antioxidant Therapy. *Oxid Med Cell Longev*, *2016*, 1987960.
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, *164* (3880), 719-721.
- Pallauf, K., Duckstein, N., Hasler, M., Klotz, L. O., & Rimbach, G. (2017). Flavonoids as Putative Inducers of the Transcription Factors Nrf2, FoxO, and PPARgamma. *Oxid Med Cell Longev*, *2017*, 4397340.
- Park, K.-S., Chong, Y., & Kim, M. K. (2016). Myricetin: biological activity related to human health. *Applied Biological Chemistry*, *59* (2), 259-269.
- Quines, C. B., Rosa, S. G., Da Rocha, J. T., Gai, B. M., Bortolatto, C. F., Duarte, M. M., & Nogueira, C. W. (2014). Monosodium glutamate, a food additive, induces

- depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats. *Life Sci*, 107 (1-2), 27-31.
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*, 22, 19-34.
- Russo, B., Picconi, F., Malandrucco, I., & Frontoni, S. (2019). Flavonoids and Insulin-Resistance: From Molecular Evidences to Clinical Trials. *Int J Mol Sci*, 20 (9).
- Sanches, J. R., Franca, L. M., Chagas, V. T., Gaspar, R. S., dos Santos, K. A., Goncalves, L. M., Sloboda, D. M., Holloway, A. C., Dutra, R. P., & Carneiro, E. M. (2016). Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-glutamate-induced obese rats. *Frontiers in pharmacology*, 7, 48.
- Sasaki, Y., Shimada, T., Iizuka, S., Suzuki, W., Makihara, H., Teraoka, R., Tsuneyama, K., Hokao, R., & Aburada, M. (2011). Effects of bezafibrate in nonalcoholic steatohepatitis model mice with monosodium glutamate-induced metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol*, 662 (1-3), 1-8.
- Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Morán, M., & Guerrero-Romero, F. (2008). The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metab Syndr Relat Disord*, 6 (4), 299-304.
- Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res*, 61 (1), 59-64.
- Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem*, 108 (3), 879-884.
- Tanaka, K., Shimada, M., Nakao, K., & Kusunoki, T. (1978). Hypothalamic lesion induced by injection of monosodium glutamate in suckling period and subsequent development of obesity. *Exp Neurol*, 62 (1), 191-199.
- Thakare, V. N., Patil, R. R., Oswal, R. J., Dhakane, V. D., Aswar, M. K., & Patel, B. M. (2018). Therapeutic potential of silymarin in chronic unpredictable mild stress induced depressive-like behavior in mice. *J Psychopharmacol*, 32 (2), 223-235.
- Tordoff, M. G., Aleman, T. R., & Murphy, M. C. (2012). No effects of monosodium glutamate consumption on the body weight or composition of adult rats and mice. *Physiol Behav*, 107 (3), 338-345.
- Van De Wier, B., Koek, G. H., Bast, A., & Haenen, G. R. (2017). The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57 (4), 834-855.
- Xia, S. F., Qiu, Y. Y., Chen, L. M., Jiang, Y. Y., Huang, W., Xie, Z. X., Tang, X., & Sun, J. (2019). Myricetin alleviated hepatic steatosis by acting on microRNA-146b/thyroid hormone receptor b pathway in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Food Funct*.
- Yamazaki, Y., Usui, I., Kanatani, Y., Matsuya, Y., Tsuneyama, K., Fujisaka, S., Bukhari, A., Suzuki, H., Senda, S., Imanishi, S., Hirata, K., Ishiki, M., Hayashi, R., Urakaze, M., Nemoto, H., Kobayashi, M., & Tobe, K. (2009). Treatment with SRT1720, a SIRT1 activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297 (5), E1179-1186.
- Younossi, Z. M., Golabi, P., de Avila, L., Paik, J. M., Srishord, M., Fukui, N., Qiu, Y., Burns, L., Afendy, A., & Nader, F. (2019). The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*.

Zhou, B., Lu, Y., Hajifathalian, K., Bentham, J., Di Cesare, M., Danaei, G., Bixby, H., Cowan, M. J., Ali, M. K., Taddei, C., Lo, W. C., Reis-Santos, B., Stevens, G. A., Riley, L. M., Miranda, J. J., Bjerregaard, P., Rivera, J. A., Fouad, H. M., Ma, G., Mbanya, J. C., McGarvey, S. T., Mohan, V., Onat, A., Pilav, A., Ramachandran, A., Romdhane, H. B., Paciorek, C. J., Bennett, J. E., Ezzati, M., Abdeen, Z. A., Abdul Kadir, K., Abu-Rmeileh, N. M., Acosta-Cazares, B., Adams, R., Aekplakorn, W., Aguilar-Salinas, C. A., Agyemang, C., Ahmadvand, A., Al-Othman, A. R., Alkerwi, A., Amouyel, P., Amuzu, A., Andersen, L. B., Anderssen, S. A., Anjana, R. M., Aounallah-Skhiri, H., Aris, T., Arlappa, N., Arveiler, D., Assah, F. K., Avdicová, M., Azizi, F., Balakrishna, N., Bandosz, P., Barbagallo, C. M., Barceló, A., Batieha, A. M., Baur, L. A., Romdhane, H. B., Benet, M., Bernabe-Ortiz, A., Bharadwaj, S., Bhargava, S. K., Bi, Y., Bjerregaard, P., Bjertness, E., Bjertness, M. B., Björkelund, C., Blokstra, A., Bo, S., Boehm, B. O., Boissonnet, C. P., Bovet, P., Brajkovich, I., Breckenkamp, J., Brenner, H., Brewster, L. M., Brian, G. R., Bruno, G., Bugge, A., Cabrera de León, A., Can, G., Cândido, A. P., Capuano, V., Carlsson, A. C., Carvalho, M. J., Casanueva, F. F., Casas, J. P., Caserta, C. A., Castetbon, K., Chamukuttan, S., Chaturvedi, N., Chen, C. J., Chen, F., Chen, S., Cheng, C. Y., Chetrit, A., Chiou, S. T., Cho, Y., Chudek, J., Cifkova, R., Claessens, F., Concin, H., Cooper, C., Cooper, R., Costanzo, S., Cotel, D., Cowell, C., Crujeiras, A. B., D'Arrigo, G., Dallongeville, J., Dankner, R., Dauchet, L., de Gaetano, G., De Henauw, S., Deepa, M., Dehghan, A., Deschamps, V., Dhana, K., Di Castelnuovo, A. F., Djalalinia, S., Doua, K., Drygas, W., Du, Y., Dzerve, V., Egbagbe, E. E., Eggertsen, R., El Ati, J., Elosua, R., Erasmus, R. T., Erem, C., Ergor, G., Eriksen, L., Escobedo-de la Peña, J., Fall, C. H., Farzadfar, F., Felix-Redondo, F. J., Ferguson, T. S., Fernández-Bergés, D., Ferrari, M., Ferreccio, C., Feskens, E. J., Finn, J. D., Föger, B., Foo, L. H., Forslund, A. S., Fouad, H. M., Francis, D. K., Franco Mdo, C., Franco, O. H., Frontera, G., Furusawa, T., Gaciong, Z., Garnett, S. P., Gaspoz, J. M., Gasull, M., Gates, L., Geleijnse, J. M., Ghasemian, A., Ghimire, A., Giampaoli, S., Gianfagna, F., Giovannelli, J., Giwerzman, A., Gross, M. G., González Rivas, J. P., Gorbea, M. B., Gottrand, F., Grafnetter, D., Grodzicki, T., Grøntved, A., Gruden, G., Gu, D., Guan, O. P., Guerrero, R., Guessous, I., Guimaraes, A. L., Gutierrez, L., Hambleton, I. R., Hardy, R., Hari Kumar, R., Hata, J., He, J., Heidemann, C., Herrala, S., Hihtaniemi, I. T., Ho, S. Y., Ho, S. C., Hofman, A., Hormiga, C. M., Horta, B. L., Houti, L., Howitt, C., Htay, T. T., Htet, A. S., Htike, M. M., Hu, Y., Hussieni, A. S., Huybrechts, I., Hwalla, N., Iacoviello, L., Iannone, A. G., Ibrahim, M. M., Ikeda, N., Ikram, M. A., Irazola, V. E., Islam, M., Iwasaki, M., Jacobs, J. M., Jafar, T., Jamil, K. M., Jasienska, G., Jiang, C. Q., Jonas, J. B., Joshi, P., Kafatos, A., Kalter-Leibovici, O., Kasaeian, A., Katz, J., Kaur, P., Kavousi, M., Keinänen-Kiukaanniemi, S., Kelishadi, R., Kengne, A. P., Kersting, M., Khader, Y. S., Khalili, D., Khang, Y. H., Kiechl, S., Kim, J., Kolsteren, P., Korrovtis, P., Kratzer, W., Kromhout, D., Kujala, U. M., Kula, K., Kyobutungi, C., Laatikainen, T., Lachat, C., Laid, Y., Lam, T. H., Landrove, O., Lanska, V., Lappas, G., Laxmaiah, A., Leclercq, C., Lee, J., Lee, J., Lehtimäki, T., Lekhraj, R., León-Muñoz, L. M., Li, Y., Lim, W. Y., Lima-Costa, M. F., Lin, H. H., Lin, X., Lissner, L., Lorbeer, R., Lozano, J. E., Luksiene, D., Lundqvist, A., Lytsy, P., Ma, G., Machado-Coelho, G. L., Machi, S., Maggi, S., Magliano, D. J., Makdisse, M., Mallikharjuna Rao, K., Manios, Y., Manzato, E., Margozzini, P., Marques-Vidal, P., Martorell, R., Masoodi, S. R., Mathiesen, E. B., Matsha, T. E., Mbanya, J. C., McFarlane, S. R., McGarvey, S. T.,

