

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA:
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CITRAL NA INFLAMAÇÃO
METABÓLICA

VINÍCIUS PEIXOTO RODRIGUES

PROF^a ASSOC. CLELIA AKIKO HIRUMA-LIMA

PROF^a DR^a LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Prof.^a Assoc. C. A. Hiruma-Lima

BOTUCATU – SP
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA:
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CITRAL NA INFLAMAÇÃO
METABÓLICA

VINÍCIUS PEIXOTO RODRIGUES

PROF^a ASSOC. CLELIA AKIKO HIRUMA-LIMA

PROF^a DR^a LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Prof.^a Assoc. C. A. Hiruma-Lima

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rodrigues, Vinícius Peixoto.

Obesidade induzida por dieta hipercalórica : avaliação
do efeito do citral na inflamação / Vinícius Peixoto
Rodrigues. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Clelia Akiko Hiruma-Lima

Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

Capes: 20100000

1. Obesidade. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Inflamação
metabólica. 4. Citral.

Palavras-chave: C57BL/6J; Citral; Inflamação metabólica;
Obesidade; Swiss.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



Dedicatória

Para Cristina, Luís, Natália e Tamires

Agradecimentos

À Professora Clelia, que há dez anos abriu as portas do laboratório para mim e me ajudou a iniciar essa jornada que me proporcionou um incomensurável crescimento científico, didático e pessoal. Um exemplo de profissional de excelência e um ser humano excepcional. À minha mãe científica, meus mais sinceros agradecimentos. Muito obrigado.

À Professora Lúcia Rocha agradeço aos incontáveis puxões de orelha, horas de discussão, polimento didático, reflexões desagradáveis (porém, sempre necessárias) e *insights* quase que proféticos, muito obrigado pelas lições.

Ao Maycon, “Maycão”, “Maiquiel”, “Mykel”, com quem eu tive o privilégio de compartilhar horas e mais horas de trabalho árduo e companheirismo.

À Ximboquinha, Ximbeta, Ximbinha (e demais variações), pelas risadas proporcionadas, deixando o dia a dia mais engraçado.

À Doku, que colocava ordem na casa, mas estava sempre pronta para dar risada.

À Melan, pela paciência. Uma pessoa admirável, pela inteligência e competência.

À Priscila, pela coragem, curiosidade e por me desafiar a ser sempre melhor.

À Gi, que já me aguenta há anos e tem um autocontrole incrível para nunca me bater.

À toda a equipe do laboratório, Renata, Sorriso, Felipinho, Felipe, Mel, pelo trabalho dedicado a me ajudar na execução do meu projeto.

Aos amigos de outros laboratórios, Professora Ana, Alessandra, Vesga, Carolzinha, Fer Evelyn, Isabelinha, Isabelona que me permitiam fugir dos meus trabalhos chatos e acabavam apreciando a mais engraçada coleção de piadas (de nada).

A todos os servidores da UNESP que de alguma forma permitiu o desenvolvimento do meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; 88882.183585/2018-01), pelo salário que permitiu me dedicar exclusivamente ao meu trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 18/09873-0) pelo apoio financeiro concedido.

E a tantas outras pessoas não mencionadas aqui

Muito obrigado.

*“Todas as pessoas tomam os limites de seu
próprio campo de visão, pelos limites do mundo.”*

Arthur Schopenhauer

Prólogo

A execução do projeto de doutorado possibilitou a formação científica possibilitando o desenvolvimento de habilidades necessárias para o planejamento, execução e interpretações de experimentos. Ao longo desse período, foram realizadas outras atividades, no intuito de enriquecer a formação didática e científica do aluno.

Artigos completos publicados em periódicos

Périco, L. L.; Santos, R. C.; **Rodrigues, V. P.**; Nunes, V. V. A.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Role of an antioxidant pathway in the healing of peptic ulcer induced by ischemia-reperfusion in male and female rats treated with *Eugenia punicifolia*. *Inflammopharmacology*. , 2022.

Fagundes, F. L.; Piffer, G. M.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Hiruma-Lima, C. A.; Santos, R. C. Chrysin Modulates Genes Related to Inflammation, Tissue Remodeling, and Cell Proliferation in the Gastric Ulcer Healing. *International Journal of Molecular Sciences*. , v.21, p.760 - , 2020.

Lopes, J. A.; **Rodrigues, V. P.**; Tangerina, M. M. P.; Rocha, L. R. M.; Nishijima, C. M.; Nunes, V. V. A.; Almeida, L. F. R.; Vilegas, W.; Santos, A. R. S.; Sannomiya, M.; Hiruma-Lima, C. A. *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld Alleviates Acute Pain and Inflammation: Potential Mechanisms of Action. *Biomolecules*. , v.10, p.590 - , 2020.

Périco, L. L.; Emílio-Silva, M. T.; Ohara, R.; **Rodrigues, V. P.**; Bueno, G.; Barbosa-Filho, J. M.; Rocha, L. R. M.; Batista, L. M.; Hiruma-Lima, C. A. Systematic Analysis of Monoterpenes: Advances and Challenges in the Treatment of Peptic Ulcer Diseases. *Biomolecules*. , v.10, p.265 - , 2020.

Ohara, R.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Bueno, G.; Zanatta, A. C.; Santos, L. C.; Vilegas, W.; Constatino, F. B.; Júnior, L. A. J.; Hiruma-Lima, C. A. *Terminalia catappa* L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. , v.256, p.112793 - , 2020.

Santos, R. C.; Bonamin, F.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Zanatta, A. C.; Rodrigues, C. M.; Sannomiya, M.; Ramos, M. A. S.; Bonifácio, B. V.; Bauab, T. M.; Tamashiro, J.; Rocha, L. R. M.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss partitions promote gastroprotection against peptic ulcers and improve healing through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. , v.111, p.1112 - 1123, 2019.

Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Ohara, R.; Nunes, V. V. A.; Rocha, L. R. M.; Vilegas, W.; Santos, C.; Hiruma-Lima, C. A. Can the gastric healing effect of *Eugenia punicifolia* be the same in male and female rats?. *Journal of Ethnopharmacology*. , v.235, p.268 - 278, 2019.

Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Ohara, R.; Bueno, G.; Nunes, V. V. A.; Santos, R. C.; Camargo, A. C. L.; Júnior, L. A. J.; Andrade, S. F.; Steimbach, V. M. B.; Silva, L. M.; Rocha, L. R. M.; Vilegas, W.; Santos, C.; Hiruma-Lima, C. A. Sex-specific effects of *Eugenia punicifolia* extract on gastric ulcer healing in rats. *World Journal Of Gastroenterology*. , v.24, p.4369 - 4383, 2018.

Capítulos de livros publicados

Santos, R. C.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Sannomiya, M.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss. In: Medicinal and Aromatic Plants of the World.1 ed.: Springer Netherlands, 2018, p. 145-152.

Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Almeida, L. F. R.; Fortuna-Perez, A. P.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A. *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek In: Medicinal and Aromatic Plants of the World.1 ed.: Springer Netherlands, 2018, p. 323-335.

Estágio Supervisionado em Docência

Fisiologia Humana

Fisiologia Digestória (30 horas)

Fisiologia Renal (30 horas)

Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências - UNESP - Câmpus de Botucatu.

Metodologia Científica (30 horas)

Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências - UNESP - Câmpus de Botucatu.

Fisiologia Humana

Fisiologia Digestória (30 horas)

Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências - UNESP - Câmpus de Botucatu.

Iniciação Científica (45 horas)

Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências - UNESP - Câmpus de Botucatu.

Farmacodinâmica e Toxicologia Ambiental (60 horas)

Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências - UNESP - Câmpus de Bauru.

Atividade de extensão

Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2020, Botucatu – SP, duração de 48 horas

Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2019, Botucatu – SP, duração de 48 horas

Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, 01/2018, Botucatu – SP, duração de 48 horas

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

Emilio-Silva, M. T.; Zarricueta, M. L.; **Rodrigues, V. P.**; Raimundo, P. R.; Rocha, L. R. M.;

Hiruma-Lima, C. A. Antipyretic effect of myrcene (MCN) as a potential therapeutic alternative for the treatment of systemic inflammation response (SI) in euthermic rats model In: MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 7th ed., 2021, Paris/Galvestone.

CHEMBIOMOL-07: Chem. Biol., Med. Chem., & Mol. Biol. Congress. Basiléia: MDPI, 2021.

Rodrigues, V. P.; Emilio-Silva, M. T.; Ohara, R.; Bueno, G.; Raimundo, P. R.; Gomes, V. G.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Citral, a valuable aid against metabolic inflammation? In: MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 7th ed., 2021, Paris/Galvestone.

CHEMBIOMOL-07: Chem. Biol., Med. Chem., & Mol. Biol. Congress. Basiléia: MDPI, 2021.

Bueno, G.; **Rodrigues, V. P.**; Ohara, R.; Emilio-Silva, M. T.; Assuncao, R.; Gomes, V. G.; Dario, F. L.; Raimundo, P. R.; Fioretto, A. C.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Effect of Baccharis trimera Less (DC) essential oil in obese mice on a high-fat diet, part 1. adipose tissues evaluation In: MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 7th ed., 2021, Paris/Galvestone.

CHEMBIOMOL-07: Chem. Biol., Med. Chem., & Mol. Biol. Congress. Basiléia: MDPI, 2021.

Fioretto, A. C.; Ohara, R.; Emilio-Silva, M. T.; **Rodrigues, V. P.**; Bueno, G.; Assuncao, R.; Dario, F. L.; Gomes, V. G.; Raimundo, P. R.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Evaluation of protective effect of citral on gastroesophageal reflux disease in eutrophic and obese mice In: MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 7th ed., 2021, Paris/Galvestone.

CHEMBIOMOL-07: Chem. Biol., Med. Chem., & Mol. Biol. Congress. Basiléia: MDPI, 2021.

Raimundo, P. R.; **Rodrigues, V. P.**; Emilio-Silva, M. T.; Gomes, V. G.; Bueno, G.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Is citral's anti-inflammatory action capable of changing the hypothalamic inflammation in obese mice? In: MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 7th ed., 2021, Paris/Galvestone.

CHEMBIOMOL-07: Chem. Biol., Med. Chem., & Mol. Biol. Congress. Basiléia: MDPI, 2021.

Ohara, R.; Dario, F. L.; Bueno, G.; **Rodrigues, V. P.**; Emilio-Silva, M. T.; Assuncao, R.; Fioretto, A. C.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Modulation of matrix metalloproteinases exerted by Citral in the healing of gastric ulcers in eutrophic and obese mice In: MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering, 7th ed., 2021, Paris/Galvestone.

CHEMBIOMOL-07: Chem. Biol., Med. Chem., & Mol. Biol. Congress. Basiléia: MDPI, 2021.

Trabalhos apresentados em congressos

Emilio-Silva, M. T.; Santos, R. C.; **Rodrigues, V. P.**; Perico, L. L.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A.

Antidiarrheal activity of Limonene and Citrus aurantium L. on an experimental model of

castor oil-induced diarrhea in mice, 2019.

Emilio-Silva, M. T.; **Rodrigues, V. P.**; Bueno, G.; Ohara, R.; Rocha, L. R. M.; Branco, L. G.; Hiruma-Lima, C. A.

Citral reduced levels of plasmatic TNF-alpha in mice fed with standard diet (SD) and high-fat diet (HFD) following LPS-induced systemic inflammation, 2019.

Hiruma-Lima, C. A.; Perico, L. L.; Emilio-Silva, M. T.; Ohara, R.; Bueno, G.; **Rodrigues, V. P.**; Rocha, L. R. M.; Barbosa-Filho, J. M.; Batista, L. M.

Monoterpenes: systematic review about the advances in the management of peptic Ulcer and Helicobacter pylori, 2019.

Ohara, R.; Perico, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Bueno, G.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A.
Terminalia catappa: An alternative treatment for gastric lesions induced by ischemia and reperfusion, 2019.

Bueno, G.; Perico, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Ohara, R.; Emilio-Silva, M. T.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A.

The role of essential oil Baccharis trimera in experimental ulcer disease: characterization of anti-inflammatory and healing mechanisms of action, 2019.

Rodrigues, V. P.

Atividades Farmacológicas de Plantas Medicinais, 2018.

Fagundes, F. L.; Romano, K. S. F.; Perico, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Gambero, A.; Vilegas, W.; Hiruma-Lima, C. A.; Santos, R. C. **Byrsonima Intermedia A. Juss Recovers Intestinal Mucosa After Ulcerative Colitis: Role Of Anti Inflammatory And Anti Oxidant Pathways, 2018.**

Piffer, G. M.; Fagundes, F. L.; Périco, L. L.; **Rodrigues, V. P.**; Hiruma-Lima, C. A.; Santos, R. C. **Effect Of Chrysin In Peptic Ulcer: Gastroprotection Against Ethanol And Repair Of Intestinal Mucosa After Polypharmacy., 2018.**

Disciplinas cursadas

Tópicos Avançados em Imunologia e Imunopatologia (4 créditos)

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada (2 créditos)

Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia (6 créditos)

Bioestatística usando ambiente estatístico R (4 créditos)

O cientista e o professor universitário (2 créditos)

Resumo

A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, a Organização Mundial da Saúde (O.M.S.) estima que mais de 700 milhões de adultos serão obesos em 2025. A obesidade é caracterizada por um acúmulo excessivo de gordura que pode comprometer a saúde. O tecido adiposo (TA), além de regulador energético do organismo, assume uma função imune diretamente envolvida no início e manutenção da resposta inflamatória que se estabelece com a instalação da obesidade. O TA é regulado por leucócitos e mediadores anti-inflamatórios, porém com o desenvolvimento da obesidade esse ambiente torna-se pró-inflamatório com o intuito de proteger o organismo. Essa inflamação metabólica é responsável pelo surgimento de enfermidades como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares. Encontrar um tratamento adequado à obesidade e seus desdobramentos têm se mostrado um grande desafio. Estudos prévios demonstraram o potencial anti-inflamatório e antiadipogênico do citral, um monoterpeno obtido das folhas do capim limão. Essas ações tornam o citral um excelente candidato a agente terapêutico no tratamento da inflamação metabólica, combatendo a obesidade e sua resposta inflamatória. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito curativo do citral no processo inflamatório relacionado à obesidade induzida por dieta hipercalórica em animais experimentais. A exposição da linhagem *Swiss* à dieta hiperlipídica por 84 dias induziu obesidade aumentando a massa corporal e índice de adiposidade, porém os animais não apresentaram as alterações metabólicas necessárias para que nossos objetivos iniciais fossem alcançados. A HFD oferecida aos C57BL/6J pelo mesmo período também induziu obesidade aumentando a massa corporal, índice de adiposidade, glicemia e perfil lipídico dos camundongos. O citral foi capaz de diminuir a glicemia sem alterar a sensibilidade à insulina dos animais tratados por dez e 17 dias, observou-se também a diminuição de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-6) e um aumento nas citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17). nos animais obesos tratados com citral, indicando um efeito positivo contra a inflamação metabólica.

Palavras-chave: C57BL/6J; Citral; Inflamação metabólica; Obesidade; *Swiss*.

Abstract

Obesity is one of the biggest public health problems in the world, the W.H.O. estimates that more than 700 million adults will be obese by 2025. Obesity is characterized by an excessive accumulation of fat that can compromise health. Adipose tissue (AT), in addition to being the body's energy regulator, assumes an immune function directly involved in the initiation and maintenance of the inflammatory response that is established with the onset of obesity. AT is regulated by leukocytes and anti-inflammatory mediators, but with the development of obesity, this environment becomes pro-inflammatory to protect the body. This metabolic inflammation is responsible for the emergence of diseases such as type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Finding an adequate treatment for obesity and its consequences has been a great challenge. Previous studies have demonstrated the anti-inflammatory and antiadipogenic potential of citral, a monoterpene obtained from lemongrass leaves. These actions make citral an excellent candidate as a therapeutic agent in the treatment of metabolic inflammation, fighting obesity and its inflammatory response. The aim of this study was to evaluate the curative effect of citral on the inflammatory process related to obesity induced by a hypercaloric diet on experimental animals. The exposure of the Swiss strain to the high-fat diet for 84 days induced obesity, increasing body mass and adiposity index, but the animals did not show the necessary metabolic changes for our initial goals to be achieved. HFD offered to C57BL/6J for the same period also induced obesity by increasing body mass, adiposity index, glycemia and lipid profile of mice. Citral was able to decrease blood glucose without changing the insulin sensitivity of animals treated for ten and 17 days, there was also a decrease in pro-inflammatory mediators (TNF- α e IL-6) and an increase in anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17) in obese animals treated with citral, indicating a positive effect against metabolic inflammation.

Keywords: C57BL/6J; Citral; Metabolic Inflammation; Obesity; Swiss.

Lista de Figuras

Figura 1 – Células presentes no tecido adiposo em homeostasia.	22
Figura 2 – Indução e manutenção do estado inflamatório durante a obesidade.	24
Figura 3 – Linha do tempo dos períodos de indução de obesidade e tratamento curativo dos animais nos diferentes experimentos.	29
Figura 4 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de sete dias e índice de adiposidade de camundongos Swiss.	31
Figura 5 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de 14 dias e índice de adiposidade de camundongos <i>Swiss</i>	32
Figura 6 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de 21 dias e índice de adiposidade de camundongos.	33
Figura 7 – Linha do tempo dos períodos de indução de obesidade e tratamento curativo dos animais nos diferentes experimentos.	40
Figura 8 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de dez dias e índice de adiposidade de camundongos C57BL/6J.	42
Figura 9 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de 17 dias e índice de adiposidade de camundongos C57BL/6J.	44
Figura 10 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de 24 dias e índice de adiposidade de camundongos C57BL/6J.	46
Figura 11 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à glicose (GTT) realizados antes e após dez dias de tratamento em camundongos C57BL/6J.	48
Figura 12 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à insulina (ITT) realizados antes e após dez dias de tratamento em camundongos C57BL/6J.	49
Figura 13 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à glicose (GTT) realizados antes e após 17 dias de tratamento em camundongos C57BL/6J.	50
Figura 14 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à insulina (ITT) realizados antes e após 17 dias de tratamento em camundongos C57BL/6J.	51
Figura 15 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à glicose (GTT) realizados antes e após 24 dias de tratamento em camundongos C57BL/6J.	52
Figura 16 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à insulina (ITT) realizados antes e após 24 dias de tratamento em camundongos C57BL/6J.	53

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Massa dos órgãos de camundongos machos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento...	32
Tabela 2 – Massa dos órgãos de camundongos <i>Swiss</i> após 14 dias de tratamento.	33
Tabela 3 – Massa dos órgãos de camundongos <i>Swiss</i> após 21 dias de tratamento.	34
Tabela 4 – Níveis de mediadores inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento.	34
Tabela 5 – Níveis de mediadores inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos <i>Swiss</i> após 14 dias de tratamento.....	35
Tabela 6 – Níveis de mediadores inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos <i>Swiss</i> após 21 dias de tratamento.....	35
Tabela 7 – Mecanismos antioxidante hepático de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento.	36
Tabela 8 – Níveis de mediadores inflamatórios nos fígados de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento.....	36
Tabela 9 – Mecanismos antioxidante e mediador inflamatório hepático de camundongos <i>Swiss</i> após 14 dias de tratamento.....	37
Tabela 10 – Mecanismos antioxidante e indicador inflamatório hepático de camundongos <i>Swiss</i> após 21 dias de tratamento.....	37
Tabela 11 – Níveis de mediadores inflamatórios nos hipotálamos de camundongos <i>Swiss</i> após sete dias de tratamento.....	38
Tabela 12 – Níveis de mediadores inflamatórios dos hipotálamos de camundongos <i>Swiss</i> após 14 dias de tratamento.....	38
Tabela 13 – Níveis de mediadores inflamatórios dos hipotálamos de camundongos <i>Swiss</i> após 21 dias de tratamento.....	38
Tabela 14 – Massa dos órgãos de camundongos C57BL/6J após dez dias de tratamento	43
Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos de camundongos C57BL/6J após dez dias de tratamento.....	44
Tabela 16 – Índice de adiposidade e massa dos órgãos de camundongos C57BL/6J após 17 dias de tratamento.....	45
Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos de camundongos C57BL/6J após 17 dias de tratamento.....	45
Tabela 18 – Índice de adiposidade de camundongos C57BL/6J após 24 dias de tratamento. .	46
Tabela 19 – Parâmetros bioquímicos de camundongos C57BL/6J após 24 dias de tratamento.....	47
Tabela 20 – Níveis de mediadores pró-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL6J após dez dias de tratamento.	54
Tabela 21 – Níveis de mediadores anti-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL6J após dez dias de tratamento.	54
Tabela 22 – Níveis de mediadores pró-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J após 17 dias de tratamento.....	55
Tabela 23 – Níveis de mediadores anti-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J após 17 dias de tratamento.....	55
Tabela 24 – Níveis de mediadores pró-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J após 24 dias de tratamento.....	56
Tabela 25 – Níveis de mediadores anti-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J após 24 dias de tratamento.....	56
Tabela 26 – Mecanismos antioxidante e indicador inflamatório hepático de camundongos C57BL/6J após dez dias de tratamento.....	57

Tabela 27 – Mecanismos antioxidante e mediador inflamatório hepático de camundongos C57BL/6J após 17 dias de tratamento.	57
Tabela 28 – Mecanismos antioxidante e mediador inflamatório hepático de camundongos C57BL/6J após 24 dias de tratamento.	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABCA1 – Transportador 1 de cassetes de ligação de ATP

AGL – Ácidos graxos livres

ALT – Alanina aminotransferase

AP-1 – Proteína ativadora 1

ApoE – Apolipoproteína E

AST – Aspartato aminotransferase

AUC – Área sob a curva

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética para o uso de Animais

CPPA – Centro de Pesquisa e Produção Animal

DAMP – Padrões moleculares associados à danos

DHGA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

DP – Dieta Padrão

DTNB - 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)

ERK 1/2- Quinase regulada por sinal extracelular 1/2

ERO – Espécie reativa de oxigênio

FA – Fosfatase Alcalina

GGT – Gama glutamiltransferase

GSH – Glutathione

GTT – Teste de tolerância à glicose

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HFD – Dieta hiperlipídica

IFN- γ – Interferon gama

IKK – Quinase inibidora do NF- κ B

IL – Interleucina

ILC2 – Célula linfóide inata do tipo 2

ITT – Teste de tolerância à insulina

JNK – Quinase c-Jun N-terminal

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LPS – Lipopolissacarídeo

LXR – Receptor X hepático

M1 – Macrófago tipo 1

M2 – Macrófago tipo 2

MCP-1 – Proteína quimioatraentes de monócitos

MDA – Malondialdeído

NBT – Azul de nitrotetrazólio

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B

NLRP3 – Domínio de pirina da família de receptores *NOD-like* contendo 3

NK – Célula natural killer

OMS – Organização Mundial da Saúde

PRR – Receptores reconhecedores de padrão

SOD – Superóxido dismutase

TA – Tecido adiposo

TAM – Tecido adiposo mesentérico

TAV – Tecido adiposo visceral

Th – Célula T *helper*

TLR-2 – Receptor *toll-like* tipo 2

TLR-4 – Receptor *toll-like* tipo 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Célula T reguladora

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Objetivos	27
Capítulo 1	28
3. Material e Métodos	28
3.1. Animais	28
3.2. Indução da Obesidade, tratamentos e coleta de material	28
3.3. Análise Histológica	29
3.4. Homogeneização de tecido	29
3.5. Quantificação de citocinas (Luminex)	29
3.6. Estresse oxidativo e mecanismos antioxidante hepático	30
3.6.1. Quantificação de malondialdeído (MDA)	30
3.6.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	30
3.6.3. Quantificação de catalase (CAT)	30
3.6.4. Determinação de Glutathione Reduzida (GSH)	30
3.7. Análise Estatística	30
4. Resultados	31
4.1. Evolução de massa corporal e massa dos órgãos	31
4.2. Mediadores inflamatórios no tecido adiposo	34
4.3. Estresse oxidativo e mediadores inflamatórios hepáticos	35
4.4. Mediadores inflamatórios hipotalâmicos	37
Capítulo 2	39
5. Material e Métodos	39
5.1. Animais	39
5.2. Indução da Obesidade, tratamentos e coleta de material	39
5.3. Testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT)	40
5.4. Homogeneização dos tecidos	41
5.5. Quantificação de citocinas (Luminex e ELISA)	41
5.6. Estresse oxidativo e mecanismos antioxidante hepático	41
5.6.1. Quantificação de malondialdeído (MDA)	41
5.6.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)	41
5.6.3. Quantificação de catalase (CAT)	41
5.6.4. Determinação de Glutathione Reduzida (GSH)	42
5.7. Análise Estatística	42
6. Resultados	42

6.1. Evolução de massa corporal, massa dos órgãos e parâmetros bioquímicos	42
6.2. Perfil glicêmico	48
6.3. Mediadores inflamatórios no tecido adiposo	54
6.4. Mecanismos antioxidante e mediador inflamatório hepático	56
Capítulo 3	59
7. Discussão	59
8. Conclusões	65
9. Referências	66
Anexo 1	74
Anexo 2	75

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde a obesidade é um problema crescente de saúde. Definida como um acúmulo excessivo de gordura potencialmente deletério ao organismo, a obesidade atinge pessoas tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, independentemente de faixa etária e grupos socioeconômicos¹. Em 2016 estimou-se que 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso e 650 milhões estavam obesos no mundo inteiro, um aumento de 200% na prevalência da obesidade desde 1975¹.

No Brasil a prevalência da obesidade vem aumentando continuamente há mais de uma década. Entre 2002 e 2019 um aumento de 137,5% e 108,3% na prevalência de obesidade de homens e mulheres, respectivamente, culminou em 25,9% da população adulta brasileira com algum grau de obesidade².

O acúmulo de gordura no organismo ocorre, essencialmente, a partir de um balanço energético positivo, isto é, quando a carga energética ingerida supera a energia gasta pelo indivíduo¹. Isso pode acontecer por causa de fatores genéticos (obesidade monogênica ou síndrômica) quando danos ou mutações são responsáveis por desregular vias moduladoras energéticas afetando apetite, fome e saciedade, por exemplo³. Entretanto esses casos são raros na população e os quadros comumente desenvolvidos são multifatoriais, influenciados tanto por fatores genéticos, quanto por fatores ambientais³.

Os fatores ambientais envolvidos no desenvolvimento da obesidade se tornaram mais presentes e cada vez mais influentes no dia a dia de grande parte da população global, estimulando a adoção de comportamentos obesogênicos⁴. É necessário entender que esses fatores ambientais são complexos e afetam uns aos outros; nas últimas décadas houve a valorização do trabalho intelectual, com baixo gasto energético, ao mesmo tempo que houve o aumento da disponibilidade e menor custo de alimentos com alta densidade calórica os tornaram opções mais convenientes para o consumo, resultando com isso em um contexto favorável a um estilo de vida que sustente um balanço energético positivo⁴.

A análise feita sobre a Carga Global de Morbidade por Dai⁵ e colaboradores em 2017 demonstrou que as mortes atribuíveis a um alto índice de massa corporal mais que dobrou entre 1997 e 2017 somando cerca de 2,7 milhões de morte apenas em 2017. Ambas as formas de obesidade podem estar relacionadas com diferentes enfermidades tais como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, doença hepática gordurosa não alcoólica, doenças renais, desordens musculoesqueléticas, e alguns tipos de câncer^{1,5,6}.