- McLachlan, S., McNulty, B. A., Mediene-Benchekor, S., Meirhaeghe, A., Menezes, A. M., Merat, S., Meshram, I., Mi, J., Miquel, J. F., Miranda, J. J., Mohamed, M. K., Mohammad, K., Mohammadifard, N., Mohan, V., Mohd Yusoff, M. F., Møller, N. C., Molnár, D., Mondo, C. K., Morejon, A., Moreno, L. A., Morgan, K., Moschonis, G., Mossakowska, M., Mostafa, A., Mota, J., Motta, J., Mu, T. T., Muiesan, M. L., Müller-Nurasyid, M., Mursu, J., Nagel, G., Námešná, J., Nang, E. E., NangThetia, V. B., Navarrete-Muñoz, E. M., Ndiaye, N. C., Nenko, I., Nervi, F., Nguyen, N. D., Nguyen, Q. N., Nieto-Martínez, R. E., Ning, G., Ninomiya, T., Noale, M., Noto, D., Nsour, M. A., Ochoa-Avilés, A. M., Oh, K., Onat, A., Ordunez, P., Osmond, C., Otero, J. A., Owusu-Dabo, E., Pahomova, E., Palmieri, L., Panda-Jonas, S., Panza, F., Parsaeian, M., Peixoto, S. V., Pelletier, C., Peltonen, M., Peters, A., Peykari, N., Pham, S. T., Pilav, A., Pitakaka, F., Piwonska, A., Piwonski, J., Plans-Rubió, P., Porta, M., Portegies, M. L., Poustchi, H., Pradeepa, R., Price, J. F., Punab, M., Qasrawi, R. F., Qorbani, M., Radisauskas, R., Rahman, M., Raitakari, O., Rao, S. R., Ramachandran, A., Ramke, J., Ramos, R., Rampal, S., Rathmann, W., Redon, J., Reganit, P. F., Rigo, F., Robinson, S. M., Robitaille, C., Rodríguez-Artalejo, F., Rodríguez-Perez Mdel, C., Rodríguez-Villamizar, L. A., Rojas-Martinez, R., Ronkainen, K., Rosengren, A., Rubinstein, A., Rui, O., Ruiz-Betancourt, B. S., Russo Horimoto, R. V., Rutkowski, M., Sabanayagam, C., Sachdev, H. S., Saidi, O., Sakarya, S., Salanave, B., Salonen, J. T., Salvetti, M., Sánchez-Abanto, J., Santos, D., dos Santos, R. N., Santos, R., Saramies, J. L., Sardinha, L. B., Sarrafzadegan, N., Saum, K. U., Scazufca, M., Schargrodsy, H., Scheidt-Nave, C., Sein, A. A., Sharma, S. K., Shaw, J. E., Shibuya, K., Shin, Y., Shiri, R., Siantar, R., Sibai, A. M., Simon, M., Simons, J., Simons, L. A., Sjostrom, M., Slowikowska-Hilczer, J., Slusarczyk, P., Smeeth, L., Snijder, M. B., So, H. K., Sobngwi, E., Söderberg, S., Solfrizzi, V., Sonestedt, E., Soumare, A., Staessen, J. A., Stathopoulou, M. G., Steene-Johannessen, J., Stehle, P., Stein, A. D., Stessman, J., Stöckl, D., Stokwiszewski, J., Stronks, K., Strufaldi, M. W., Sun, C. A., Sundström, J., Sung, Y. T., Suriyawongpaisal, P., Sy, R. G., Tai, E. S., Tamosiunas, A., Tang, L., Tarawneh, M., Tarqui-Mamani, C. B., Taylor, A., Theobald, H., Thijs, L., Thuesen, B. H., Tolonen, H. K., Tolstrup, J. S., Topbas, M., Torrent, M., Traissac, P., Trinh, O. T., Tulloch-Reid, M. K., Tuomainen, T. P., Turley, M. L., Tzourio, C., Ueda, P., Ukoli, F. A., Ulmer, H., Uusitalo, H. M., Valdivia, G., Valvi, D., van Rossem, L., van Valkengoed, I. G., Vanderschueren, D., Vanuzzo, D., Vega, T., Velasquez-Melendez, G., Veronesi, G., Verschuren, W. M., Verstraeten, R., Viet, L., Vioque, J., Virtanen, J. K., Visvikis-Siest, S., Viswanathan, B., Vollenweider, P., Voutilainen, S., Vrijheid, M., Wade, A. N., Wagner, A., Walton, J., Wan Mohamud, W. N., Wang, F., Wang, M. D., Wang, Q., Wang, Y. X., Wannamethee, S. G., Weerasekera, D., Whincup, P. H., Widhalm, K., Wiecek, A., Wijga, A. H., Wilks, R. J., Willeit, J., Wilsgaard, T., Wojtyniak, B., Wong, T. Y., Woo, J., Woodward, M., Wu, F. C., Wu, S. L., Xu, H., Yan, W., Yang, X., Ye, X., Yoshihara, A., Younger-Coleman, N. O., Zambon, S., Zargar, A. H., Zdrojewski, T., Zhao, W., Zheng, Y., & Zúñiga Cisneros, J. (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*, 387 (10027), 1513-1530.
- Zhu, X., & Jia, Y. H. (2014). Inhibition of catechol-o-methyltransferase (COMT) by myricetin, dihydromyricetin, and myricitrin. *Pharmazie*, 69 (3), 183-186.

Figures and legends

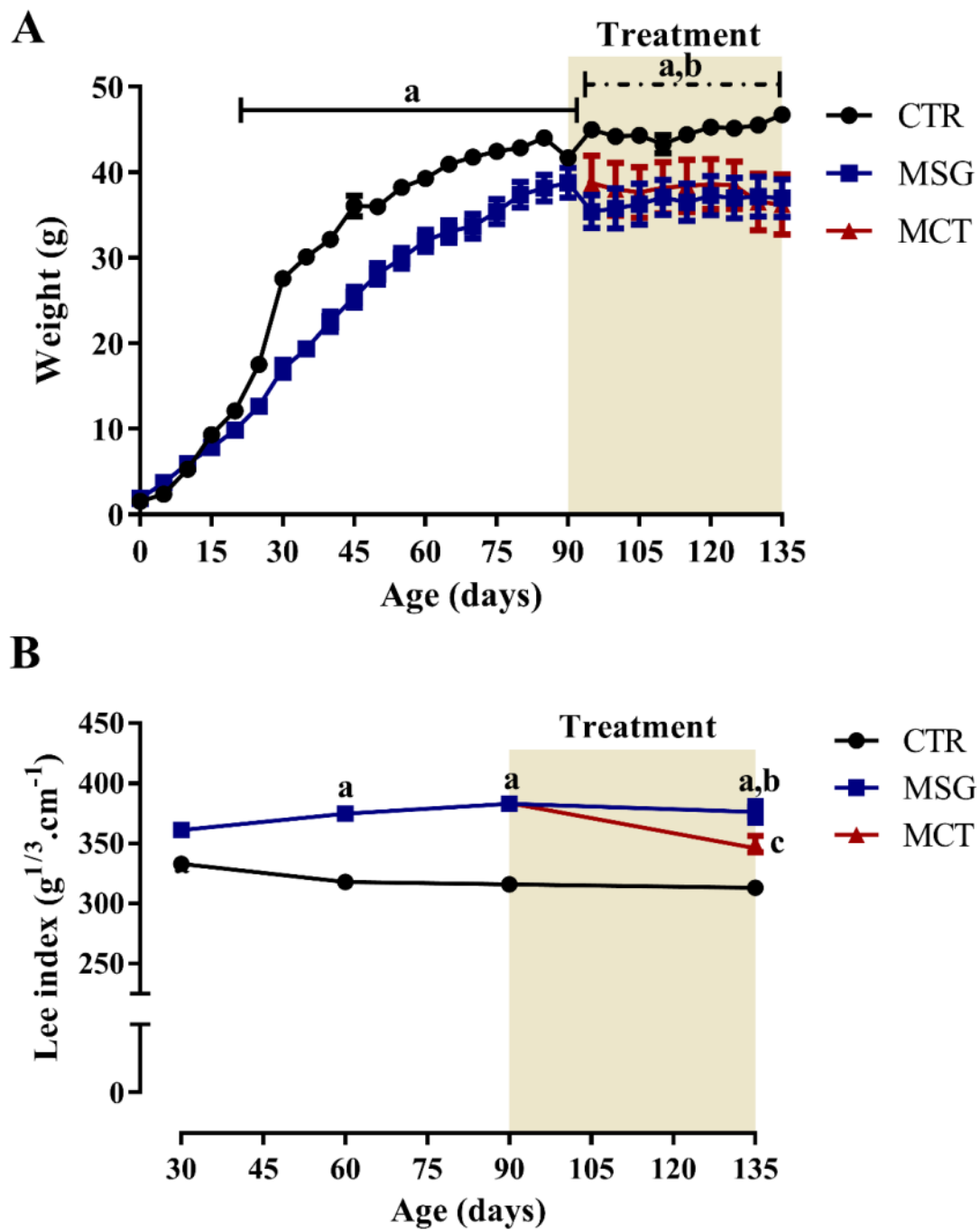


Figure 1. Body weight curve and obesity development by Lee Index. A. Body weight curve. **B.** Lee Index each 30 days of life. $N = 8-16$, mean \pm SEM, a $p < 0.05$ MSG vs CTR, b $p < 0.05$ MSG vs. MCT, c $p < 0.05$ MCT vs. CTR. Unpaired Student's t test for MSG vs. CTR (ages 30-90 days old). One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test (135-day old analysis).

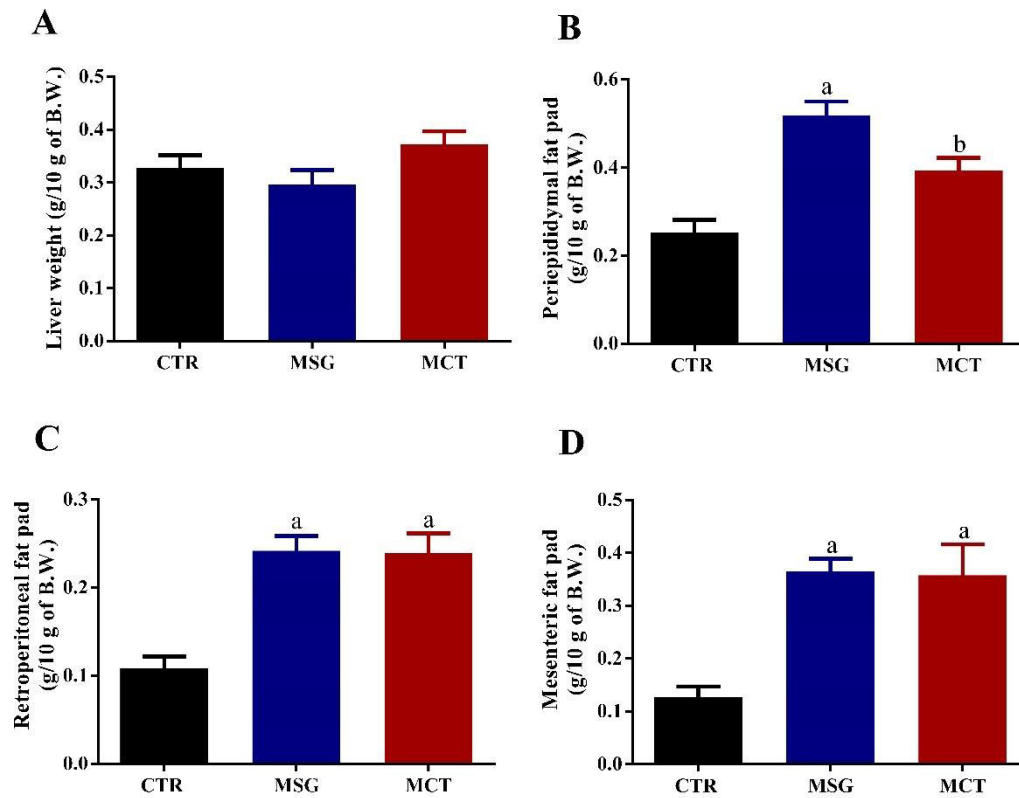


Figure 2. Morphometric parameters. A. Liver relative weight. B. Periepididymal fat pad. C. Retroperitoneal fat pad D. Mesenteric fat pad. N = 8, mean \pm SEM. a $p < 0.05$ MSG vs CTR, b $p < 0.05$ MSG vs. MCT. One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test. B.W. = body weight.