As comorbidades relacionadas à obesidade estão fortemente ligadas à inflamação do tecido adiposo⁷. A primeira evidência relacionando inflamação e obesidade ocorreu em 1964 quando D.O. Ogston e G.M. McAndrew⁸ observaram que pacientes obesos apresentavam altos níveis plasmáticos de fibrinogênio. Porém, os conceitos sobre o tecido adiposo (TA) só começaram a serem modificados três décadas mais tarde com a descoberta da leptina, um importante hormônio regulador de fome e saciedade, e o seu envolvimento na síntese de TNF- α por adipócitos⁹⁻¹¹.

Apesar de ser composto, principalmente, por células especializadas na deposição de lipídios, o tecido adiposo não se limita a armazenar energia passivamente. Além do acúmulo de gordura, os adipócitos também desempenham um papel regulador no metabolismo energético através da produção e secreção de mediadores como a leptina e adiponectina que atuam modulando o apetite e a sensibilidade à insulina, respectivamente¹².

Parte da regulação energética desempenhada pelo TA ocorre através de uma resposta imune^{13,14}. Ao manter um hábito alimentício com excesso de nutrientes, o indivíduo causa ao organismo um estresse metabólico, contra o qual uma resposta inflamatória é desencadeada com o objetivo de restaurar a homeostasia energética¹⁵. Esses eventos levam à um desequilíbrio na síntese de adipocinas (hormônios, citocinas e quimiocinas) pró- e anti-inflamatórias, bem como um aumento de macrófagos, neutrófilos e células *natural killers* (NK), além de uma redução de células anti-inflamatórias no tecido adiposo visceral (TAV)^{16,17}.

Em camundongos, foi demonstrado que o TAV apresenta um aumento no número de neutrófilos já nos primeiros dias de dieta hiperlipídica. Esses neutrófilos são responsáveis pelo remodelamento do TA¹⁸, porém, ainda não se conhece o fator que desencadeia o recrutamento dessas células. Em humanos, foi demonstrado que o aumento de lipídios na alimentação é capaz de elevar os níveis de proteína quimioatraente de monócitos (MCP)-1 e proteína c-reativa o que agrava, transitoriamente, a resposta inflamatória¹⁹. Outra possível explicação para a mobilização neutrofílica, são as alterações ocorridas no microambiente adiposo que aumenta o consumo de oxigênio do tecido, levando ao aumento da expressão de leptina e IL-6, possíveis responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para o tecido. Contudo, apesar do aumento inicial de neutrófilos no TA, a longo prazo essas células representam uma pequena parte da população leucocitária no tecido²⁰.

Diferentemente dos neutrófilos, as células NK e os macrófagos aumentam de maneira mais lenta quando submetido a dieta hipercalórica. As células NK se originam, principalmente, da proliferação de células residentes do TA enquanto os macrófagos parecem ter um recrutamento

mais complexo. Alguns estudos demonstram que a proliferação local é a principal fonte macrofágica, enquanto outros mostram a importância de fatores quimioatraentes no recrutamento dos macrófagos e, portanto, a relevância do fluxo periférico dessas células para o TA^{21,22}.

O número elevado de células imunes é uma característica relevante do TA inflamado, elas podem assumir dois estados de ativação, o tipo 1 no qual as células assumem um perfil pró-inflamatório ou, em contraste, o tipo 2 no qual as células adotam funções anti-inflamatórias²³.

Durante a homeostasia metabólica as principais células imunes presentes são macrófagos M2, linfócitos T *helper* (Th)2 CD4+, T reguladores (Treg), NK, eosinófilos e células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2s). A citocina IL-33, produzida constitutivamente por células epiteliais e endoteliais, age regulando a produção de citocinas anti-inflamatórias e tem como alvo, principalmente, as células Treg, ILC2s e eosinófilos. As células ILC2s produzem IL-5 e IL-13 que atuam em eosinófilos e adipócitos, respectivamente. Os eosinófilos e, secundariamente, células NK, produzem IL-4 que age nos macrófagos M2, fonte de IL-10 uma potente mediadora anti-inflamatória. A IL-10 produzida pelas células Treg e macrófagos M2 em conjunto com a adiponectina proveniente dos adipócitos mantém um ambiente anti-inflamatório com capacidade de reparo, remodelação e preservação da sensibilidade à insulina do TA (Figura 1)^{17,23,24}.

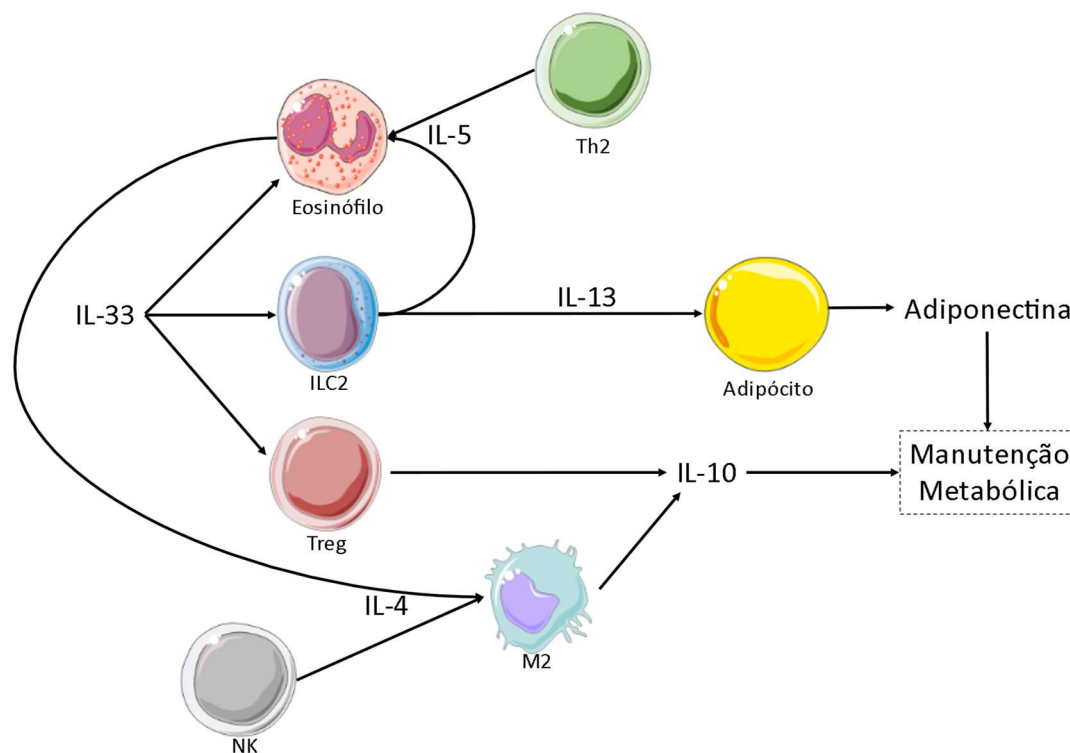


Figura 1 – Células presentes no tecido adiposo em homeostasia. A IL-33 atua mantendo as principais células imunes anti-inflamatórias presentes no tecido adiposo durante a homeostasia energética. Os eosinófilos, células

linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) e células natural killer (NK) estimulam adipócitos e macrófagos tipo 2 (M2) que, em conjunto com as células T reguladoras (Treg), secretam adipocinas para manutenção metabólica.

Porém, a ingestão excessiva de calorias provoca uma mudança no TA e nas células presentes nele causando estresses metabólicos intra e extracelular, como o estresse de retículo endoplasmático, estresse oxidativo, hipóxia e a morte de adipócitos na presença de ácidos graxos livres (AGL) e aumento de lipopolissacarídeo (LPS) no organismo, tornando o ambiente anti-inflamatório do TA em pró-inflamatório^{6,23}. Como resultado, ocorre a ativação das vias da quinase c-Jun N-terminal (JNK), quinase inibidora do NF- κ B (IKK), quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) e proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38), importantes transdutores de sinais inflamatórios, que ativam a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias através da atividade dos fatores de transcrição NF-KB e proteína ativadora 1 (AP-1)^{25,26}.

Com o desenvolvimento e manutenção da obesidade, as células no TA assumem o perfil do tipo 1 e o número de macrófagos M1 aumenta, especialmente, em relação aos macrófagos M2. Com grande parte das células adotando funções pró-inflamatórias, citocinas e AGL induzem a produção de reguladores como TNF- α e IL-1 β que atuam na manutenção tecidual e sua adaptação às demandas metabólicas associadas ao excesso de nutrientes acarretando o desenvolvimento da resistência à insulina e das doenças metabólicas associadas^{6,16}.

Apesar de já se conhecer muitos dos mediadores e células envolvidas na inflamação metabólica, ainda não se sabe ao certo quais os fatores que desencadeiam tais eventos. Algumas hipóteses foram propostas para tentar explicar como essa resposta se inicia. Lipídeos endógenos ou provenientes da dieta são capazes de se ligar e ativar receptores reconhecedores de padrão (PRR) como os receptores *toll-like* (TLR) 4 e 2 que promovem produção e secreção de quimiocinas e citocinas como a MCP-1, IL-1 β e IL-18²⁷⁻²⁹. Entretanto, a capacidade dos AGL de iniciar a resposta inflamatória vem sendo questionada, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que os AGLs só são capazes de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias após os macrófagos adotarem o fenótipo M1 ao serem estimulados com LPS ou IFN- γ , esse fato levantou a hipótese de que toxinas provenientes de bactérias presentes no intestino seriam os iniciadores da inflamação metabólica³⁰.

Na obesidade os níveis de LPS circulantes estão elevados devido ao aumento da permeabilidade intestinal. Esse antígeno derivado de bactérias gram-negativas, ativa TLR-4 que inicia ou agrava a cascata inflamatória principalmente no tecido adiposo mesentérico (TAM)^{31,32} ao ativar o inflamassoma NLRP3, esse complexo proteico é ativado por diversos sinais

inflamatórios e promove a produção e liberação de IL-1 β que estimula a diferenciação de monócitos recrutados para o TA no qual se diferenciarão em macrófagos M1³³.

Existem fatores locais importantes na indução dos macrófagos para o tipo 1 como a produção de interferon (IFN)- γ . A expansão do TA gera estresse bioquímico e mecânico nos adipócitos o que estimula a produção de IFN- γ por células imunes locais. As ILC2s se tornam menos sensíveis à ação da IL-33. Ao mesmo tempo, fatores sistêmicos como LPS, atuam de forma a induzir as células imunes a adotar o fenótipo tipo 1, tornando-as sensíveis à estímulos pró-inflamatórios como leucotR.nos, AGL e padrões moleculares associados a danos (DAMP) provenientes de adipócitos necróticos, envoltos por macrófagos, formando estruturas *crown-like*. Os macrófagos, então, passam a produzir mais citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, resultando no recrutamento de mais células pro-inflamatórias incluindo células CD4+, CD8+ e linfócitos B amplificando a resposta imunológica (Figura 2)¹⁷.

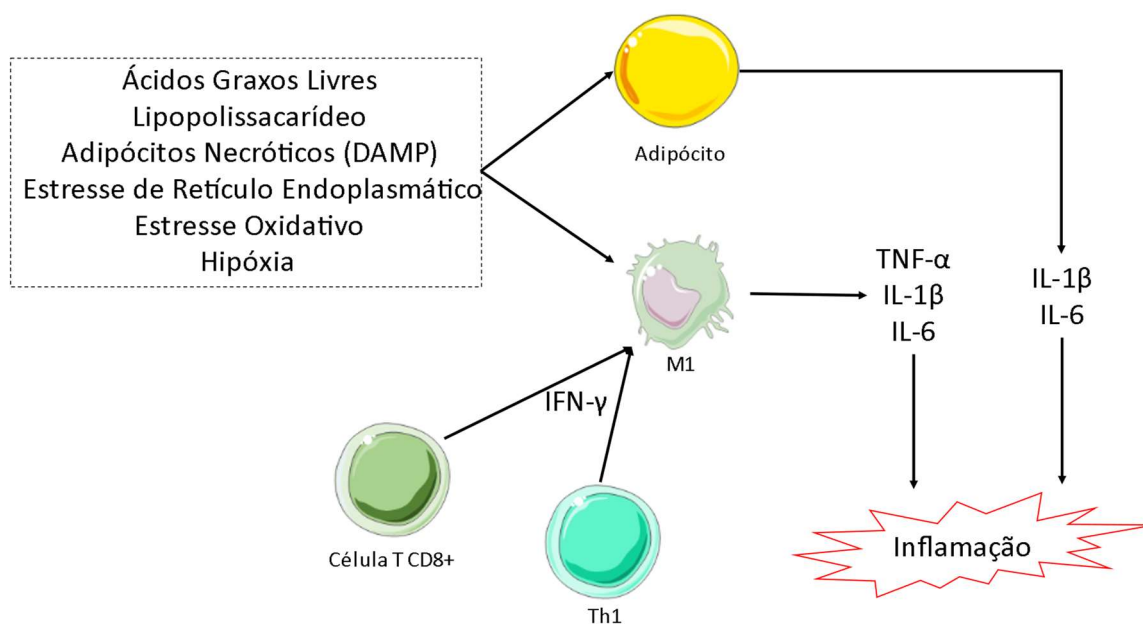


Figura 2 – Indução e manutenção do estado inflamatório durante a obesidade. Ácidos graxos livres, lipopolissacarídeos, fatores provenientes de adipócitos necróticos, hipóxia, estresse oxidativo e do retículo endoplasmático ativam o perfil pró-inflamatório de adipócitos e macrófagos que passa a produzir TNF- α , IL-1 β e IL-6 que atuam sistemicamente. Células T CD8+ e T *helper* 1 (Th1) produzem interferon- γ , responsável pela manutenção das células em seus perfis pró-inflamatório.

A resposta inflamatória tem um papel protetor no organismo, pois ela é iniciada quando a homeostase é prejudicada por infecções, danos ou estresse tecidual. Sua função é defender e restaurar as funções fisiológicas do corpo quando os mecanismos homeostáticos são insuficientes. Na obesidade os mediadores inflamatórios têm como objetivo adaptar o organismo à sua situação metabólica, porém essa flexibilidade adaptativa confere ao organismo uma maior suscetibilidade a doenças³⁴.

O número de células e mediadores anti-inflamatórios diminuem drasticamente com o estabelecimento da obesidade. Esses mediadores imunológicos estão associados às vias que regulam a termogênese e a sensibilidade à insulina^{35,36}. Portanto, é possível considerar a estimulação da imunidade tipo 2 como outro caminho possível na terapêutica da inflamação metabólica⁶.

A inflamação gerada pela obesidade provoca uma resistência à insulina no organismo, essa resistência desregula o controle da lipólise que ocorre no TA resultando no aumento de AGL circulantes. O fígado, então, sequestra os AGL circulantes para serem usados na lipogênese, tem a gliconeogênese inibida e, nessas condições, a lipogênese *de novo* promove um acúmulo hepático de lipídeos³⁷.

O acúmulo de gordura no fígado, causa uma disfunção do ambiente intracelular, levando a desregulação de organelas, danos e até morte celular dos hepatócitos³⁸. Essa lipotoxicidade está relacionada ao aumento do estresse oxidativo, produtos de peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), e espécies reativas de oxigênio (ERO), associada à inflamação o acúmulo de gordura pode progredir de uma simples esteatose até uma esteato-hepatite não alcoólica, causando sérios prejuízos metabólicos ao organismo³⁹.

Uma importante linha de defesa dos hepatócitos contra as lesões causadas pelo acúmulo de lipídeos são as enzimas antioxidantes que incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione reduzida (GSH). Evidências apontam para um desequilíbrio desse mecanismo de defesa hepático com a diminuição das atividades dessas enzimas⁴⁰.

Considerando o importante papel do desbalanço redox no comprometimento da função hepática, compostos antioxidantes ou que estimulem o sistema de defesa contra EROs podem ter efeito benéfico contra a progressão do acúmulo de ácidos graxos no fígado, minimizando os danos no órgão e, conseqüentemente os efeitos deletérios no metabolismo sistêmico⁴⁰.

Encontrar um tratamento adequado à obesidade e seus desdobramentos têm se mostrado um grande desafio, porém a relação entre obesidade, inflamação e suas complicações naturalmente tornam a inflamação e seus mediadores alvos terapêuticos promissores¹⁶. Entretanto, testes clínicos com agentes anti-inflamatórios têm sido insatisfatórios para o tratamento da obesidade⁶. Anticorpos que neutralizam TNF- α já se provaram eficazes no tratamento de doenças como artrite reumatoide, incluindo melhora no metabolismo de glicose em alguns pacientes, porém os resultados observados em pacientes com diabetes tipo 2 não são eficientes, apesar de apresentar efeitos benéficos em camundongos. Em humanos, o anticorpo anti-TNF não melhorou o metabolismo de glicose nos pacientes diabéticos⁴¹⁻⁴⁴. Os antagonistas de IL-1 β

geram uma resposta metabólica positiva nos pacientes com diabetes tipo 2, porém esse efeito parece ser mediado pelo pâncreas e não pelo TA⁴⁵. O agente terapêutico mais promissor, até o momento, é o salicilato, que tem a capacidade de diminuir os níveis glicêmicos de pacientes, além de seu efeito anti-inflamatório. Contudo, esse efeito metabólico se dá através de mecanismos independentes da inflamação⁴⁶⁻⁴⁸.

A busca por terapias contra a inflamação metabólica não vem atendendo às expectativas. Os agentes terapêuticos pesquisados têm mostrado efeitos insatisfatórios ou insuficientes para um tratamento efetivo, a grande limitação da terapêutica anti-inflamatória é a intervenção de apenas um mediador ou via inflamatória. Essa abordagem pontual não produz efeitos satisfatórios no contexto geral da inflamação metabólica⁶, portanto é necessário procurar novas alternativas que possam agir de forma eficiente nessa condição.

Os produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, são desde a antiguidade uma importante fonte de ativos terapêuticos. As plantas são uma fonte importante de biomoléculas ativas, muitas das quais são utilizadas para a síntese de muitos fármacos, podendo contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas^{49,50}.

Diversos compostos importantes para a medicina moderna surgiram de estudos etnobotânicos ou etnofarmacológicos. Produtos naturais e seus derivados ocupam um lugar de destaque na pesquisa de desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças humanas, no qual mais de 65% dos novos fármacos aprovados entre 1981 e 2014 tem como origem, direta ou indireta, os produtos naturais⁵¹.

Os terpenos são compostos que integram uma classe diversificada de substâncias naturais. Contendo mais de 25.000 compostos já bem definidos. Essas substâncias podem ter cadeias cíclicas ou acíclicas e são classificadas em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos de acordo com o número de isoprenos presentes em suas moléculas. Essa riqueza estrutural confere aos terpenos uma variedade de funções, especialmente os monoterpenos por apresentarem propriedades antibacteriana, antiagregatória, antioxidante, antidiabética, anti-inflamatória, entre inúmeras outras⁵².

O citral é um monoterpeno acíclico amplamente encontrado em espécies vegetais da família Lamiaceae que inclui espécies como manjerição, hortelã, sálvia e erva-cidreira. Além disso, ele é o composto majoritário do óleo essencial de Capim-limão (*Cymbopogon citratus*), espécie muito utilizada na medicina popular⁵².

Diversos estudos já comprovaram a eficácia do óleo essencial de *C. citratus* e do citral como antipirético, antinociceptivo, anti-inflamatório, antiadipogênico e antioxidante. Estudos *in vitro*

demonstraram que o citral é capaz de diminuir a produção de NO e inibir a ativação do NF- κ B em macrófagos⁵³, inibir a expressão de ciclooxigenase-2⁵⁴ além de diminuir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 em macrófagos⁵⁵. Em ensaios *in vivo* já foi descrito o efeito antilipêmico do óleo essencial de *C. citratus*⁵⁶, além da ação antiadipogênica⁵⁷ e antioxidante⁵⁸ do citral em ratos. A capacidade de um tratamento crônico com o citral em reduzir o ganho de peso em roedores pode representar uma opção terapêutica no combate a instalação da obesidade e inibir o desenvolvimento da inflamação metabólica.

Considerando os dados presentes na literatura e formulamos a hipótese de que o citral, atuaria de maneira multialvo contra a inflamação metabólica, inibindo a produção de mediadores pró-inflamatório e estimulando mediadores anti-inflamatórios e, conseqüentemente minimizaria o desenvolvimento das comorbidades relacionadas à inflamação associada à obesidade.

2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito curativo do citral no processo inflamatório relacionado à obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

Os objetivos específicos são:

1. Induzir obesidade em camundongos com dieta hiperlipídica
2. Avaliar o efeito do citral sobre parâmetros bioquímicos sistêmicos dos animais obesos.
3. Avaliar o efeito do citral nos mediadores pró e anti-inflamatórios envolvidos na inflamação metabólica no tecido adiposo.
4. Avaliar o efeito do citral nos mediadores pró-inflamatórios hipotalâmicos dos animais obesos.
5. Investigar o efeito do citral no desbalanço redox hepático decorrente da obesidade.

A seguir a monografia será dividida em três capítulos. O Capítulo 1 se refere à metodologia e resultados obtidos com camundongos da linhagem *Swiss*. O segundo capítulo por sua vez inclui material e métodos e os resultados obtidos com animais C57BL/6J. Finalizando, o Capítulo 3 compreende a discussão, que engloba os dois capítulos anteriores.

Capítulo 1

Considerações Iniciais

Escolhemos empregar a linhagem *Swiss*, pois ela não apresenta uma alta propensão à obesidade e consideramos essa característica interessante pois se aproximaria mais à população humana nesse quisto, quando comparadas a outras linhagens.

Nosso objetivo inicial foi induzir obesidade nos camundongos com dieta hiperlipídica, avaliar o sucesso da indução pelo acúmulo de gordura no organismo desses animais para então testarmos a hipótese de que o citral apresentaria seus efeitos anti-inflamatórios nos animais obesos, através da avaliação de parâmetros bioquímicos sistêmicos, de mediadores pró e anti-inflamatórios no tecido adiposo e hipotalâmico, além de investigar o efeito do citral no desbalanço redox hepático decorrente da obesidade.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Camundongos *Swiss* machos (cinco semanas de idade) provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA), UNESP-Botucatu foram utilizados. Os animais foram mantidos em caixas de fundo sólido forradas com maravalha no biotério de camundongos do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas (setor de Microbiologia e Imunologia) do Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas e com acesso à alimentação e água *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais deste projeto foram previamente submetidos, analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, UNESP – Câmpus de Botucatu sob o protocolo nº 1115 (Anexo 1), estando de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009).

3.2. Indução da Obesidade, tratamentos e coleta de material

Os camundongos foram divididos em grupos que receberam, diariamente, dieta padrão (DP) como controle (Presença Nutrição Animal, Paulínia, SP) com 15% de calorias provenientes de lipídeos ou dieta hiperlipídica denominado de HFD (PragSoluções Biociências, Jaú, SP) com 60% de calorias provenientes de lipídeos por 84 dias⁵⁹.

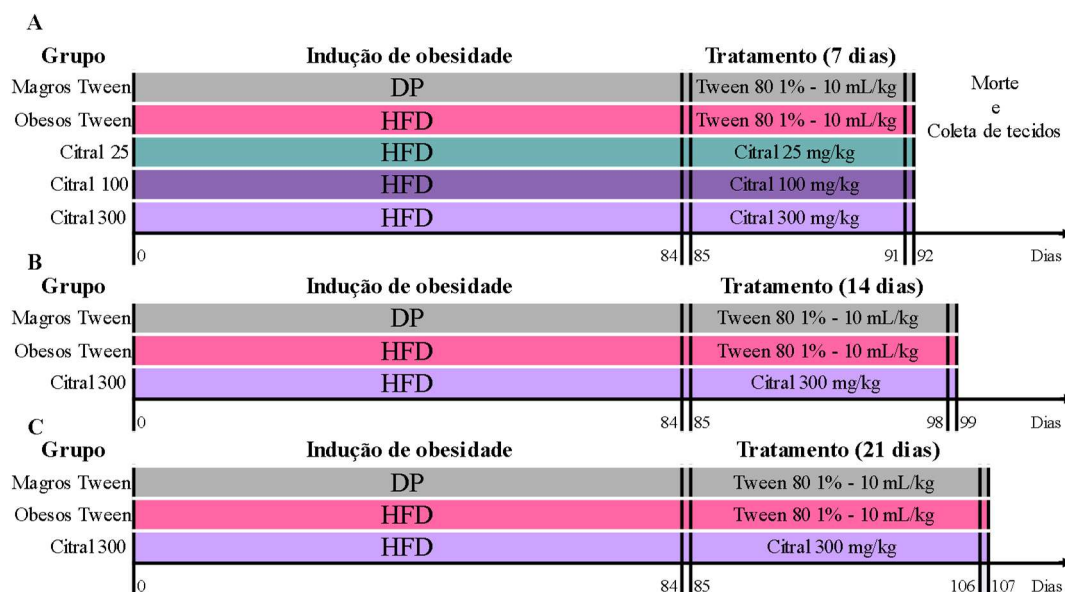


Figura 3 – Linha do tempo dos períodos de indução de obesidade e tratamento curativo dos animais nos diferentes experimentos. A – Tratamento curativo por sete dias; B – Tratamento curativo por 14 dias; C – Tratamento curativo por 21 dias.

Após a indução da obesidade os animais receberam tratamento oral de citral (grau de pureza $\geq 96\%$; Sigma, St.Louis , MO, EUA) 25, 100 ou 300 mg/kg⁶⁰, por sete, 14 ou 21 dias consecutivos para determinação da menor dose efetiva e padronização do período de tratamento (Figura 3).

Para coleta de tecidos os animais foram submetidos a jejum por seis horas. O sangue foi coletado através rompimento dos vasos sanguíneos cervicais, centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos a 25 °C, o soro foi armazenado a -80 °C.

O fígado, hipotálamo e estoques de TA (abdominal, retroperitoneal e epididimal) foram retirados e pesados. As amostras foram armazenadas a -80 °C até sua utilização.

3.3. Análise Histológica

Parte do tecido hepático foi fixado em solução de formalina 10% por 24 horas em temperatura ambiente e armazenado em etanol 70% até sua inclusão em blocos de parafina. Cortes de 5 μ m de espessura foram realizados e as lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina para análise de depósitos de lipídio nos hepatócitos.

3.4. Homogeneização de tecido

Amostras de TA foram homogeneizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.4), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinina 0,1 mg, 35 mg PMSF/mL, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 4 mM, centrifugados a 15000 RPM a 4 °C por 45 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C até utilização.

3.5. Quantificação de citocinas (Luminex)

As citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 foram quantificadas com o kit Luminex mouse magnetic Assay (5-Plex) LXSAMSM-05 (R&D Systems, MN, EUA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.6. Estresse oxidativo e mecanismos antioxidante hepático

3.6.1. Quantificação de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de Ohkawa *et al.* (1979)⁶¹, medindo-se a reação de substâncias do ácido tiobarbitúrico com amostras de tecido hepático. A reação colorimétrica foi feita em tubos de ensaio onde foram adicionados 400 μ L de água destilada, 200 μ L de lauril 8.1%, 1500 μ L de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% diluído em ácido acético 20% e 400 μ L de amostra. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi medida a 532 nm, e os resultados expressos em nmols de MDA/g de tecido.