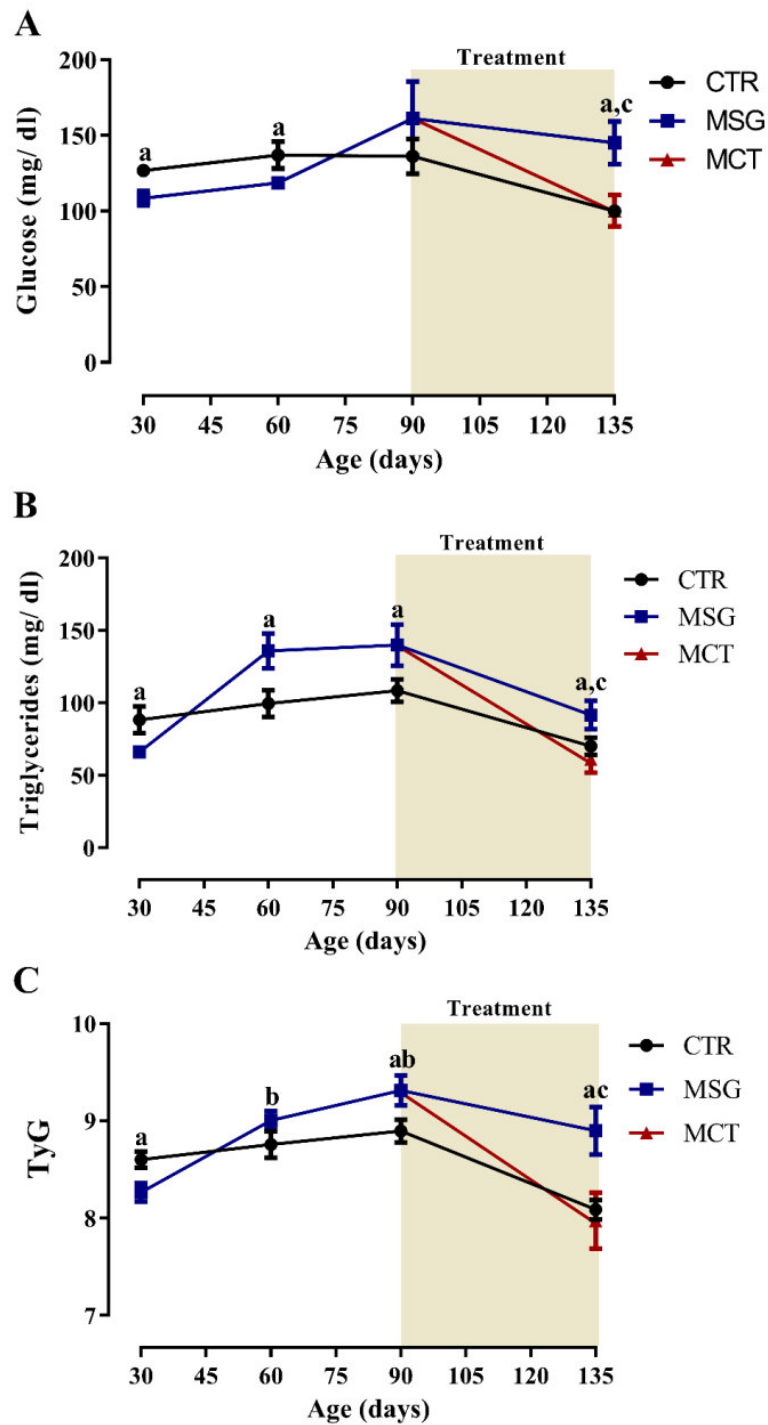


Figure 3. Impact of myricetin 30-day treatment on MSG dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus.

A. Evolutionary curve for glycemia during mice lifetime. **B.** Evolutionary curve for triglyceridemia. **C.** Prediction of peripheral insulin resistance by TyG value. N = 8-16, mean \pm SEM, a $p < 0.05$ MSG vs CTR, b $p < 0.05$ MSG vs. MCT, c $p < 0.05$ MCT vs. CTR. Unpaired Student's *t* test for MSG vs. CTR (ages 30-90 days old). One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test (120-day old analysis).

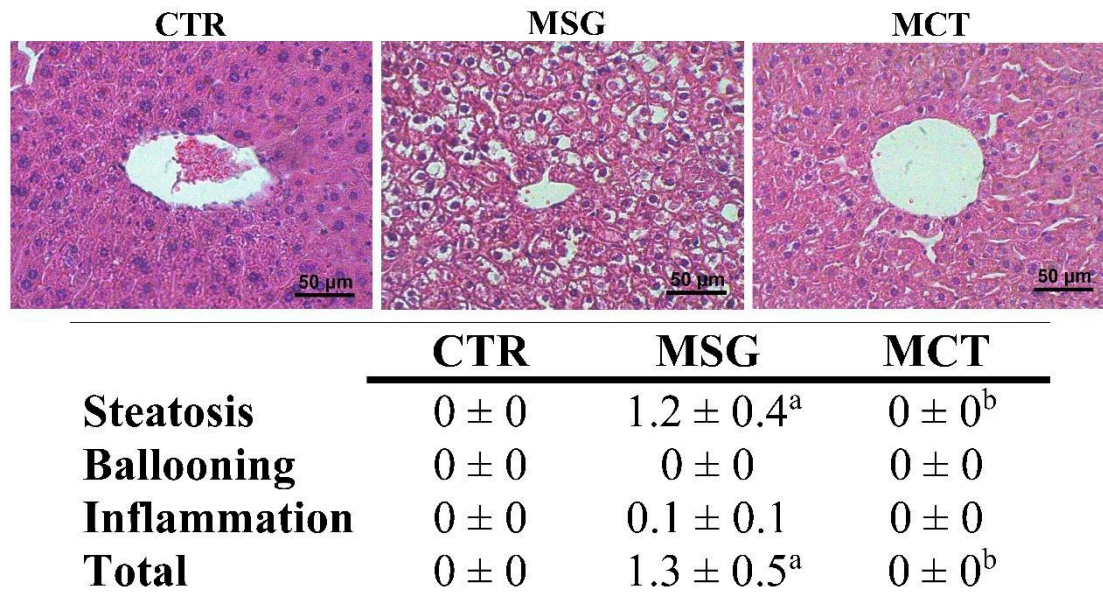


Figure 4. Myricetin treatment reverts microvesicular steatosis of MSG obesity. Histopathology followed by NAFLD Activity Score. N = 8, mean ± SEM. a p <0.05 MSG vs CTR, b p <0.05 MSG vs. MCT, c p <0.05 MCT vs. CTR. One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test. H&E, 400x.

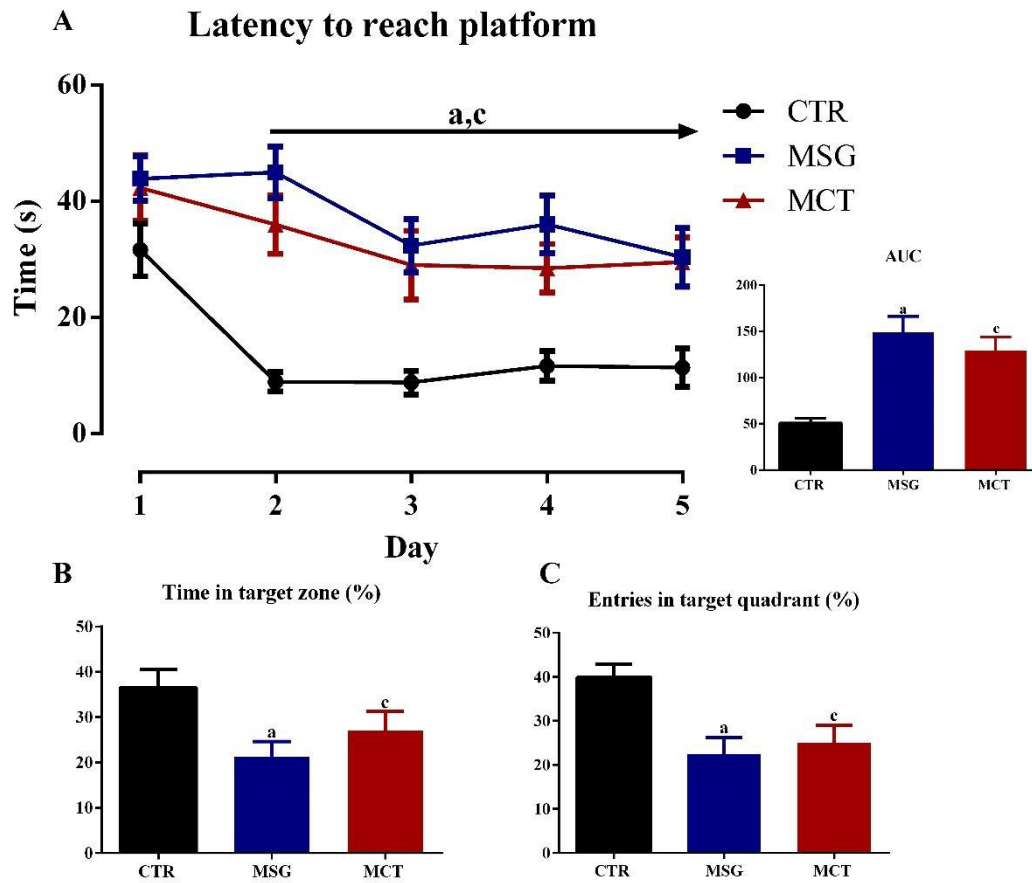
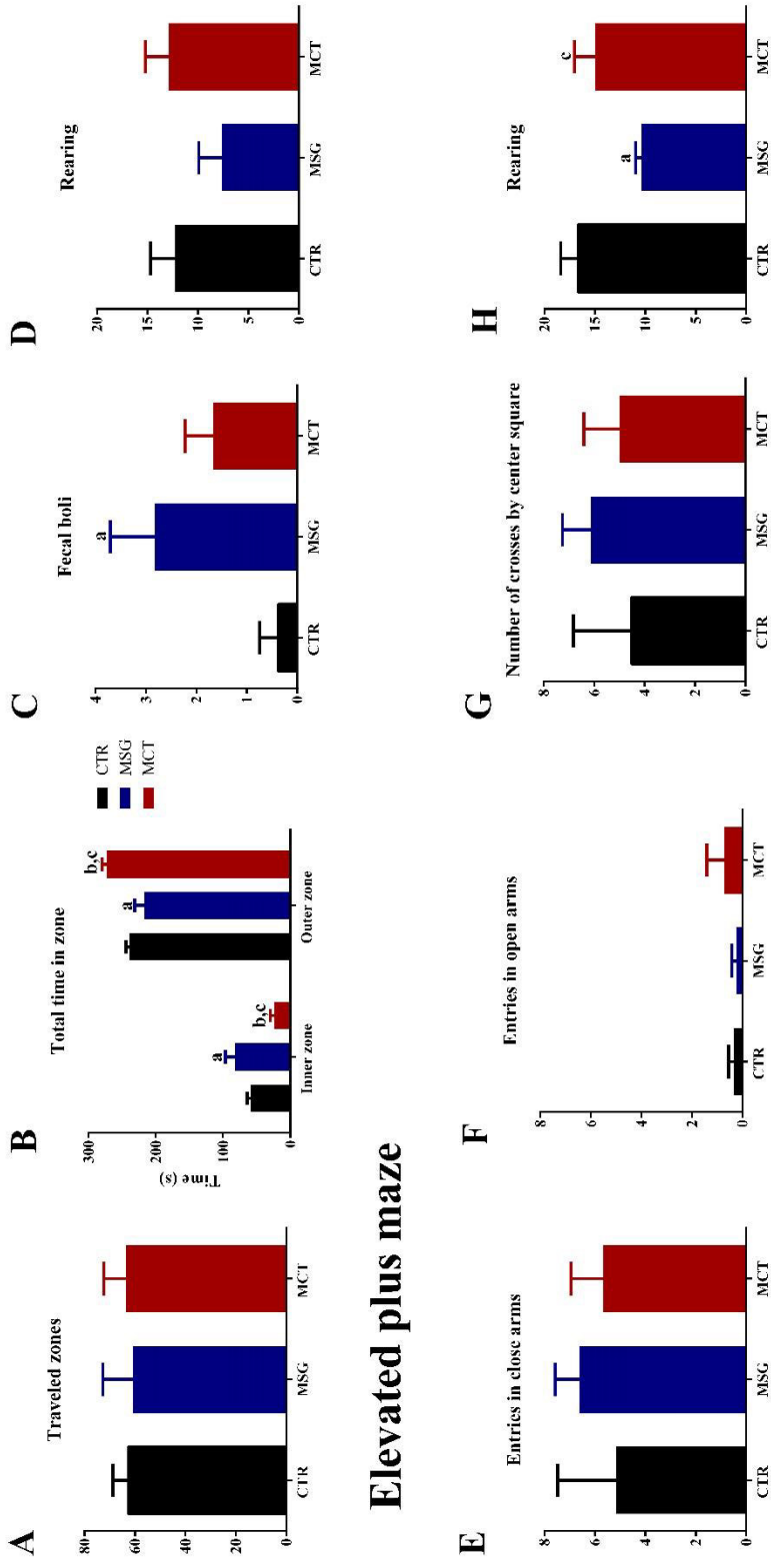