3.6.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

As amostras de tecido hepático foram diluídas em tampão fosfato, na proporção 1:20. Em 100 μ L do homogenato foram adicionados 150 μ L da solução de hipoxantina (0,1mM), xantina oxidase (0,07U) e azul de nitrotetrazólio (NBT – 0,6mM). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos como unidade de SOD/g de tecido⁶².

3.6.3. Quantificação de catalase (CAT)

Foram adicionados aos homogenatos de amostras hepáticas uma solução de H₂O₂ (0,01 mol em tampão fosfato salino, PBS, 0,05 mol a pH 7). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidade de catalase/minuto x g tecido⁶³.

3.6.4. Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)

O conteúdo de glutathiona reduzida foi determinado utilizando-se 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). A reação enzimática foi constituída de 20 μ L da amostra, 140 μ L de NADPH, 5 μ L de PBS e 20 μ L DTNB. A absorbância foi determinada em 412 nm utilizando-se um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol/g de tecido⁶⁴.

3.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos inicialmente ao teste de D'agostino-Pearson para determinação de normalidade. Dados foram submetidos ao teste *t* de Student não pareado para comparação entre dois grupos e ANOVA de uma via, para comparação entre três grupos ou

mais, seguida do teste de Dunnett ou Tukey ou ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. O valor mínimo de significância estatística considerado será de $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Evolução de massa corporal e massa dos órgãos

Para iniciarmos a indução de obesidade os camundongos foram separados de acordo com o tipo de dieta que receberiam e sem que os grupos apresentassem diferença estatística entre a massa corporal média. Um grupo recebeu a dieta hiperlipídica (HFD) e o outro a dieta padrão (DP) como controle. Após 84 dias os animais alimentados com HFD foram separados aleatoriamente de acordo com os tratamentos que receberiam (cital 25, 100, 300 mg/kg e tween 80 1%, 10 mL/kg).

Embora, os animais alimentados com DP e HFD não tenham apresentado diferença estatística no peso corporal total (Figura 4A) após 84 dias de indução, foi possível constatar um aumento no tecido adiposo (TA) retroperitoneal nos grupos Obesos Tween, Cital 100 e Cital 300 em comparação ao grupo Magros Tween (Tabela 1), além disso o índice de adiposidade confirma o aumento de gordura nos animais alimentados com HFD em relação ao grupo alimentado com DP (Figura 4B), apesar de nenhum grupo alimentado com HFD apresentar aumento do TA epididimal em relação ao grupo Magros Tween.

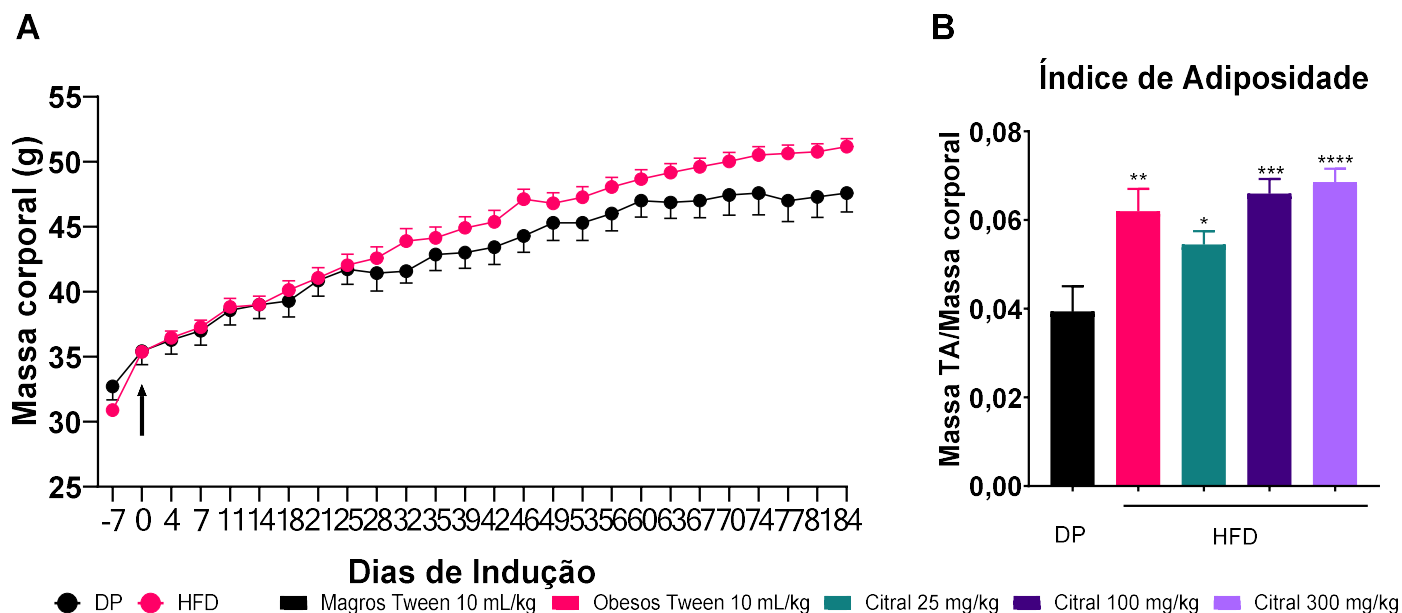


Figura 4 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de sete dias (A) e índice de adiposidade (B) de camundongos Swiss (n=9-10) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A indução de obesidade do grupo HFD começou após um período de sete dias de aclimação (dia 0, seta). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Teste t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Após os sete dias de tratamentos, além do tecido adiposo, fígado, coração, baço e rins foram coletados e pesados. Os fígados dos animais tratados com citral 25 mg/kg apresentaram um aumento em sua massa em comparação ao grupo Magros Tween (Tabela 1). Em contraste, os rins de todos os animais alimentados com HFD apresentaram massa menor que os rins do grupo Magros Tween (Tabela 1).

Tabela 1 – Massa dos órgãos de camundongos machos *Swiss* (n=9-10) após sete dias de tratamento

(mg)	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
TA Epi.	965,8 ± 199,8	1145 ± 144,0	946,1 ± 95,32	1362 ± 73,53	1336 ± 149,8
TA Ret.	396,2 ± 65,53	713,0 ± 86,38 ^a	634,5 ± 66,01	736,2 ± 52,15 ^b	752,6 ± 69,80 ^b
TA Ab.	426,5 ± 67,72	1124 ± 88,68 ^d	1058 ± 77,74 ^c	1073 ± 121,9 ^d	1220 ± 80,03 ^d
Fígado	2089 ± 138,5	2547 ± 191,5	2756 ± 189,3 ^a	2535 ± 158,5	2662 ± 177,8
Coração	235,4 ± 16,19	206,5 ± 8,69	205,3 ± 8,77	210,4 ± 8,24	195,1 ± 6,39 ^a
Baço	164,7 ± 25,89	145,8 ± 12,26	143,6 ± 11,26	132,4 ± 9,29	125,0 ± 8,27
Rins	404,4 ± 13,78	299,0 ± 13,83 ^d	297,3 ± 10,94 ^d	311,8 ± 14,58 ^c	311,2 ± 16,66 ^c

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. A = p < 0,05; b = p < 0,01; c = p < 0,001 e d = p < 0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). TA: tecido adiposo; Epi.: epididimal; Ret.: retroperitoneal; Ab.: abdominal.

Após 14 dias de tratamento os animais alimentados com HFD apresentaram um ganho de massa corporal maior que os animais alimentados com DP (Figura 5A), além de um maior índice de adiposidade (Figura 5B)

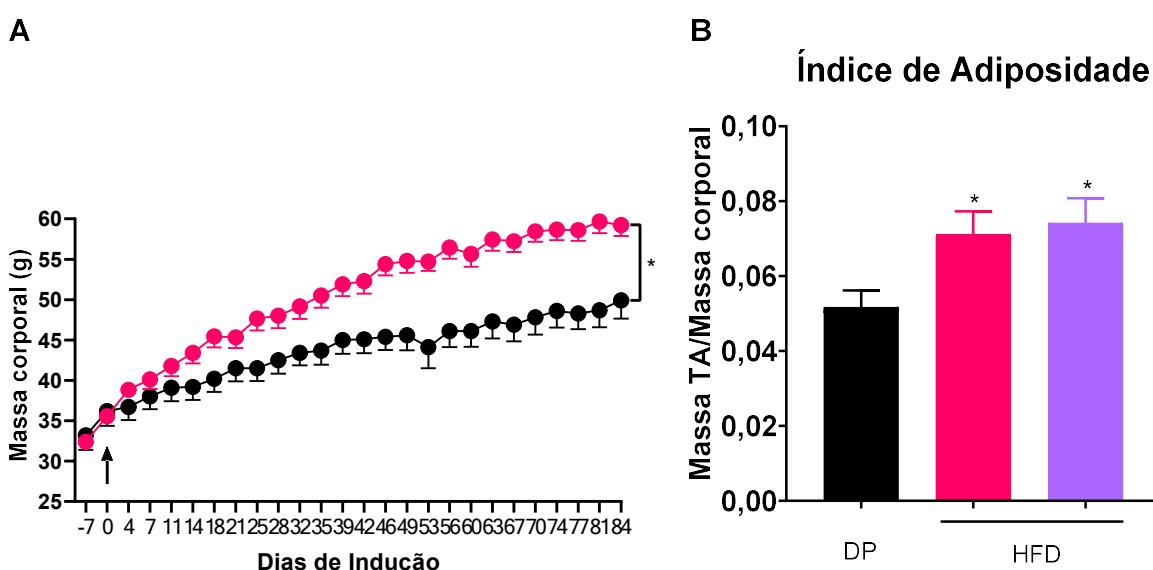


Figura 5 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de 14 dias (A) e índice de adiposidade (B) de camundongos *Swiss* (n=9-10) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A indução de obesidade do grupo HFD começou após um período de sete dias de aclimação (dia 0, seta). Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Teste t de Student. *p<0,05.

Após 14 dias de tratamento também foi possível constatar o aumento de TA retroperitoneal dos animais alimentados com HFD em comparação ao grupo Magros Tween (Tabela 2). Nenhuma outra alteração foi observada no peso dos órgãos dos animais em comparação ao grupo Magros Tween (Tabela 2).

Tabela 2 – Massa dos órgãos de camundongos *Swiss* (n=9-10) após 14 dias de tratamento.

(mg)	DP Magros Tween	HFD	
		Obesos Tween	Citral 300
TA Epididimal	1112 ± 139,2	1708 ± 206,3 ^a	1594 ± 178,4
TA Retroperitoneal	450,0 ± 75,53	1250 ± 151,2 ^c	1146 ± 175,8 ^b
TA Abdominal	854,5 ± 83,45	1232 ± 196,2	1342 ± 151,4
Fígado	2389 ± 176,4	2723 ± 220,8	2810 ± 194,8
Coração	239,0 ± 9,730	270,5 ± 17,69	236,6 ± 10,77
Baço	171,2 ± 14,06	153,6 ± 7,972	187,5 ± 47,34
Rins	368,8 ± 9,726	332,5 ± 18,18	325,2 ± 29,66

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01; c=p<0,001 (comparação ao grupo Magros Tween). TA: tecido adiposo.

A oferta de HFD anterior aos tratamentos com a duração de 21 dias aumentou significativamente a massa corporal dos animais alimentados com ela em relação ao grupo controle (Figura 6A). Adicionalmente, todos os depósitos de TA dos animais alimentados com HFD apresentaram grande acúmulo ao fim do experimento em relação aos animais alimentados com DP (Tabela 3). Esse acúmulo é evidenciado pelo índice de adiposidade elevado dos animais HFD em relação ao grupo controle (Figura 6B).

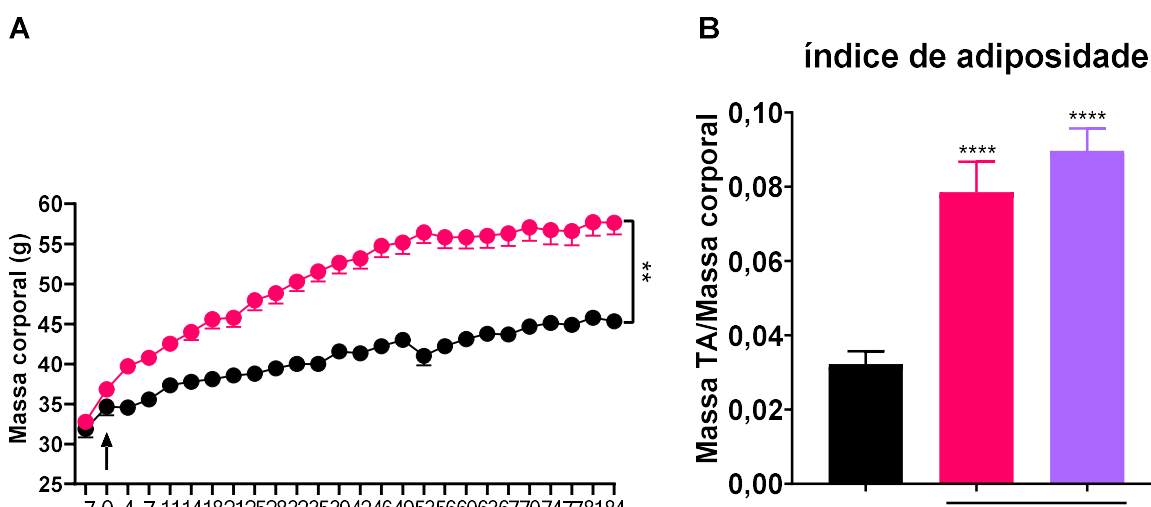


Figura 6 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de 21 dias (A) e índice de adiposidade (B) de camundongos *Swiss* (n=9) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A indução de obesidade do grupo HFD começou após um período de sete dias de aclimação (dia 0, seta). Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Teste t de Student. **p < 0,01 e ****p < 0,0001.

Após os tratamentos de 21 dias, apenas os rins e os fígados do grupo tratado com veículo apresentaram menor massa em relação ao grupo controle. Nenhuma outra alteração foi detectada na massa dos órgãos coletados (Tabela 3).

Tabela 3 – Massa dos órgãos de camundongos *Swiss* (n=9) após 21 dias de tratamento.

(mg)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 300
TA Epididimal	639,7 ± 84,23	1731 ± 185,7 ^d	1473 ± 209,7 ^b
TA Retroperitoneal	205,1 ± 39,21	1324 ± 244,3 ^d	1563 ± 223,0 ^d
TA Abdominal	670,8 ± 61,74	1525 ± 293,4 ^b	2035 ± 152,5 ^d
Fígado	2330 ± 68,79	3101 ± 317,9 ^b	2734 ± 126,6
Coração	256,5 ± 7,903	238,9 ± 17,27	248,7 ± 10,15
Baço	180,0 ± 15,35	172,5 ± 9,297	164,7 ± 10,98
Rins	376,6 ± 9,665	309,0 ± 27,26 ^a	322,9 ± 12,01

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01; c=p<0,001 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). TA: tecido adiposo.

4.2. Mediadores inflamatórios no tecido adiposo

A quantificação de mediadores pró-inflamatórios do TA epididimal dos camundongos revelou que não houve variação estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e MCP-1. Contudo houve um aumento nos níveis de IL-6 do grupo tratado com citral 300 mg/kg quando comparado ao grupo Magros Tween e ao grupo Obesos Tween (Tabela 4).

Tabela 4 – Níveis de mediadores inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos *Swiss* (n=7) após sete dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
TNF- α	0,337 ± 0,092	0,185 ± 0,035	0,162 ± 0,015	0,187 ± 0,026	0,218 ± 0,033
IFN- γ	0,361 ± 0,010	0,383 ± 0,033	0,356 ± 0,007	0,365 ± 0,012	0,374 ± 0,010
IL-1 β	13,23 ± 2,793	9,650 ± 0,807	8,925 ± 0,209	9,237 ± 0,406	10,69 ± 0,890
IL-6	0,849 ± 0,068	0,803 ± 0,092	0,613 ± 0,046	0,689 ± 0,071	2,001 ± 0,304 ^{d,h}
MCP-1	12,75 ± 0,652	14,06 ± 1,008	14,08 ± 0,601	13,69 ± 0,468	15,46 ± 1,915

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. d = p < 0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). h = p < 0,0001 (comparação ao grupo Obesos Tween). TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; IL: interleucina; MCP: proteína quimiotática de monócitos.

Após 14 dias de tratamento pudemos observar a diminuição dos níveis de IFN- γ , IL-6 e IL-1 β nos animais tratados com citral (300 mg/kg) quando comparados ao grupo Magros Tween

(Tabela 5). A diminuição da IL-1 β também ocorreu nos animais Obesos Tween em relação ao mesmo grupo (Tabela 5).

Tabela 5 – Níveis de mediadores inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos *Swiss* (n=7) após 14 dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 300
TNF-α	10,17 $\pm$ 0,253	10,18 $\pm$ 0,552	9,339 $\pm$ 0,2404
IFN-γ	33,63 $\pm$ 0,671	32,16 $\pm$ 0,481	31,04 $\pm$ 0,681 ^a
IL-1β	866,6 $\pm$ 15,38	756,8 $\pm$ 21,30 ^b	718,6 $\pm$ 29,41 ^c
IL-6	128,6 $\pm$ 21,09	80,74 $\pm$ 13,79	52,98 $\pm$ 3,805 ^b
MCP-1	1077 $\pm$ 13,91	1066 $\pm$ 15,24	1098 $\pm$ 16,40

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a = p < 0,05; b = p < 0,01; c = p < 0,001. (comparação ao grupo Magros Controle). TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; IL: interleucina; MCP: proteína quimiotática de monócitos.

A quantificação de mediadores pró-inflamatórios no TA epididimal de animais tratados por 21 dias revelou uma diminuição nos níveis de IL-1 β e um aumento de MCP-1 nos grupos Citral 300 e Obesos Tween em comparação aos Magros Tween (Tabela 6).

Tabela 6 – Níveis de mediadores inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos *Swiss* (n=7) após 21 dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 300
TNF-α	12,37 $\pm$ 0,754	11,10 $\pm$ 0,936	10,66 $\pm$ 0,396
IFN-γ	34,74 $\pm$ 0,465	33,14 $\pm$ 0,858	34,0 $\pm$ 1,413
IL-1β	1068 $\pm$ 38,0	779,2 $\pm$ 42,23 ^b	846,0 $\pm$ 65,66 ^a
IL-6	139,6 $\pm$ 14,91	80,55 $\pm$ 9,247	102,0 $\pm$ 27,71
MCP-1	1034 $\pm$ 10,77	1086 $\pm$ 12,57 ^b	1098 $\pm$ 0 ^b

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a = p < 0,05; b = < 0,01 (comparação ao grupo Magros Tween). TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; IL: interleucina; MCP: proteína quimiotática de monócitos.

4.3. Estresse oxidativo e mediadores inflamatórios hepáticos

Os níveis hepáticos de malondialdeído (MDA), indicador de peroxidação lipídica, em todos os grupos alimentados com HFD estavam baixos em comparação ao grupo Magros Tween (Tabela 7). Os mecanismos antioxidante mostraram uma elevação dos níveis de catalase (CAT) e glutathiona (GSH) em relação ao grupo veículo (Tabela 7). Os níveis de superóxido dismutase

(SOD) do grupo tween estão elevados quando comparados com o grupo Magros Tween e os grupos tratados com citral (25, 100 e 300 mg/kg).

Tabela 7 – Mecanismos antioxidante hepático de camundongos *Swiss* (n=7) após sete dias de tratamento.

	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
MDA (nmol/g de tecido)	0,111 ± 0,005	0,071 ± 0,004 ^d	0,066 ± 0,002 ^d	0,078 ± 0,005 ^d	0,075 ± 0,004 ^d
GSH (nmol/g de tecido)	94,04 ± 10,38	72,51 ± 3,333	74,58 ± 5,479	67,08 ± 4,109	131,3 ± 34,99 ^e
CAT (U/g de tecido)	20,19 ± 2,80	10,42 ± 0,923	12,93 ± 0,948	10,53 ± 1,043	26,34 ± 7,827 ^f
SOD (U/g de tecido)	23,64 ± 1,565	47,86 ± 9,734 ^b	21,22 ± 1,262 ^f	24,43 ± 1,694 ^e	27,0 ± 4,121 ^e

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. b = p < 0,01 e d = p < 0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). e = p < 0,05 e f = p < 0,01 (comparação ao grupo Obesos Tween). MDA: malondialdeído; GSH: glutatona; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase.

Não encontramos nenhuma variação significativa nos níveis de mieloperoxidase (MPO) hepática bem como nas citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Tabela 8).

Tabela 8 – Níveis de mediadores inflamatórios nos fígados de camundongos *Swiss* (n=7) após sete dias de tratamento.

	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
MPO (U/g de tecido)	13,51 ± 0,504	14,23 ± 1,167	12,18 ± 0,824	14,81 ± 1,765	15,53 ± 1,744
TNF-α (pg/g de tecido)	64,40 ± 2,061	61,94 ± 0,933	63,71 ± 1,468	61,79 ± 1,598	62,06 ± 1,861
IL-1β (pg/g de tecido)	528,8 ± 14,01	486,5 ± 12,83	494,5 ± 17,34	524,4 ± 24,82	524,4 ± 18,33
IL-6 (pg/g de tecido)	16893 ± 5324	20677 ± 5087	13570 ± 3840	7386 ± 1644	9869 ± 2026

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via. IL: interleucina.

Nenhum parâmetro hepático quantificado após 14 dias de tratamento apresentou variação significativa (Tabela 9).

Tabela 9 – Mecanismos antioxidante e mediador inflamatório hepático de camundongos *Swiss* (n=7) após 14 dias de tratamento.

	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 300
MDA (nmol/g de tecido)	0,080 ± 0,006	0,076 ± 0,008	0,083 ± 0,011
GSH (nmol/g de tecido)	22,88 ± 3,277	27,67 ± 2,490	28,88 ± 2,358
CAT (U/g de tecido)	15,51 ± 0,630	12,64 ± 0,415	16,56 ± 2,082
SOD (U/g de tecido)	14,16 ± 1,032	13,51 ± 1,079	12,93 ± 1,125
MPO (U/g de tecido)	5,198 ± 0,251	3,922 ± 0,744	3,908 ± 0,476

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via. MDA: malondialdeído; GSH: glutatona; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; MPO: mieloperoxidase.

Ao avaliarmos os parâmetros de estresse oxidativo no fígado dos animais tratados por 21 dias encontramos uma elevação nos níveis de SOD em animais obesos tratados com veículo (tween 80 1%) em relação ao grupo Magros Tween e um aumento no indicador de infiltração leucocitária no grupo Citral 300 quando comparado aos Magros Tween (Tabela 10).

Tabela 10 – Mecanismos antioxidante e indicador inflamatório hepático de camundongos *Swiss* (n=7) após 21 dias de tratamento.

	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 300
MDA (nmol/g de tecido)	0,091 ± 0,009	0,103 ± 0,003	0,100 ± 0,008
GSH (nmol/g de tecido)	17,05 ± 1,086	16,13 ± 1,112	18,65 ± 1,282
CAT (U/g de tecido)	16,49 ± 0,792	16,65 ± 0,373	17,05 ± 0,475
SOD (U/g de tecido)	20,02 ± 0,796	25,04 ± 1,206 ^a	23,71 ± 2,638
MPO (U/g de tecido)	13,06 ± 7,186	88,79 ± 34,43	124,4 ± 33,68 ^a

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a = p < 0,05 (Magros Tween). MDA: malondialdeído; GSH: glutatona; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; MPO: mieloperoxidase.

4.4. Mediadores inflamatórios hipotalâmicos

A quantificação de citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo dos animais também não apresentaram nenhuma variação significativa entre os grupos após sete dias de tratamento (Tabela 11).

Tabela 11 – Níveis de mediadores inflamatórios nos hipotálamos de camundongos *Swiss* (n=7) após sete dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
TNF-α	10,64 $\pm$ 0,181	10,77 $\pm$ 0,290	10,34 $\pm$ 0,294	10,44 $\pm$ 0,140	10,27 $\pm$ 0,171
IL-1β	984,7 $\pm$ 24,83	984,8 $\pm$ 41,31	906,8 $\pm$ 29,0	919,1 $\pm$ 19,15	904,3 $\pm$ 29,32
IL-6	45,69 $\pm$ 1,772	46,82 $\pm$ 2,675	44,61 $\pm$ 0,664	41,76 $\pm$ 0,937	44,48 $\pm$ 1,143

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via. TNF: fator de necrose tumoral. IL: interleucina.

Também não encontramos alterações nos mediadores pró-inflamatórios hipotalâmicos dos animais tratados por 14 dias (Tabela 12) ou 21 dias (Tabela 13).

Tabela 12 – Níveis de mediadores inflamatórios dos hipotálamos de camundongos *Swiss* (n=7) após 14 dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 300
TNF-α	10,29 $\pm$ 0,102	10,16 $\pm$ 0,091	10,20 $\pm$ 0,095
IL-1β	866,8 $\pm$ 17,92	808,4 $\pm$ 38,54	885,2 $\pm$ 28,73
IL-6	47,41 $\pm$ 4,397	41,76 $\pm$ 0,637	44,09 $\pm$ 0,525

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via. TNF: fator de necrose tumoral. IL: interleucina.

Tabela 13 – Níveis de mediadores inflamatórios dos hipotálamos de camundongos *Swiss* (n=7) após 21 dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 300
TNF-α	10,34 $\pm$ 0,187	10,50 $\pm$ 0,095	10,17 $\pm$ 0,180
IL-1β	900,6 $\pm$ 26,43	880,8 $\pm$ 24,77	889,4 $\pm$ 0,0
IL-6	45,83 $\pm$ 0,910	46,22 $\pm$ 1,531	52,89 $\pm$ 6,235

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via. TNF: fator de necrose tumoral. IL: interleucina.

Capítulo 2

Considerações Iniciais

Frente aos resultados obtidos com os camundongos *Swiss*, consideramos duas possibilidades. Aumentar o período de indução de obesidade com a mesma linhagem até o surgimento das alterações necessária para continuarmos o estudo ou utilizar uma linhagem com maior propensão ao desenvolvimento de obesidade. Considerando diversos fatores, decidimos passar a empregar a linhagem C57BL/6J.

Apesar de utilizarmos uma nova linhagem, nossos objetivos continuaram os mesmos: induzir obesidade nos camundongos com dieta hiperlipídica, avaliar o sucesso da indução pelo acúmulo de gordura e alteração na glicemia desses animais e então testarmos a hipótese de que o citral apresentaria seus efeitos anti-inflamatórios nos animais obesos, através da avaliação de parâmetros bioquímicos sistêmicos, de mediadores pró e anti-inflamatórios no tecido adiposo e hipotalâmico, além de investigar o efeito do citral no desbalanço redox hepático decorrente da obesidade.