Figure 5. MSG mice exhibited impaired learning and spatial memory detected by Morris Water Maze. A. Latency to reach the platform. **B** Percentage of time expended in target zone. **C.** Percentage of entries into the target quadrant. $N = 8$, mean \pm SEM. a $p < 0.05$ MSG vs CTR, c $p < 0.05$ MCT vs. CTR. One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test.

Open field



Elevated plus maze

Figure 6. MSG mice presented defective thigmotaxis and less exploratory behavior, and myricetin treatment improved this frame. Open field test (A-D). A. Locomotor activity by traveled zones. **B.** Time expended in each zone of open field (thigmotaxis evaluation). **C.** Defecation. **D.** Rearing. **Elevated plus maze (E-H).** **E.** Entries in close arms. **F.** Entries in open arms. **G.** Number of crosses by center square. **H.** Rearing. N = 6-8, mean \pm SEM. a $p < 0.05$ MSG vs CTR, b $p < 0.05$ MSG vs. MCT, c $p < 0.05$ MCT vs. CTR. One-way ANOVA with Newman-Keuls' post-test.

5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

5.2 Artigos publicados em periódicos durante o mestrado

- França LM, **Coêlho CFF**, Freitas LNC., Souza ILS, Chagas VT, Debbas, V., Lima TM, Souza HP, Laurindo FRM, Paes AMA. (2019). *Syzygium cumini* Leaf Extract Reverts Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol.2019. DOI:10.1155/2019/9417498 Fator de impacto: 4.936 (**ANEXO C**)
- Sousa RML, Ribeiro NLX., Pinto, BAS., Sanches, JR, da Silva, MU, **Coêlho CFF**, França LM, Neto JAF, Paes, AMA (2018). Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats. *Nutrition & metabolism*,15(1), 53. DOI: 10.1186/s12986-018-0290-y Fator de impacto: 2.518 (**ANEXO D**)
- Flister KFT, Pinto BAS, França LM, **Coêlho CFF**, dos Santos, PC, Vale CC, Kajihara D, Debbas V, Laurindo FRM, Paes, AMA (2018). Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 62, 155-166. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2018.09.007 Fator de impacto: 4.518 (**ANEXO E**)
- **Coêlho CFF**, França LM, Nascimento, JR, Dos Santos, AM, Azevedo-Santos APS, Nascimento FRF, Paes AMA. (2018). Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice. *Journal of developmental origins of health and disease*, 1-8. DOI: 10.1017/S2040174418000284 Fator de impacto: 2.215 (**ANEXO F**)

5.2 Participação em programas de internacionalização durante o mestrado

Durante o período do mestrado, o aluno foi selecionado para participar do curso *Impact of processing food in human health*, realizado nas universidades UniLaSalle, em Beauvais e Université de Lille 2, em Lille, na França, no mês de julho em 2019 (**ANEXO G**). O aluno foi aprovado a partir de edital do Campus France (Edital Escolas de Verão França Excelência 2019), e contou com ajuda de custo pela Embaixada da França no Brasil. Durante o curso, o aluno teve a oportunidade de estudar sobre o impacto do processamento de alimentos no desenvolvimento de doenças na infância e na fase senil.

REFERÊNCIAS

AKINDEHIN, S.; JUNG, Y. S.; KIM, S. N.; SON, Y. H. *et al.* Myricetin Exerts Anti-Obesity Effects through Upregulation of SIRT3 in Adipose Tissue. **Nutrients**, 10, n. 12, Dec 12 2018.

ATTIE, A. D.; SCHERER, P. E. Adipocyte metabolism and obesity. **J Lipid Res**, 50 Suppl, p. S395-399, Apr 2009.

BALBO, S. L.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, R. A.; BONFLEUR, M. L. *et al.* Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, 31, n. 2, p. 142-148, 2007.

BALBO, S. L.; GRAVENA, C.; BONFLEUR, M. L.; DE FREITAS MATHIAS, P. C. Insulin secretion and acetylcholinesterase activity in monosodium l-glutamate-induced obese mice. **Hormone Research in Paediatrics**, 54, n. 4, p. 186-191, 2000.

BEAS-ZARATE, C.; PEREZ-VEGA, M.; GONZALEZ-BURGOS, I. Neonatal exposure to monosodium L-glutamate induces loss of neurons and cytoarchitectural alterations in hippocampal CA1 pyramidal neurons of adult rats. **Brain Res**, 952, n. 2, p. 275-281, Oct 18 2002.

BEDSE, G.; DI DOMENICO, F.; SERVIDDIO, G.; CASSANO, T. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: current knowledge. **Frontiers in neuroscience**, 9, 2015.

BONNARD, C.; DURAND, A.; PEYROL, S.; CHANSEAUME, E. *et al.* Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. **The Journal of clinical investigation**, 118, n. 2, p. 789-800, 2008.

BRASIL, M. d. S. Ministério da Saúde. *Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.* : Ministério da Saúde Brasília 2019.

BRASIL, R. *Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.* **Portal. Saúde**, 2009.

BRAY, G. A.; POPKIN, B. M. Dietary sugar and body weight: have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes?: health be damned! Pour on the sugar. **Diabetes Care**, 37, n. 4, p. 950-956, Apr 2014.

BRUNT, E. M.; WONG, V. W.; NOBILI, V.; DAY, C. P. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease. **Nat Rev Dis Primers**, 1, p. 15080, Dec 17 2015.

CANTELLI, K.; SOARES, G.; RIBEIRO, R.; BALBO, S. *et al.* Duodenal-jejunal bypass normalizes pancreatic islet proliferation rate and function but not hepatic steatosis in hypothalamic obese rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 50, n. 5, 2017.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, 22, n. 5, p. 749-760, 1997.

CARDINAL, T. R.; VIGO, A.; DUNCAN, B. B.; MATOS, S. M. A. *et al.* Optimal cut-off points for waist circumference in the definition of metabolic syndrome in Brazilian adults: baseline analyses of the Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Diabetology & metabolic syndrome**, 10, p. 49-49, 2018.

CERNEA, S.; ROIBAN, A. L.; BOTH, E.; HUTANU, A. Serum leptin and leptin resistance correlations with NAFLD in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, 34, n. 8, p. e3050, Nov 2018.

CHAGAS, V. T.; COELHO, R. M. R. d. S.; GASPAR, R. S.; DA SILVA, S. A. *et al.* Protective effects of a polyphenol-rich extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaf on oxidative stress-induced diabetic rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018, 2018.

CHAGAS, V. T.; FRANÇA, L. M.; MALIK, S.; PAES, A. M. d. A. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers in pharmacology**, 6, p. 259, 2015.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J. E.; CHARLTON, M. *et al.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, 67, n. 1, p. 328-357, Jan 2018.

CHANG, C. J.; TZENG, T.-F.; LIOU, S.-S.; CHANG, Y.-S. *et al.* Myricetin increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α protein expression and decreases plasma lipids and adiposity in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012, 2012.

CHATTERJEE, S.; PETERS, S. A.; WOODWARD, M.; ARANGO, S. M. *et al.* Type 2 diabetes as a risk factor for dementia in women compared with men: a pooled analysis of 2.3 million people comprising more than 100,000 cases of dementia. **Diabetes Care**, 39, n. 2, p. 300-307, 2016.

CHOI, D. H.; LI, C.; CHOI, J. S. Effects of myricetin, an antioxidant, on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite, EXP-3174, in rats: possible role of cytochrome P450 3A4, cytochrome P450 2C9 and P-glycoprotein inhibition by myricetin. **J Pharm Pharmacol**, 62, n. 7, p. 908-914, Jul 2010.

CHOI, H.-N.; KANG, M.-J.; LEE, S.-J.; KIM, J.-I. Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. **Nutrition research and practice**, 8, n. 5, p. 544-549, 2014.

CHOI, H. N.; KANG, M. J.; LEE, S. J.; KIM, J. I. Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. **Nutr Res Pract**, 8, n. 5, p. 544-549, Oct 2014.

COELHO, C.; FRANÇA, L.; NASCIMENTO, J.; DOS SANTOS, A. *et al.* Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice. **Journal of developmental origins of health and disease**, p. 1-8, 2018.

COWLEY, M. A.; SMART, J. L.; RUBINSTEIN, M.; CERDAN, M. G. *et al.* Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, 411, n. 6836, p. 480-484, May 24 2001.

CROZIER, A.; BURNS, J.; AZIZ, A. A.; STEWART, A. J. *et al.* Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. **Biological Research**, 33, p. 79-88, 2000.

DANG, Y.; LIN, G.; XIE, Y.; DUAN, J. *et al.* Quantitative determination of myricetin in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its absolute bioavailability. **Drug Res (Stuttg)**, 64, n. 10, p. 516-522, Oct 2014.

DAS, S.; STARK, L.; MUSGRAVE, I. F.; PUKALA, T. *et al.* Bioactive polyphenol interactions with beta amyloid: a comparison of binding modelling, effects on fibril and aggregate formation and neuroprotective capacity. **Food Funct**, 7, n. 2, p. 1138-1146, Feb 2016.

DAWSON, R., Jr.; LORDEN, J. F. Behavioral and neurochemical effects of neonatal administration of monosodium L-glutamate in mice. **J Comp Physiol Psychol**, 95, n. 1, p. 71-84, Feb 1981.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes—evidence reviewed. **Journal of diabetes science and technology**, 2, n. 6, p. 1101-1113, 2008.

DHIMAN, P.; MALIK, N.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; URIARTE, E. *et al.* Quercetin and Related Chromenone Derivatives as Monoamine Oxidase Inhibitors: Targeting Neurological and Mental Disorders. **Molecules**, 24, n. 3, Jan 24 2019.

DHINDSA, K. S.; OMRAN, R. G.; BHUP, R. Histological changes in the thyroid gland induced by monosodium glutamate in mice. **Acta Anat (Basel)**, 109, n. 2, p. 97-102, 1981.

DI MEO, S.; IOSSA, S.; VENDITTI, P. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. **J Endocrinol**, 233, n. 1, p. R15-r42, Apr 2017.