5. Material e Métodos

5.1. Animais

Camundongos C57BL/6J machos (cinco semanas de idade) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB), UNICAMP-Campinas foram utilizados. Os animais foram mantidos em caixas de fundo sólido forradas com maravalha no biotério de camundongos do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas (setor de Microbiologia e Imunologia) do Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, sob temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlados com acesso à alimentação e água *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais deste projeto foram previamente submetidos, analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, UNESP – Câmpus de Botucatu sob o protocolo nº 1115 (Anexo 2), estando de acordo com a legislação vigente (Lei 11.794/2008 e Decreto 6.899/2009).

5.2. Indução da Obesidade, tratamentos e coleta de material

Os camundongos foram divididos em grupos que receberam diariamente, dieta padrão (DP) como controle (Presença Nutrição Animal, Paulínia, SP) com 15% de calorias de lipídeos ou dieta hiperlipídica (HFD; PragSoluções Biotecnologia, Jaú, SP) com 60% de calorias de lipídeos por 84 dias⁵⁹.

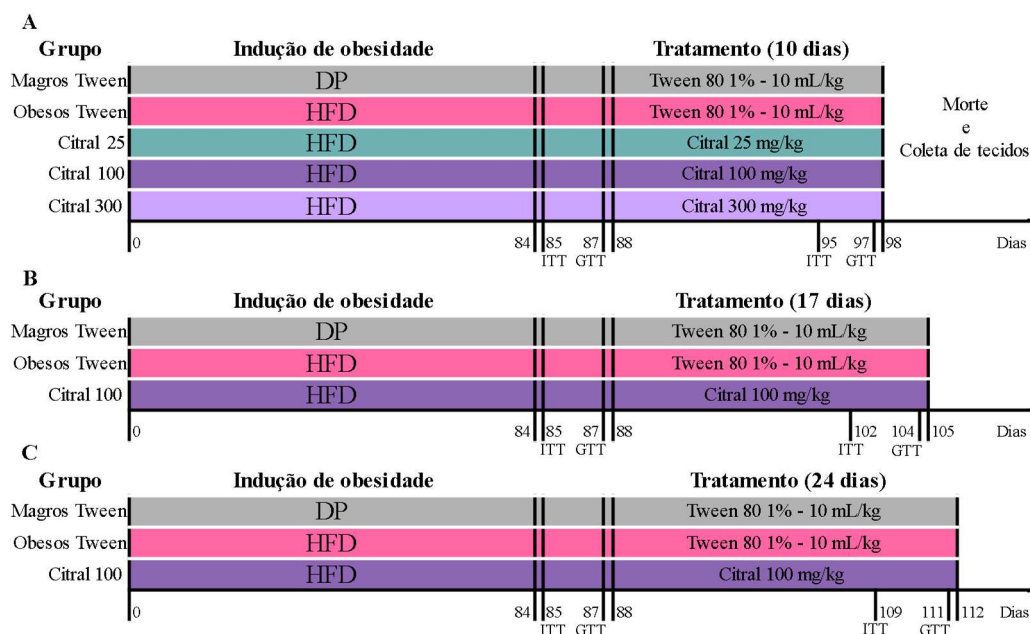


Figura 7 – Linha do tempo dos períodos de indução de obesidade e tratamento curativo dos animais nos diferentes experimentos. A – Tratamento curativo por dez dias; B – Tratamento curativo por 17 dias; C – Tratamento curativo por 24 dias.

Após a indução da obesidade os animais receberam tratamento oral de citral (grau de pureza $\geq 96\%$; Sigma, St.Louis, MO, EUA) 25, 100 ou 300 mg/kg⁶⁰, por dez, 17 ou 24 dias consecutivos para determinação da menor dose efetiva e padronização do período de tratamento (Figura 7).

Para coleta de tecidos os animais foram submetidos a jejum por 6 horas. O sangue foi coletado através rompimento dos vasos sanguíneos cervicais, centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos a 25 °C, o soro foi armazenado a -80 °C até a determinações de colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos, ureia, creatinina gama-glutamil transferase (GGT), aspartato amino-transferase (AST), alanina amino-transferase (ALT) (Bioclin, Belo Horizonte, MG) e adipocinas.

O fígado, hipotálamo e estoques de TA (abdominal, retroperitoneal e epididimal) foram retirados e pesados. As amostras foram armazenadas a -80 °C até sua utilização.

5.3. Testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT)

Os testes foram realizados na parte da tarde após os animais passarem por jejum de seis horas. Para o GTT uma gota de sangue foi coletada da cauda do animal e a glicemia basal foi

mensurada com um monitor de glicemia (Accu-chek Active Roche, Mannheim, Alemanha). Após o estabelecimento da glicemia basal os camundongos receberam solução de glicose (1g/kg) por via oral, em seguida as medidas de glicemia serão repetidas 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção.

No ITT após a determinação da glicemia basal os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina (Novo Nordisk, São Paulo, SP) 0,75 U/kg em seguida as leituras de glicemia foram repetidas 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção de insulina⁶⁶.

5.4. Homogeneização dos tecidos

Amostras de TA foram homogeneizadas em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.4), Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, aprotinina 0,1 mg, 35 mg PMSF/ml, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 4 mM, centrifugados a 15000 RPM a 4 °C por 45 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C até utilização.

5.5. Quantificação de citocinas (Luminex e ELISA)

As citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, MCP-1, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17 com o kit MCYTOMAG-70K-05C (Merck Millipore, MA, EUA), O kit foi utilizado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os resultados são expressos em pg/g de tecido

5.6. Estresse oxidativo e mecanismos antioxidante hepático

5.6.1. Quantificação de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método de Ohkawa *et al.* (1979)⁶¹, medindo-se a reação de substâncias do ácido tiobarbitúrico com amostras de tecido hepático. A reação colorimétrica foi feita em tubos de ensaio onde foram adicionados 400 μ L de água destilada, 200 μ L de lauril 8.1%, 1500 μ L de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% diluído em ácido acético 20% e 400 μ L de amostra. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi medida a 532 nm, e os resultados expressos em nmols de MDA/g de tecido.

5.6.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

As amostras de tecido hepático foram diluídas em tampão fosfato, na proporção 1:20. Em 100 μ L do homogenato foram adicionados 150 μ L da solução de hipoxantina (0,1mM), xantina oxidase (0,07U) e azul de nitrotetrazólio (NBT – 0,6mM). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos como unidade de SOD/g de tecido⁶².

5.6.3. Quantificação de catalase (CAT)

Foram adicionados aos homogenatos de amostras hepáticas uma solução de H_2O_2 (0,01 mol em tampão fosfato salino, PBS, 0,05 mol a pH 7). A determinação da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em unidade de catalase/minuto x g tecido⁶³.

5.6.4. Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)

O conteúdo de glutathiona reduzida foi determinado utilizando-se 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). A reação enzimática foi constituída de 20 µl da amostra, 140 µl de NADPH, 5 µl de PBS e 20 µl DTNB. A absorbância foi determinada em 412 nm utilizando-se um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como nmol/g de tecido⁶⁴.

5.7. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de D'agostino-Pearson para determinação de normalidade. Dados foram submetidos ao teste *t* de Student não pareado para comparação entre dois grupos e ANOVA de uma via, para comparação entre três grupos ou mais, seguida do teste de Dunnett ou Tukey ou ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. O valor mínimo de significância estatística considerado foi de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Evolução de massa corporal, massa dos órgãos e parâmetros bioquímicos

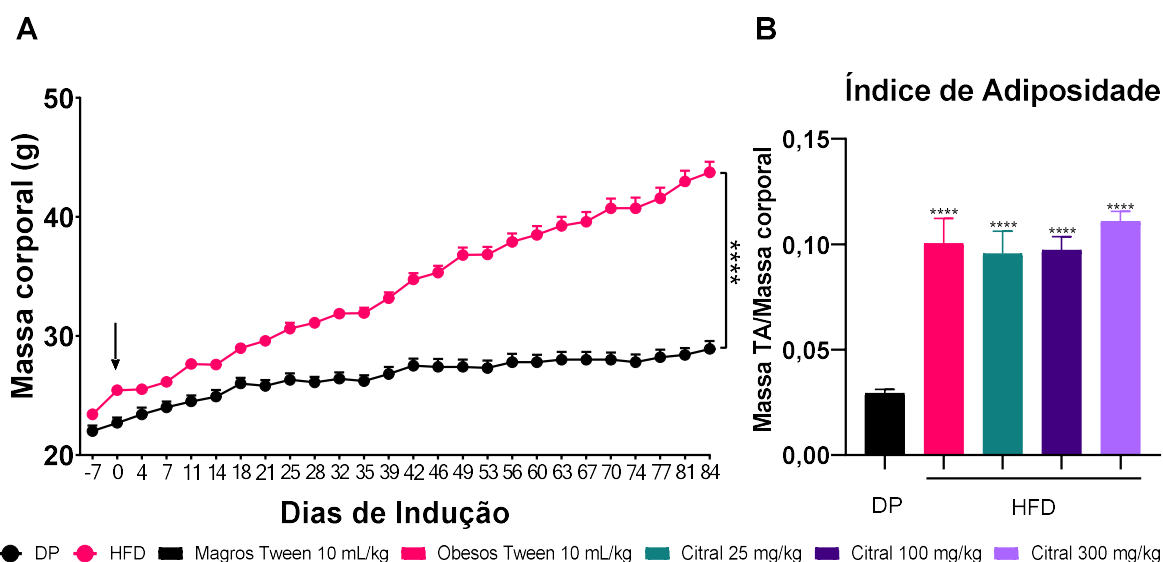


Figura 8 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de dez dias (A) e índice de adiposidade (B) de camundongos C57BL/6J (n=10) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A indução de obesidade do grupo HFD começou após um período de sete dias de aclimação (dia 0, seta). Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. **** $P < 0,0001$.

Os camundongos C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) apresentam uma diferença significativa na massa corporal ao final da indução de obesidade que precedeu os dez

dias tratamento (Figura 8A) bem como um aumento no índice de adiposidade de todos os animais obesos em relação em relação ao grupo Magros Tween (Figura 8B).

O aumento no índice de adiposidade se deu pelo maior acúmulo dos estoques de TA epididimal, retroperitoneal e abdominal de todos os animais alimentados com HFD em relação ao grupo Magros Tween (Tabela 14). Além disso, também houve um aumento na massa dos rins de animais tratados com citral (25, 100 e 300 mg/kg) em relação ao grupo Magros Tween (Tabela 14).

Tabela 14 – Massa dos órgãos de camundongos C57BL/6J (n=10) após dez dias de tratamento

	DP	HFD			
(mg)	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
TA Epi.	339,9 ± 20,35	1745 ± 200,0 ^d	1694 ± 208,2 ^d	1779 ± 151,2 ^d	2031 ± 128,0 ^d
TA Ret.	98,79 ± 15,92	892,9 ± 102,5 ^b	1050 ± 283,1 ^c	855,1 ± 90,33 ^b	1027 ± 122,2 ^c
TA Ab.	377,7 ± 31,79	1598 ± 226,3 ^b	1328 ± 203,2 ^a	1470 ± 203,2 ^b	1779 ± 194,6 ^c
Fígado	1523 ± 71,30	1993 ± 137,2	1702 ± 130,7	1803 ± 122,7	1739 ± 147,1
Coração	149,0 ± 5,632	165,9 ± 8,065	160,8 ± 5,418	172,2 ± 6,657	174,6 ± 21,81
Baço	81,98 ± 7,714	96,91 ± 4,794	90,88 ± 4,763	91,03 ± 3,971	81,40 ± 3,612
Rins	165,7 ± 5,716	193,5 ± 8,489	198,2 ± 6,039 ^a	209,5 ± 8,071 ^c	195,6 ± 7,186 ^a

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01; c=p<0,001 e d=p<0,0001. (comparação ao grupo Magros Tween) TA: tecido adiposo; Epi.: epididimal; Ret.: retroperitoneal; Ab.: abdominal.

Os parâmetros bioquímicos revelaram que não houve diferença nos níveis de colesterol total dos grupos obesos tratados com Citral (dose de 25 e 100 mg/kg) em relação ao grupo Magros Tween. Os níveis de LDL do grupo obeso Citral 25 também não apresentou diferença significativa em relação ao grupo Magros Tween (Tabela 15). Pudemos observar também uma diminuição de ureia e fosfatase alcalina (FA) em todos os animais alimentados com HFD quando comparados ao grupo alimentado com DP (Tabela 15).

Os camundongos C57BL/6J tratados por 17 dias apresentaram diferença significativa na evolução de massa corporal durante o período de indução de obesidade (Figura 9A), isso se refletiu em índices de adiposidade elevados em todos os animais alimentados com HFD em relação aos animais que receberam DP (Figura 9B).

Corroborando o aumento na massa corporal e índice de adiposidade, todos os estoques de TA e fígados dos animais obesos foram significantemente maiores que os dos animais alimentados com DP (Tabela 15). Além disso também observamos um aumento nos baços do grupo Obesos Tween e nos rins do grupo Citral 100 (Tabela 16).

Tabela 15 – Parâmetros bioquímicos de camundongos C57BL/6J (n=7) após dez dias de tratamento.