DIEF, A. E.; KAMHA, E. S.; BARAKA, A. M.; ELSHORBAGY, A. K. Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: A potential role for cyclic AMP protein kinase. **NeuroToxicology**, 42, p. 76-82, 2014/05/01/ 2014.

DOWLATI, Y.; HERRMANN, N.; SWARDFAGER, W.; LIU, H. *et al.* A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry**, 67, n. 5, p. 446-457, Mar 1 2010.

EDIRIWEERA, E.; RATNASOORIYA, W. A review on herbs used in treatment of diabetes mellitus by Sri Lankan ayurvedic and traditional physicians. **AYU (An international quarterly journal of research in Ayurveda)**, 30, n. 4, p. 373, 2009.

FERREIRA, L. S. S.; FERNANDES, C. S.; VIEIRA, M. N. N.; DE FELICE, F. G. Insulin Resistance in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, 12, n. 830, 2018-November-13 2018. Mini Review.

FRANÇA, L. M.; COELHO, C. F. F.; FREITAS, L. N. C.; SOUZA, I. L. S. *et al.* Syzygium cumini Leaf Extract Reverts Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2019, 2019.

FRANÇA, L. M.; FREITAS, L. N. C.; CHAGAS, V. T.; COELHO, C. F. F. *et al.* Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation. **Biochemical and biophysical research communications**, 443, n. 2, p. 725-730, 2014.

FRANCH-NADAL, J.; CABALLERIA, L.; MATA-CASES, M.; MAURICIO, D. *et al.* Fatty liver index is a predictor of incident diabetes in patients with prediabetes: The PREDAPS study. **PLoS One**, 13, n. 6, p. e0198327, 2018.

FUJIMOTO, M.; TSUNEYAMA, K.; FUJIMOTO, T.; SELMI, C. *et al.* Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum

leptin in a mouse model of metabolic syndrome. **Diag Liver Dis**, 44, n. 9, p. 767-774, Sep 2012.

FURLER, S. M.; GAN, S. K.; POYNTEN, A. M.; CHISHOLM, D. J. *et al.* Relationship of adiponectin with insulin sensitivity in humans, independent of lipid availability. **Obesity (Silver Spring)**, 14, n. 2, p. 228-234, Feb 2006.

GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; DANIELS, S. R.; DONATO, K. A. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation**, 112, n. 17, p. 2735-2752, Oct 25 2005.

GUPTA, V.; SHARMA, R.; BANSAL, P.; KAUR, G. Bioactivity-guided isolation of potent anxiolytic compounds from leaves of *Citrus paradisi*. **Ayu**, 39, n. 1, p. 21-28, Jan-Mar 2018.

HAYDEN, M. R. Type 2 Diabetes Mellitus Increases The Risk of Late-Onset Alzheimer's Disease: Ultrastructural Remodeling of the Neurovascular Unit and Diabetic Gliopathy. **Brain Sci**, 9, n. 10, Sep 29 2019.

HLINAK, Z.; GANDALOVICOVA, D.; KREJCI, I. Behavioral deficits in adult rats treated neonatally with glutamate. **Neurotoxicol Teratol**, 27, n. 3, p. 465-473, May-Jun 2005.

HORVATH, G.; REGLODI, D.; VADASZ, G.; FARKAS, J. *et al.* Exposure to enriched environment decreases neurobehavioral deficits induced by neonatal glutamate toxicity. **Int J Mol Sci**, 14, n. 9, p. 19054-19066, Sep 16 2013.

HUANG, R.; TIAN, S.; ZHANG, H.; ZHU, W. *et al.* Chronic hyperglycemia induces tau hyperphosphorylation by downregulating OGT-involved O-GlcNAcylation in vivo and in vitro. **Brain Res Bull**, 156, p. 76-85, Jan 10 2020.

HUSSAIN, Y.; JAIN, S. K.; SAMAIYA, P. K. Short-term westernized (HFFD) diet fed in adolescent rats: Effect on glucose homeostasis, hippocampal insulin signaling, apoptosis and related cognitive and recognition memory function. **Behav Brain Res**, 361, p. 113-121, Apr 1 2019.

JAMES, W. P. T. WHO recognition of the global obesity epidemic. **International journal of obesity**, 32, n. S7, p. S120, 2009.

JIN, L.; LIN, L.; LI, G. Y.; LIU, S. *et al.* Monosodium glutamate exposure during the neonatal period leads to cognitive deficits in adult Sprague-Dawley rats. **Neurosci Lett**, 682, p. 39-44, Aug 24 2018.

JOHNSTON, C. A.; TESONE, M.; NEGRO-VILAR, A. Steroid-monoamine feedback interactions in discrete brain regions using as a model the monosodium glutamate (MSG)-lesioned rat. **Life Sci**, 34, n. 13, p. 1287-1297, Mar 26 1984.

KAMAGATE, A.; DONG, H. H. FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production. **Cell Cycle**, 7, n. 20, p. 3162-3170, Oct 2008.

KISS, P.; HAUSER, D.; TAMAS, A.; LUBICS, A. *et al.* Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. **Neurotoxicity research**, 12, n. 2, p. 85, 2007.

KLEINER, D. E.; MAKHLOUF, H. R. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. **Clin Liver Dis**, 20, n. 2, p. 293-312, May 2016.

KOTHARI, S.; DHAMI-SHAH, H.; SHAH, S. R. Antidiabetic Drugs and Statins in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Clin Exp Hepatol**, 9, n. 6, p. 723-730, Nov-Dec 2019.

KUZNETSOVA, E. G.; AMSTISLAVSKAYA, T. G.; BULYGINA, V. V.; IL'NITSKAYA, S. I. *et al.* Effects of administration of sodium glutamate during the neonatal period on behavior and blood corticosterone levels in male mice. **Neurosci Behav Physiol**, 37, n. 8, p. 827-833, Oct 2007.

LEAMY, A. K.; EGNATCHIK, R. A.; YOUNG, J. D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Prog Lipid Res**, 52, n. 1, p. 165-174, Jan 2013.

LEI, Y.; CHEN, J.; ZHANG, W.; FU, W. *et al.* In vivo investigation on the potential of galangin, kaempferol and myricetin for protection of D-galactose-induced cognitive impairment. **Food Chem**, 135, n. 4, p. 2702-2707, Dec 15 2012.

LI, C.; LIM, S. C.; KIM, J.; CHOI, J. S. Effects of myricetin, an anticancer compound, on the bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, 36, n. 3, p. 175-182, Sep 2011.

LI, Y.; ZHENG, X.; YI, X.; LIU, C. *et al.* Myricetin: a potent approach for the treatment of type 2 diabetes as a natural class B GPCR agonist. **Faseb j**, 31, n. 6, p. 2603-2611, Jun 2017.

LIAO, H. H.; ZHU, J. X.; FENG, H.; NI, J. *et al.* Myricetin Possesses Potential Protective Effects on Diabetic Cardiomyopathy through Inhibiting IkappaBalpha/NFkappaB and Enhancing Nrf2/HO-1. **Oxid Med Cell Longev**, 2017, p. 8370593, 2017.

LIU, I. M.; TZENG, T. F.; LIOU, S. S.; LAN, T. W. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. **Life Sci**, 81, n. 21-22, p. 1479-1488, Nov 10 2007.

LIU, R.; CHEN, B.; CHEN, J.; LAN, J. Leptin upregulates smooth muscle cell expression of MMP-9 to promote plaque destabilization by activating AP-1 via the leptin receptor/MAPK/ERK signaling pathways. **Exp Ther Med**, 16, n. 6, p. 5327-5333, Dec 2018.

MADHAVADAS, S.; KUTTY, B. M.; SUBRAMANIAN, S. Amyloid beta lowering and cognition enhancing effects of ghrelin receptor analog [D-Lys (3)] GHRP-6 in rat model of obesity. **Indian J Biochem Biophys**, 51, n. 4, p. 257-262, Aug 2014.

MANSUR, R. B.; BRIETZKE, E.; MCINTYRE, R. S. Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. **Neurosci Biobehav Rev**, 52, p. 89-104, May 2015.

MASLOV, L. N.; NARYZHAYAYA, N. V.; BOSHCHENKO, A. A.; POPOV, S. V. *et al.* Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the metabolic syndrome? **J Clin Transl Endocrinol**, 15, p. 1-5, Mar 2019.

MASTERS, C. L.; BATEMAN, R.; BLENNOW, K.; ROWE, C. C. *et al.* Alzheimer's disease. **Nat Rev Dis Primers**, 1, p. 15056, Oct 15 2015.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R. *et al.* Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **acta farmacéutica bonaerense**, 25, n. 2, p. 310-314, 2006.

MUNKHOLM, K.; VINBERG, M.; VEDEL KESSING, L. Cytokines in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord**, 144, n. 1-2, p. 16-27, Jan 10 2013.

NAGATA, M.; SUZUKI, W.; IIZUKA, S.; TABUCHI, M. *et al.* Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. **Experimental Animals**, 55, n. 2, p. 109-115, 2006.

NAKANISHI, Y.; TSUNNEYAMA, K.; FUJIMOTO, M.; SALUNGA, T. L. *et al.* Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. **J Autoimmun**, 30, n. 1-2, p. 42-50, Feb-Mar 2008.

NATI, M.; HADDAD, D.; BIRKENFELD, A. L.; KOCH, C. A. *et al.* The role of immune cells in metabolism-related liver inflammation and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **Rev Endocr Metab Disord**, 17, n. 1, p. 29-39, Mar 2016.

NEMEROFF, C. B.; GRANT, L. D.; BISSETTE, G.; ERVIN, G. N. *et al.* Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. **Psychoneuroendocrinology**, 2, n. 2, p. 179-196, 1977.

NEUMANN, K. F.; ROJO, L.; NAVARRETE, L. P.; FARIÁS, G. *et al.* Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links & clinical implications. **Current Alzheimer Research**, 5, n. 5, p. 438-447, 2008.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, 164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OLVERA-CORTES, E.; LOPEZ-VAZQUEZ, M. A.; BEAS-ZARATE, C.; GONZALEZ-BURGOS, I. Neonatal exposure to monosodium glutamate disrupts place learning ability in adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 82, n. 2, p. 247-251, Oct 2005.

ONO, K.; YOSHIKE, Y.; TAKASHIMA, A.; HASEGAWA, K. *et al.* Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. **J Neurochem**, 87, n. 1, p. 172-181, Oct 2003.

PALHINHA, L.; LIECHOCKI, S.; HOTTZ, E. D.; PEREIRA, J. *et al.* Leptin Induces Proadipogenic and Proinflammatory Signaling in Adipocytes. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 10, p. 841, 2019.

PARK, K.-S.; CHONG, Y.; KIM, M. K. Myricetin: biological activity related to human health. **Applied Biological Chemistry**, 59, n. 2, p. 259-269, 2016/04/01 2016.

PAZ-FILHO, G.; MASTRONARDI, C. A.; LICINIO, J. Leptin treatment: Facts and expectations. **Metabolism**, 64, n. 1, p. 146-156, 2015/01/01/ 2015.

PERELLO, M.; GAILLARD, R. C.; CHISARI, A.; SPINEDI, E. Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin. **Neuroendocrinology**, 78, n. 3, p. 176-184, Sep 2003.

POLYZOS, S. A.; KOUNTOURAS, J.; ANASTASILAKIS, A. D.; GELADARI, E. V. *et al.* Irisin in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Metabolism**, 63, n. 2, p. 207-217, Feb 2014.

QUINES, C. B.; ROSA, S. G.; DA ROCHA, J. T.; GAI, B. M. *et al.* Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats. **Life Sci**, 107, n. 1-2, p. 27-31, Jun 27 2014.

RAJASEKHARAN, S.; NAIR, V. T. *Syzygium cumini* in Ayurveda and Other Traditional Medicare Systems in India. *In: The Genus Syzygium*: CRC Press, 2017. p. 63-80.

RAMETTA, R.; MOZZI, E.; DONGIOVANNI, P.; MOTTA, B. M. *et al.* Increased insulin receptor substrate 2 expression is associated with steatohepatitis and altered lipid metabolism in obese subjects. **Int J Obes (Lond)**, 37, n. 7, p. 986-992, Jul 2013.

RAMEZANI, M.; DARBANDI, N.; KHODAGHOLI, F.; HASHEMI, A. Myricetin protects hippocampal CA3 pyramidal neurons and improves learning and memory impairments in rats with Alzheimer's disease. **Neural Regen Res**, 11, n. 12, p. 1976-1980, Dec 2016.

RAPOPORT, S. I. In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling. **J Mol Neurosci**, 16, n. 2-3, p. 243-261; discussion 279-284, Apr-Jun 2001.

RONN, P. F.; ANDERSEN, G. S.; LAURITZEN, T.; CHRISTENSEN, D. L. *et al.* Ethnic differences in anthropometric measures and abdominal fat distribution: a cross-sectional pooled study in Inuit, Africans and Europeans. **J Epidemiol Community Health**, 71, n. 6, p. 536-543, Jun 2017.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual review of nutrition**, 22, n. 1, p. 19-34, 2002.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. **J Biol Chem**, 278, n. 46, p. 45777-45784, Nov 14 2003.

SAMJOO, I. A.; SAFDAR, A.; HAMADEH, M. J.; GLOVER, A. W. *et al.* Markers of skeletal muscle mitochondrial function and lipid accumulation are moderately associated with the homeostasis model assessment index of insulin resistance in obese men. **PLoS One**, 8, n. 6, p. e66322, 2013.

SANCHES, J. R.; FRANCA, L. M.; CHAGAS, V. T.; GASPAR, R. S. *et al.* Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in pharmacology**, 7, p. 48, 2016.

SASAKI, Y.; SHIMADA, T.; IIZUKA, S.; SUZUKI, W. *et al.* Effects of bezafibrate in nonalcoholic steatohepatitis model mice with monosodium glutamate-induced metabolic syndrome. **Eur J Pharmacol**, 662, n. 1-3, p. 1-8, Jul 15 2011.

SHARMA, S.; FULTON, S. Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. **Int J Obes (Lond)**, 37, n. 3, p. 382-389, Mar 2013.

SILVEIRA, E. A.; VIEIRA, L. L.; SOUZA, J. D. d. Elevada prevalência de obesidade abdominal em idosos e associação com diabetes, hipertensão e doenças respiratórias. **Ciência & Saúde Coletiva**, 23, p. 903-912, 2018.

SILVEIRA, E. A. d.; VIEIRA, L. L.; JARDIM, T. V.; SOUZA, J. D. d. Obesity and its association with food consumption, diabetes mellitus, and acute myocardial infarction in the elderly. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 107, n. 6, p. 509-517, 2016.

SPIELMAN, L. J.; BAHNIWAL, M.; LITTLE, J. P.; WALKER, D. G. *et al.* Insulin Modulates In Vitro Secretion of Cytokines and Cytotoxins by Human Glial Cells. **Curr Alzheimer Res**, 12, n. 7, p. 684-693, 2015.

SPOLCOVA, A.; MIKULASKOVA, B.; HOLUBOVA, M.; NAGELOVA, V. *et al.* Anorexigenic lipopeptides ameliorate central insulin signaling and attenuate tau phosphorylation in hippocampi of mice with monosodium glutamate-induced obesity. **J Alzheimers Dis**, 45, n. 3, p. 823-835, 2015.

STROBEL, P.; ALLARD, C.; PEREZ-ACLE, T.; CALDERON, R. *et al.* Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. **Biochem J**, 386, n. Pt 3, p. 471-478, Mar 15 2005.

SULTANA, B.; ANWAR, F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. **Food Chem**, 108, n. 3, p. 879-884, Jun 1 2008.

TALBOT, K.; WANG, H.-Y.; KAZI, H.; HAN, L.-Y. *et al.* Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. **The Journal of clinical investigation**, 122, n. 4, p. 1316, 2012.

TANG, Y.; LE, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Molecular neurobiology**, 53, 01/20 2015.

THOMAS, D.; APOVIAN, C. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. **Metabolism: clinical and experimental**, 72, p. 120-143, 2017.

THORENS, B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. **Diabetologia**, 58, n. 2, p. 221-232, Feb 2015.

TSUNEYAMA, K.; NISHIDA, T.; BABA, H.; TAIRA, S. *et al.* Neonatal monosodium glutamate treatment causes obesity, diabetes, and macrovesicular steatohepatitis with liver nodules in DIAR mice. **Journal of gastroenterology and hepatology**, 29, n. 9, p. 1736-1743, 2014.

VAN DE WIER, B.; KOEK, G. H.; BAST, A.; HAENEN, G. R. The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. **Critical reviews in food science and nutrition**, 57, n. 4, p. 834-855, 2017.

WANG, L.; WU, H.; YANG, F.; DONG, W. The Protective Effects of Myricetin against Cardiovascular Disease. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, 65, n. 6, p. 470-476, 2019.

WANG, Q.; WANG, S. T.; YANG, X.; YOU, P. P. *et al.* Myricetin suppresses differentiation of 3 T3-L1 preadipocytes and enhances lipolysis in adipocytes. **Nutr Res**, 35, n. 4, p. 317-327, Apr 2015.

WANG, Q. M.; WANG, G. L.; MA, Z. G. Protective effects of myricetin on chronic stress-induced cognitive deficits. **Neuroreport**, 27, n. 9, p. 652-658, Jun 15 2016.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WREE, A.; BRODERICK, L.; CANBAY, A.; HOFFMAN, H. M. *et al.* From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 10, n. 11, p. 627-636, Nov 2013.

XIA, S. F.; LE, G. W.; WANG, P.; QIU, Y. Y. *et al.* Regressive Effect of Myricetin on Hepatic Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet. **Nutrients**, 8, n. 12, Dec 11 2016.

XIA, S. F.; QIU, Y. Y.; CHEN, L. M.; JIANG, Y. Y. *et al.* Myricetin alleviated hepatic steatosis by acting on microRNA-146b/thyroid hormone receptor b pathway in high-fat diet fed C57BL/6J mice. **Food Funct**, Feb 18 2019.

XIE, H.; MOU, W.-S.; LIN, F.-R.; XU, J.-H. *et al.* Radical Scavenging Activity of Myricetin. **Acta Physico-Chimica Sinica**, 29, 07/15 2013.

XU, P.-T.; SONG, Z.; ZHANG, W.-C.; JIAO, B. *et al.* Impaired translocation of GLUT4 results in insulin resistance of atrophic soleus muscle. **BioMed research international**, 2015, 2015.

XUE, C. F.; GUO, J. M.; QIAN, D. W.; DUAN, J. A. *et al.* [Absorption of flavonoids from *Abelmoschus manihot* extract by in situ intestinal perfusion]. **Yao Xue Xue Bao**, 46, n. 4, p. 454-459, Apr 2011.

YAMAMOTO, T.; MATSUO, S.; UESHIMA, Y.; INOUE, F. *et al.* Plasma levels of insulin-like growth factor-I are reduced at one week of age in monosodium L-glutamate-treated mice. **Endocr J**, 40, n. 4, p. 461-465, Aug 1993.

YAMAZAKI, Y.; USUI, I.; KANATANI, Y.; MATSUYA, Y. *et al.* Treatment with SRT1720, a SIRT1 activator, ameliorates fatty liver with reduced expression of lipogenic enzymes in MSG mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 297, n. 5, p. E1179-1186, Nov 2009.

YAO, Z.; LI, C.; GU, Y.; ZHANG, Q. *et al.* Dietary myricetin intake is inversely associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. **Nutrition Research**, 68, p. 82-91, 2019/08/01/ 2019.

YAZICI, D.; SEZER, H. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. **Adv Exp Med Biol**, 960, p. 277-304, 2017.

YOUNOSSI, Z. M. The epidemiology of nonalcoholic steatohepatitis. **Clin Liver Dis (Hoboken)**, 11, n. 4, p. 92-94, Apr 2018.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, 64, n. 1, p. 73-84, Jul 2016.

ZHANG, D.; XIE, L.; JIA, G.; CAI, S. *et al.* Comparative study on antioxidant capacity of flavonoids and their inhibitory effects on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro. **European journal of medicinal chemistry**, 46, n. 9, p. 4548-4558, 2011.

ZHANG, W. M.; KUCHAR, S.; MOZES, S. Body fat and RNA content of the VMH cells in rats neonatally treated with monosodium glutamate. **Brain Res Bull**, 35, n. 4, p. 383-385, 1994.

ZOBEL, E. H.; HANSEN, T. W.; ROSSING, P.; VON SCHOLTEN, B. J. Global Changes in Food Supply and the Obesity Epidemic. **Curr Obes Rep**, 5, n. 4, p. 449-455, Dec 2016.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
 CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos do extrato rico em polifenóis da folha de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre a síntese e exportação de triacilgliceróis hepática em camundongos com obesidade induzida por L-glutamato monossódico” registrada com o nº 23115.0044322/2017-92, sob a responsabilidade de Antonio Marcus de Andrade Paes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 22/05/2017.

FINALIDADE	()Ensino (x) Pesquisa ()Extensão
Vigência da autorização	19/06/2017 à 19/06/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongos <i>Mus musculus</i>
Nº de animais	15
Peso/Idade	Animais recém-nascidos acompanhados a partir do 1º dia de vida.
Sexo	5 Machos e 10 Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva
 Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
 UFMA

ANEXO B



FOOD RESEARCH INTERNATIONAL

A journal of the [Canadian Institute of Food Science and Technology \(CIFST\)](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.6



ISSN: 0963-9969

DESCRIPTION

We are pleased to announce that *Food Research International* has been accepted in MEDLINE as of March 7th, 2017.

Food Research International provides a forum for the rapid dissemination of significant novel and high impact research in food science, technology, engineering and nutrition. The journal only publishes novel, high quality and high impact review papers, original research papers and letters to the editors, in the various disciplines encompassing the science and technology of food. It is journal policy to publish special issues on topical and emergent subjects of food research or food research-related areas. Special issues of selected, peer-reviewed papers from scientific meetings, workshops, conferences on the science, technology and engineering of foods will be also published.

Food Research International is the successor to the Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. Building on the quality and strengths of its predecessor, *Food Research International* has been developed to create a truly international forum for the communication of research in **food science**.

Topics covered by the journal include:

food chemistry food microbiology and safety microbiome food toxicology materials science of foods food engineering physical properties of foods sensory science food quality health and nutrition food biophysics analysis of foods food nanotechnology emerging technologies

Subjects that **will not** be considered for publication in *Food Research International*, and will be rejected as being outside of scope, include :

Studies testing different formulations and ingredients leading to the choice of the best formulation or ingredient to be used in the manufacture of a specified food; Optimization studies aiming to determine processing conditions and/or raw materials that increase the yield of a production process or improve nutritional and sensorial qualities; Studies describing the production of ingredients and only their characterization without a strong mechanistic emphasis; Studies describing the biological activity of foods lacking identification of the compounds responsible for the reported activity will not be published. This is also valid for any other chemical compounds such as phytochemicals and minor components of foods. Compounds of interest need to be characterized at least by mass spectrometry-based methods. Studies that do not clearly prove the relationship between the structure of the compounds and their activity; Fingerprinting studies lacking molecular insights and validation sets; Studies on antimicrobial compounds that do not consider a validation step in foods, lacking full data on chemical composition indicating the compounds responsible for the inhibitory activity and, when appropriate, the use of molecular biology approaches to support the findings; Development

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Food Research International is the successor to the Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. Building on the quality and strengths of its predecessor, *Food Research International* has been developed to create a truly international forum for the communication of research in food science.

Food Research International provides a forum for the rapid dissemination of significant novel and high impact research in food science, technology, engineering and nutrition. The journal only publishes novel, high quality and high impact review papers, original research papers and letters to the editors, in the various disciplines encompassing the science and technology of food. It is journal policy to publish special issues on topical and emergent subjects of food research or food research-related areas. Special issues of selected, peer-reviewed papers from scientific meetings, workshops, conferences on the science, technology and engineering of foods will be also published.

Food Research International does not publish papers with a product development emphasis, statistical optimizations of processes or surveys. This is based on the editorial policy of the journal to publish more fundamental work with a strong quantitative emphasis and of a general nature.

Topics covered by the journal include:

Emerging Technologies Sensory Aspects of Foods Food Toxicology Food Chemistry and Analysis Food Omics Nutrition, health and food digestion Food Engineering and Materials Science of Foods Functional Foods Food Microbiology, Safety and Quality

Please also refer to the list of subjects not considered in *Food Research International* before you submit your paper. These topics can be found in [the full aims and scope of the journal](#).

Types of paper

Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 6,000 words. The word count refers to the text of the manuscript per se, i.e., references, figures and tables are not considered. Review articles - will be accepted in all areas of food science covered by the scope of the journal. Review articles focused on recent literature published (for example, over the previous 2-5 years) as well as comprehensive and definitive reviews will be considered. Review papers must contain critical assessment of literature and may also contain author's views on the subject. There are no word counts and reference numbers limit for review papers. Short communications - *Food Research International* does not publish short communication papers. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest. Book Reviews

Food Research International is concerned with safeguarding the rights and welfare of animals and human research subjects. Authors must provide a letter with the approval from the ethics committee from the respective University or research center where the study was performed.

The list of references must be as updated as possible. Making reference to recent work in the field is particularly key to highlight the current context of the manuscript and to make it more comprehensive, to highlight the novelty to the readers as well as its contribution to the field.

Contact details for submission

Submission for all types of manuscripts to *Food Research International* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal, <http://ees.elsevier.com/foodres>, you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files.

Questions regarding content of a proposed submission can be directed to: foodresearchinternational@gmail.com.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word

processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

All pages of the manuscript must be numbered. All lines must be numbered continuously throughout the manuscript.

General: Manuscripts must be typewritten, with 2 cm margins. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a valid E-mail address). Full postal and email addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Authors are encouraged to read the helpful notes on statistics applied in the planning of experiments and assessment of results in the field of food science and technology. The more important univariate and bivariate parametric and non-parametric methods, their advantages and disadvantages are presented in "Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology by Granato (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913005723>).

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Material and Methods, Results, Conclusion), Acknowledgements, Appendix, References. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide at least 6 keywords (maximum allowed: 12 keywords), using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. **Keywords must be different from title to enhance searchability and findability.** These keywords will be used for indexing purposes.

ANEXO C

Hindawi
Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Volume 2019, Article ID 9417498, 14 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/9417498>



Research Article

***Syzygium cumini* Leaf Extract Reverts Hypertriglyceridemia via Downregulation of the Hepatic XBP-1s/PDI/MTP Axis in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats**

Lucas Martins França ¹, Caio Fernando Ferreira Coêlho,¹ Larissa Nara Costa Freitas,¹ Ivana Letícia Santos Souza,¹ Vinicyus Teles Chagas,¹ Victor Debbas,² Thais Martins de Lima,³ Heraldo Possolo de Souza,³ Francisco Rafael Martins Laurindo,² and Antonio Marcus de Andrade Paes ¹

¹Laboratory of Experimental Physiology (LeFisio), Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966–Cidade Universitária Dom Delgado, São Luís, MA 65080-805, Brazil

²Laboratory of Vascular Biology (LBV), Heart Institute, School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44–Cerqueira César, São Paulo, SP 05403-900, Brazil

³Laboratory of Medical Investigation (LIM-51), Emergency Medicine Department, School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455–Cerqueira César, São Paulo, SP 01246-903, Brazil

Correspondence should be addressed to Antonio Marcus de Andrade Paes; marcuspaes@ufma.br

Received 30 November 2018; Revised 11 January 2019; Accepted 5 February 2019; Published 20 March 2019

Guest Editor: Mohamed M. Abdel-Daim

Copyright © 2019 Lucas Martins França et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Syzygium cumini is used worldwide for the treatment of metabolic syndrome-associated outcomes. Previously, we described the antihypertriglyceridemic effect of the hydroethanolic extract of *S. cumini* leaf (HESc) in monosodium L-glutamate- (MSG-) induced obese rats. This study sought to investigate the molecular mechanisms underlying the antihypertriglyceridemic effect of HESc in MSG-obese rats. Newborn male Wistar rats were injected subcutaneously with MSG (4.0 g/kg/day, obese group) or saline 1.25% (1.0 mL/kg/day, lean group), from 2nd through 10th postnatal day. At 8 weeks old, obese rats started to be orally treated with HESc (0.5 or 1.0 g/kg/day, $n = 7$) or saline 0.9% (1 mL/kg/day, $n = 7$). Lean rats received saline solution (1 mL/kg/day, $n = 7$). Upon 8-week treatment, animals were euthanized for blood and tissue collection. Another set of adult nonobese Wistar rats was used for the assessment of HESc acute effects on Triton WR1339-induced hypertriglyceridemia. HESc reduced weight gain, as well as adipose tissue fat pads, without altering food intake of obese rats. HESc restored fasting serum glucose, triglycerides, total cholesterol, and free fatty acids, as well as insulin sensitivity, to levels similar to lean rats. Additionally, HESc halved the triglyceride content into very low-density lipoprotein particles, as well as healed liver steatosis, in obese rats. Hepatic protein expression of the endoplasmic reticulum chaperone GRP94 was decreased by HESc, which also downregulated the hepatic triglyceride secretion pathway by reducing the splicing of X-box binding protein 1 (XBP-1s), as well as protein disulfide isomerase (PDI) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) translational levels. This action was further corroborated by the acute inhibitory effect of HESc on triglyceride accumulation on Triton WR1339-treated rats. Our data support the downregulation of the XBP-1s/PDI/MTP axis in the liver of MSG-obese rats as a novel feasible mechanism for the antihypertriglyceridemic effect promoted by the polyphenolic phytocomplex present in *S. cumini* leaf.

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered the main hepatic manifestation of metabolic syndrome (MetS)

[1]. Under MetS, white adipose tissue hypertrophy causes local insulin resistance that, in turn, increases adipocyte lipolytic activity and decreases local free fatty acid (FFA) recycling, raising serum FFA levels. Increased FFA uptake by hepatocytes

RESEARCH

Open Access



Long-term high-protein diet intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed adult rats

Rosângela Maria Lopes Sousa^{1,2†}, Nathalee Liberal Xavier Ribeiro^{1,2†}, Bruno Araújo Serra Pinto^{1,2}, Jonas Rodrigues Sanches^{1,2}, Mariana Uchôa da Silva¹, Caio Fernando Ferreira Coêlho^{1,2}, Lucas Martins França^{1,2}, José Albuquerque de Figueiredo Neto^{2,3} and Antonio Marcus de Andrade Paes^{1,2*} 

Abstract

Background: Consumption of added sugars has been considered a worldwide public health concern by its association with metabolic syndrome and its comorbidities. Meanwhile, current studies have suggested high-protein diets to promote weight loss and improved metabolic outcomes. Thus, this study aimed to investigate the effects of long-term high-protein diet (HPD, 34.3% protein) intake on high-sucrose-fed rats.

Methods: Weaned male Wistar rats were randomized into two groups: rats fed a standard chow (CT/CT, 10% sucrose) or rats fed a high-sucrose diet (HSD, 25% sucrose) for a 20-week observational period. Subsequently, HS/HS animals were randomized into 3 new groups: rats maintained on HSD diet (HS/HS); rats submitted to HSD replacement by standard chow (HS/CT); and those with HSD replaced by HPD (HS/HP). All groups were followed up for 12 weeks during which we investigated the effects of HPD on body weight, energy intake, obesity development, glycaemic/lipid profile, glucose tolerance, insulin resistance, tissue weight (adipose tissue, liver and skeletal muscles), lipolytic activity, liver lipoperoxidation and histology, as well as serum markers of hepatic function.

Results: Post-weaning exposure to HSD led to metabolic syndrome phenotype at adulthood, herein characterized by central obesity, glucose intolerance, dyslipidaemia and insulin resistance. Only HPD feeding was able to revert weight gain and adipose tissue accumulation, as well as restore adipose tissue lipolytic response to sympathetic stimulus. On the other hand, either HPD or withdrawal from HSD promoted very similar metabolic outcomes upon 12-week nutritional intervention. HS/HP and HS/CT rats showed reduced fasting serum levels of glucose, triacylglycerol and total cholesterol, which were correlated with the improvement of peripheral insulin sensitivity, as inferred from *k*ITT and TyG Index values. Both nutritional interventions restored liver morphofunctional patterns, but only HPD restored lipid peroxidation.

(Continued on next page)

* Correspondence: marcuspaes@ufma.br

[†]Rosângela Maria Lopes Sousa and Nathalee Liberal Xavier Ribeiro contributed equally to this work.

¹Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences – DCF, Health and Biological Sciences Centre, Federal University of Maranhão – UFMA, Avenida dos Portugueses, 1966. Cidade Universitária D. Delgado, São Luís, MA 65080-805, Brazil

²Health Sciences Graduate Program, Health and Biological Sciences Centre, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry 62 (2018) 155–166

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

ORIGINAL RESEARCH

Long-term exposure to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive pathways and potentiates *de novo* lipogenesis in weaned male mice

Karla Frida Torres Flister^a, Bruno Araújo Serra Pinto^a, Lucas Martins França^a, Caio Fernando Ferreira Coêlho^a, Pâmela Costa dos Santos^a, Caroline Castro Vale^a, Daniela Kajihara^b, Victor Debbas^b, Francisco Rafael Martins Laurindo^b, Antonio Marcus de Andrade Paes^{a,*}

^aLaboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, (MA), Brazil

^bLaboratory of Vascular Biology, Heart Institute of the School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, (SP), Brazil

Received 27 March 2018; received in revised form 27 July 2018; accepted 12 September 2018

Abstract

Childhood consumption of added sugars, such as sucrose, has been associated to increased risk of metabolic syndrome (MetS) and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Although the mechanisms underlying NAFLD onset are incompletely defined, recent evidence has proposed a role for the endoplasmic reticulum (ER) stress. Thus, the present study sought to investigate the metabolic outcomes of high-sucrose intake on weaned Swiss mice fed a 25% sucrose diet for 30, 60 and 90 days in comparison to regular chow-fed controls. High-sucrose feeding promoted progressive metabolic and oxidative disturbances, starting from fasting and fed hyperglycemia, hyperinsulinemia, glucose intolerance and increased adiposity at 30-days; passing by insulin resistance, hypertriglyceridemia and NAFLD onset at 60 days; until late hepatic oxidative damage at 90 days. In parallel, assessment of transcriptional and/or translational levels of *de novo* lipogenesis (DNL) and ER stress markers showed up-regulation of both fatty acid synthesis (*ChREBP* and *SCD1*) and oxidation (*PPARα* and *CPT-1α*), as well as overexpression of unfolded protein response sensors (*IRE1α*, *PERK* and *ATF6*), chaperones (*GRP78* and *PDI1*) and antioxidant defense (*NRF2*) genes at 30 days. At 60 days, fatty acid oxidation genes were down-regulated, and ER stress switched over toward a proapoptotic pattern via up-regulation of BAK protein and CHOP gene levels. Finally, down-regulation of both *NRF2* and *CPT-1α* protein levels led to late up-regulation of *SREBP-1c* and exponential raise of fatty acids synthesis. In conclusion, our study originally demonstrates a temporal relationship between DNL and ER stress pathways toward MetS and NAFLD development on weaned rats fed a high-sucrose diet.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Nonalcoholic fatty liver disease; Endoplasmic reticulum stress; *De novo* lipogenesis; High-sucrose diet; Microvesicular steatosis; Metabolic syndrome

1. Introduction

The theory of developmental origins of health and disease has been consistently recognized as an important contributor to the worldwide epidemic of obesity, metabolic syndrome (MetS) and their associated comorbidities [1–4]. Although originally focused on the outcomes of

maternal under- and overnutrition during pregnancy, a wealth of current evidence supports that a diversity of preconceptional, pregnancy and childhood exposures to environmental and nutritional stressors also contributes to developmental programming [4–6]. These perturbations trigger epigenetic programming of gene/proteins expressions that ultimately alter cell metabolism and function. Among the miscellaneous targets for metabolic programming, those related to adipogenesis and lipogenesis are particularly involved in the epidemic of MetS by their direct impact on the synthesis of fatty acids and consequent lipid accumulation in both adipocytes and ectopic sites, such as liver [4,7–9].

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is regarded as a hepatic manifestation of MetS [10], being characterized by abnormal intrahepatocyte triglyceride accumulation (simple steatosis) in the absence of chronic alcoholism, viral infections or others liver diseases [11]. Upon hepatic inflammation and oxidative stress, NAFLD evolves into nonalcoholic steatohepatitis (NASH), predisposing people to severe hepatic diseases, such as cirrhosis and *in situ* hepatocarcinoma [12,13]. The pathophysiology of NAFLD is intimately associated with

Abbreviations: GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *ChREBP*, carbohydrate-responsive element-binding protein; *SREBP-1c*, sterol regulatory element-binding protein 1c; *SCD1*, stearoyl-CoA desaturase-1; *FASN*, fatty acid synthase; *CPT-1α*, carnitine palmitoyltransferase 1α; *PPARα*, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *IRE1α*, inositol-requiring enzyme 1 alpha; *PERK*, protein kinase RNA-like ER kinase; *ATF6*, activating transcription factor 6; *GRP78*, glucose regulated protein 78; *PDI A1*, protein disulfide isomerase family A member 1; *NRF2*, nuclear factor, erythroid derived 2, like 2; *CHOP*, *C/EBP*-homologous protein.

* Corresponding author at: Federal University of Maranhão, Av. dos Portugueses 1966, Bacanga, 65080-805, São Luís, (MA), Brazil. Tel./fax: +55 98 3272 8547.

E-mail address: marcuspaes@ufma.br (A.M.A. Paes).

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.09.007>
0955-2863/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Original Article

Cite this article: Coelho CFF, França LM, Nascimento JR, dos Santos AM, Azevedo-Santos APS, Nascimento FRF, Paes AMA. (2018) Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* page 1 of 8. doi: 10.1017/S2040174418000284

Received: 16 December 2017

Revised: 14 March 2018

Accepted: 23 March 2018

Key words:

monosodium L-glutamate; non-alcoholic fatty liver disease; non-alcoholic steatohepatitis; obesity; metabolic syndrome

Address for correspondence:

A. M. de Andrade Paes, Avenida dos Portugueses, 1966 – Cidade Universitária Dom Delgado, 65080-850 São Luís, MA, Brazil.
E-mail: marcuspaes@ufma.br

© Cambridge University Press and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease 2018.

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium L-glutamate-induced obese mice

C. F. F. Coelho¹, L. M. França^{1,4}, J. R. Nascimento^{2,4}, A. M. dos Santos^{3,4},
A. P. S. Azevedo-Santos^{2,4}, F. R. F. Nascimento^{2,4} and A. M. A. Paes^{1,4}

¹Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil, ²Laboratory of Immunophysiology, Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil, ³Department of Public Health, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil and ⁴Health Sciences Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

Abstract

Monosodium L-glutamate (MSG)-induced obesity is a useful model for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) studies. However, there is limited data on its initiation and progression. Thus, this study aimed to characterize the onset of metabolic and histopathological features of NAFLD and its progression to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in this model. To perform this study, Swiss mice pups were neonatally injected with MSG (4 g/kg/day, s.c.) or equiosmolar saline and followed up to 60, 120 or 180 days old. At each age, blood, liver, as well as periepididymal and retroperitoneal fat pads were collected for morphometric, biochemical and histological analyses, the later according to NAFLD activity score. MSG mice presented hypertriglyceridemia and central obesity at all ages, but peripheral insulin-resistance was verified only in 120- and 180-day-old mice. Hepatic total fat and triglycerides content were higher in MSG mice at all ages. Accordingly, histopathological analysis showed that 60-day-old MSG mice had microvesicular steatosis with occasional ballooning, which evolved into NASH from 120 days old. Retroperitoneal fat accumulation was the only variable to independently correlate with NAFLD activity total score upon multivariate analysis ($R^2 = 71.45\%$). There were no differences in IL-6 and TNF- α serum levels among groups. Overall, this study shows that NAFLD is a precocious outcome in MSG-obese mice, whereas the period comprised between 60 and 120 days old seems to be a crucial metabolic window for comprehending pathophysiological events involved in NAFLD-to-NASH progression in this model.

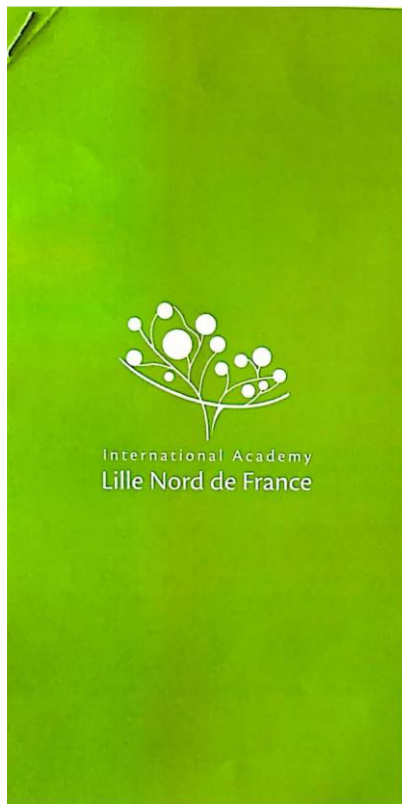
Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), defined as the cytoplasmic lipid accumulation inside hepatocytes in the absence of relevant alcohol intake,¹ has been considered the main hepatic manifestation of metabolic syndrome (MetS) and whose prevalence has reached epidemic levels worldwide.² Upon sustained injury, hepatocytes start releasing pro-inflammatory cytokines that lead to macrophage infiltration and disease progression to non-alcoholic steatohepatitis (NASH).³ These histopathologic and biomolecular changes have been tentatively explained by the ‘Two Hits Hypothesis’ for NAFLD/NASH, according to which the first hit corresponds to steatosis and the second one to the joint factors oxidative stress and cytokines release.³

Histopathological criteria for NASH diagnosis include mandatory presence of steatosis, ballooning degeneration and lobular inflammation, with or without perisinusoidal fibrosis on hepatic lobule zone 3.⁴ However, physiopathological mechanisms underlying this process are still barely understood, meanwhile available animal models not fully embrace human NAFLD/NASH features.⁵ According to Kanuri and Bergheim,⁶ an ideal animal model should meet two basic criteria: histopathological pattern similar to human NAFLD and steatohepatitis onset occurring under a dysfunctional metabolic milieu. More recently, it has been pointed out that most NAFLD/NASH models do not evolve to more severe stages of liver disease.⁷

Neonatal injection of monosodium L-glutamate (MSG) damages hypothalamic nuclei, for example, arcuate nucleus,^{8,9} leading to deficient growth hormone (GH) secretion, as well as autonomic unbalance characterized by decreased sympathetic and increased parasympathetic tone.^{10–12} Consequently, MSG-obese rodents show hyperinsulinemia and reduced serum levels of insulin-growth factor 1 (IGF-1) at ages as early as 4 weeks old,^{13–15} which precede the development of dyslipidemia, glucose intolerance, hyperleptinemia insulin resistance, central obesity and type II diabetes mellitus (T2DM) at adulthood.^{16–19} Noteworthy, early infant GH deficiency and hyperinsulinemia are thought to predispose to a range of late-in-life chronic conditions due to metabolic programming.²⁰ Thus, those gathered features support MSG

ANEXO G



IMPACT OF FOOD PROCESSING ON HUMAN HEALTH

PRE-CERTIFICATE
2019

Caio Fernando FERREIRA
COÊLHO

TRAINING CERTIFICATE

ATTESTATION DE SUIVI

The Communauté d'Universités et Établissements Lille Nord de France (ComUE LNF), the University of Lille, the Institut Polytechnique UniLaSalle Beauvais and the International Academy hereby certify that the student below has successfully completed the *Impact of Food Processing on Human Health* programme in Lille and Beauvais.

PERSONAL INFORMATION

LAST/FAMILY NAME(S): FERREIRA COÊLHO
FIRST/GIVEN NAME(S): Caio Fernando
SEX: Male
DATE OF BIRTH: 17/12/1992 (DD/MM/YYYY)
NATIONALITY: Brazilian

INFORMATIONS PERSONNELLES

NOM(S) DE FAMILLE
PRÉNOM(S)
SEXE
DATE DE NAISSANCE (JJ/MM/AAAA)
NATIONALITÉ

PROGRAMME INFORMATION

DATES: From the 1st JULY 2019 to the 26th JULY 2019
HOURS: 120 hours over 8 modules
PROGRAMME: IMPACT OF FOOD PROCESSING ON HUMAN HEALTH

INFORMATIONS SUR LE PROGRAMME

DATES
VOLUME HORAIRE
PROGRAMME

Signed in: Lille on the: 24/07/2019

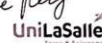
Prof. Mohamed OURAK
President of the ComUE LNF
Signature and stamp



Prof. Frédéric TESSIER
University of Lille
Signature and stamp



Dr. Martine REY
UniLaSalle Beauvais
Signature and stamp



Florence BOUVET
Director of the International Academy
Signature and stamp