	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
Colesterol total (mg/dL)	152,5 ± 6,297	244,2 ± 22,09 ^b	195,7 ± 10,76	217,2 ± 16,39	281,0 ± 18,32 ^{d, f}
HDL (mg/dL)	77,17 ± 7,525	84,33 ± 5,493	75,67 ± 3,333	80,83 ± 3,736	93,83 ± 1,662
LDL (mg/dL)	42,83 ± 8,792	137,7 ± 15,92 ^c	94,17 ± 7,328	116,2 ± 12,91 ^b	165,5 ± 19,80 ^{d, f}
Triglicérides (mg/dL)	161,8 ± 14,43	109,7 ± 12,95	130,0 ± 23,89	100,0 ± 12,26	107,7 ± 12,54
Ureia (mg/dL)	50,17 ± 1,815	30,67 ± 2,951 ^d	21,17 ± 2,574 ^{d, e}	28,17 ± 1,424 ^d	25,33 ± 2,140 ^d
Creatinina (mg/dL)	0,482 ± 0,043	0,522 ± 0,059	0,565 ± 0,068	0,417 ± 0,046	0,490 ± 0,038
AST (U/L)	141,7 ± 31,61	125,2 ± 7,525	108,7 ± 7,890	166,3 ± 33,09	145,2 ± 15,58
ALT (U/L)	29,50 ± 1893	61,67 ± 15,60	29,33 ± 4,964	41,33 ± 7,338	48,17 ± 7,648
FA (U/L)	60,0 ± 7,479	39,83 ± 3,978 ^a	28,33 ± 1,585 ^c	30,17 ± 3,301 ^c	34,17 ± 2,774 ^b

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01; c=p<0,001 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). f=p<0,01 (comparação ao grupo Obesos Tween). HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina.

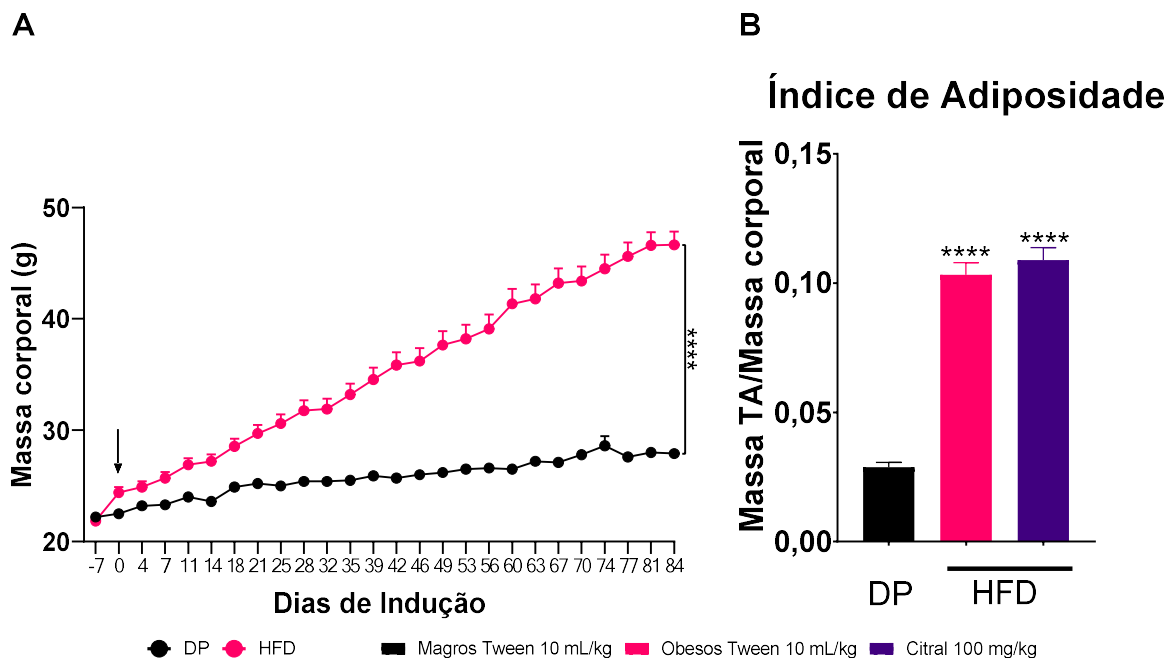


Figura 9 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de 17 dias (A) e índice de adiposidade (B) de camundongos C57BL/6J (n=10) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A indução de obesidade do grupo HFD começou após um período de sete dias de aclimação (dia 0, seta). Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ****p<0,0001.

Tabela 16 – Índice de adiposidade e massa dos órgãos de camundongos C57BL/6J (n=10) após 17 dias de tratamento.

(mg)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
TA Epididimal	312,7 ± 25,40	1702 ± 86,11 ^d	1886 ± 126,4 ^d
TA Retroperitoneal	86,18 ± 11,05	1122 ± 903,3 ^d	1283 ± 108,7 ^d
TA Abdominal	384,1 ± 7,411	1881 ± 225,0 ^d	1815 ± 150,2 ^d
Fígado	1392 ± 30,31	2191 ± 220,6 ^b	2192 ± 168,5 ^b
Coração	133,6 ± 7,051	158,6 ± 8,772	159,7 ± 8,908
Baço	80,47 ± 6,026	111,8 ± 91,06 ^a	103,6 ± 7,212
Rins	160,2 ± 3,526	177,8 ± 7,878	191,5 ± 7,669 ^b

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 100 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). TA: tecido adiposo.

Os níveis de colesterol total, HDL e LDL dos animais alimentados HFD se apresentaram aumentados em relação ao grupo controle, após 17 dias de tratamento (Tabela 17). Em contraste os níveis de triglicérides e ureia desses mesmos grupos diminuiu em relação aos animais alimentados com DP. Além disso os níveis de creatinina e ALT estão elevados nos animais que receberam veículo (tween 80 1%, 10 mL/kg) em relação ao grupo controle (Tabela 17).

Tabela 17 – Parâmetros bioquímicos de camundongos C57BL/6J (n=7) após 17 dias de tratamento.

	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
Colesterol total (mg/dL)	141,3 ± 4,883	295,5 ± 9,705 ^d	321,5 ± 26,96 ^d
HDL (mg/dL)	61,0 ± 6,137	92,33 ± 2,231 ^c	91,83 ± 87,07 ^c
LDL (mg/dL)	46,33 ± 4,295	181,8 ± 9,748 ^d	210,8 ± 26,47 ^d
Triglicérides (mg/dL)	170,0 ± 15,60	106,5 ± 12,59 ^b	100,0 ± 7,271 ^b
Ureia (mg/dL)	52,50 ± 1,565	28,0 ± 1,291 ^d	26,0 ± 1,549 ^d
Creatinina (mg/dL)	0,377 ± 0,029	0,470 ± 0,027 ^a	0,447 ± 0,018
AST (U/L)	131,8 ± 17,01	172,3 ± 19,42	140,8 ± 17,81
ALT (U/L)	30,17 ± 4,023	131,8 ± 27,91 ^b	94,83 ± 18,15
FA (U/L)	48,50 ± 2,446	40,0 ± 6,890	41,17 ± 2,626

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 100 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01; c=p<0,001 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina.

Para avaliarmos o perfil dos animais após o tratamento de 24 dias, realizamos novamente uma avaliação previa dos animais antes do tratamento. Como observado anteriormente, a dieta HFD induziu um ganho de massa corporal significativamente maior nos camundongos C57BL/6J em relação à DP (Figura 10A). Os animais alimentados com a dieta hiperlipídica também apresentaram um índice de adiposidade elevado quando comparados aos animais que receberam dieta padrão (Figura 10B).

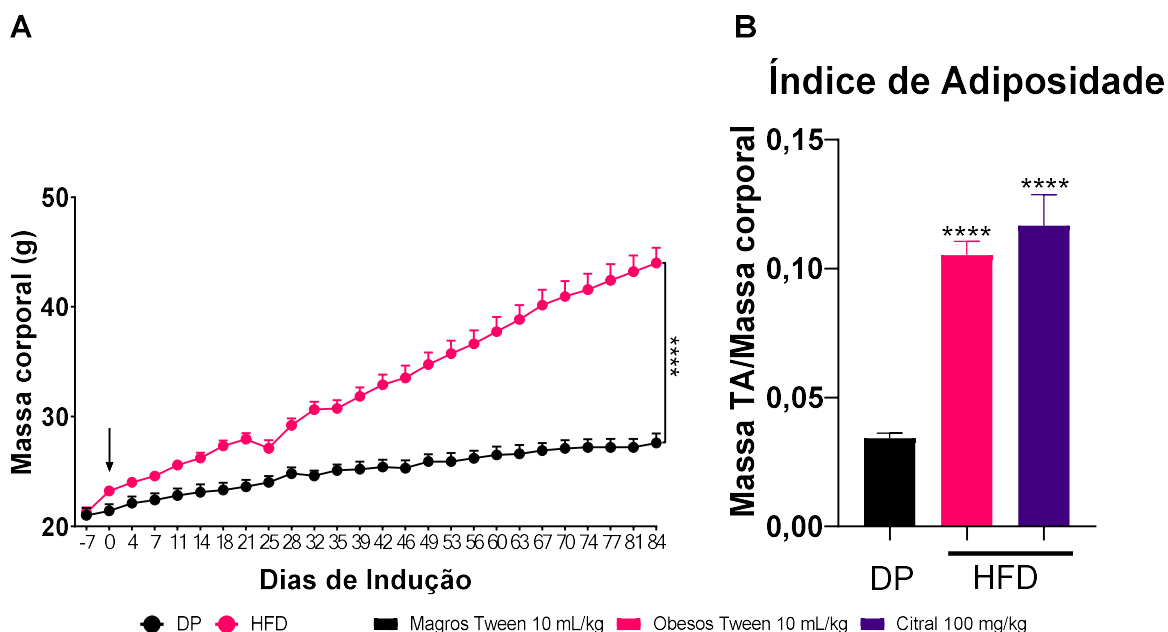


Figura 10 – Evolução da massa corporal anterior ao tratamento de 24 dias (A) e índice de adiposidade (B) de camundongos C57BL/6J (n=9-10) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A indução de obesidade do grupo HFD começou após um período de sete dias de aclimação (dia 0, seta). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. ****P<0,0001.

Tabela 18 – Índice de adiposidade de camundongos C57BL/6J (n=9-10) após 24 dias de tratamento.

	DP	HFD	
(mg)	Controle	Veículo 10 mL/kg	Citral 100
TA Epididimal	370,0 $\pm$ 22,36	2171 $\pm$ 117,2 ^d	1748 $\pm$ 111,1 ^{d, f}
TA Retroperitoneal	139,4 $\pm$ 17,52	972,3 $\pm$ 89,90 ^d	1398 $\pm$ 112,4 ^{d, f}
TA Abdominal	431,4 $\pm$ 31,31	1288 $\pm$ 168,4 ^c	2197 $\pm$ 153,7 ^{d, g}
Fígado	1235 $\pm$ 53,23	1516 $\pm$ 123,7	2273 $\pm$ 193,3 ^{d, f}
Coração	132,9 $\pm$ 4,956	159,6 $\pm$ 8,230 ^a	153,9 $\pm$ 8,380
Baço	61,74 $\pm$ 3,364	90,22 $\pm$ 4,268 ^a	103,9 $\pm$ 10,50 ^c
Rins	161,3 $\pm$ 6,166	185,6 $\pm$ 7,983 ^a	195,2 $\pm$ 5,885 ^b

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 100 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01; c=p<0,001 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). f=p<0,01 e g=p<0,001 (comparação ao grupo Obesos Tween). TA: tecido adiposo; Epi.: epididimal; Ret.: retroperitoneal; Ab.: abdominal.

O TA epididimal, retroperitoneal e abdominal estão significativamente maiores nos animais alimentados com dieta HFD em relação aos animais que receberam DP (Tabela 18). Houve também um aumento do fígado dos animais tratados com citral (100 mg/kg) em relação ao grupo Magros Tween e Obesos Tween e do coração dos animais Obesos Tween em relação ao grupo Magros Tween (Tabela 18). Além disso o baço e rins dos animais obesos também estão mais pesados quando comparados aos animais magros (Tabela 18).

Após 24 dias de tratamento os níveis de colesterol total, HDL e LDL dos animais alimentados HFD aumentaram em relação ao grupo Magros Tween. Em contraste os níveis de triglicérides, assim como ureia diminuíram em relação aos animais alimentados com DP. Os níveis de ALT do grupo Citral 100 estão elevados em relação ao grupo Magros Tween e a FA do grupo Citral 100 está diminuído em relação ao mesmo grupo (Tabela 19).

Tabela 19 – Parâmetros bioquímicos de camundongos C57BL/6J (n=7) após 24 dias de tratamento.

	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
Colesterol total (mg/dL)	125,5 ± 5,097	238,3 ± 16,66 ^d	308,3 ± 9,344 ^{d, f}
HDL (mg/dL)	55,0 ± 1,751	87,83 ± 1,887 ^d	94,0 ± 1,506 ^d
LDL (mg/dL)	45,33 ± 3,221	127,7 ± 17,43 ^c	196,8 ± 9,264 ^{d, f}
Triglicérides (mg/dL)	127,7 ± 13,88	115,2 ± 11,64	85,17 ± 3,250 ^a
Ureia (mg/dL)	61,33 ± 2,906	46,0 ± 1,033 ^b	42,33 ± 3,774 ^c
Creatinina (mg/dL)	0,352 ± 0,028	0,308 ± 0,016	0,310 ± 0,011
AST (U/L)	125,7 ± 11,79	120,3 ± 21,72	122,7 ± 10,94
ALT (U/L)	22,67 ± 2,044	46,33 ± 15,47	81,67 ± 10,61 ^b
FA (U/L)	53,50 ± 1,258	33,0 ± 3,296 ^d	38,83 ± 1,939 ^b

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 100 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01; c=p<0,001 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). f=p<0,01 (comparação ao grupo Obesos Tween). HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina.

6.2. Perfil glicêmico

Além do aumento das reservas adiposas e do colesterol, os animais obesos também apresentaram um perfil glicêmico maior que o grupo Magros Tween no teste de tolerância à glicose (GTT) pré-tratamento (Figura 11A e 11B), após dez dias de tratamento apenas a glicemia do grupo Citral 100 se assemelhou aos níveis do grupo Magros Tween a partir de 60 minutos após a administração de glicose nos animais (Figura 11C).

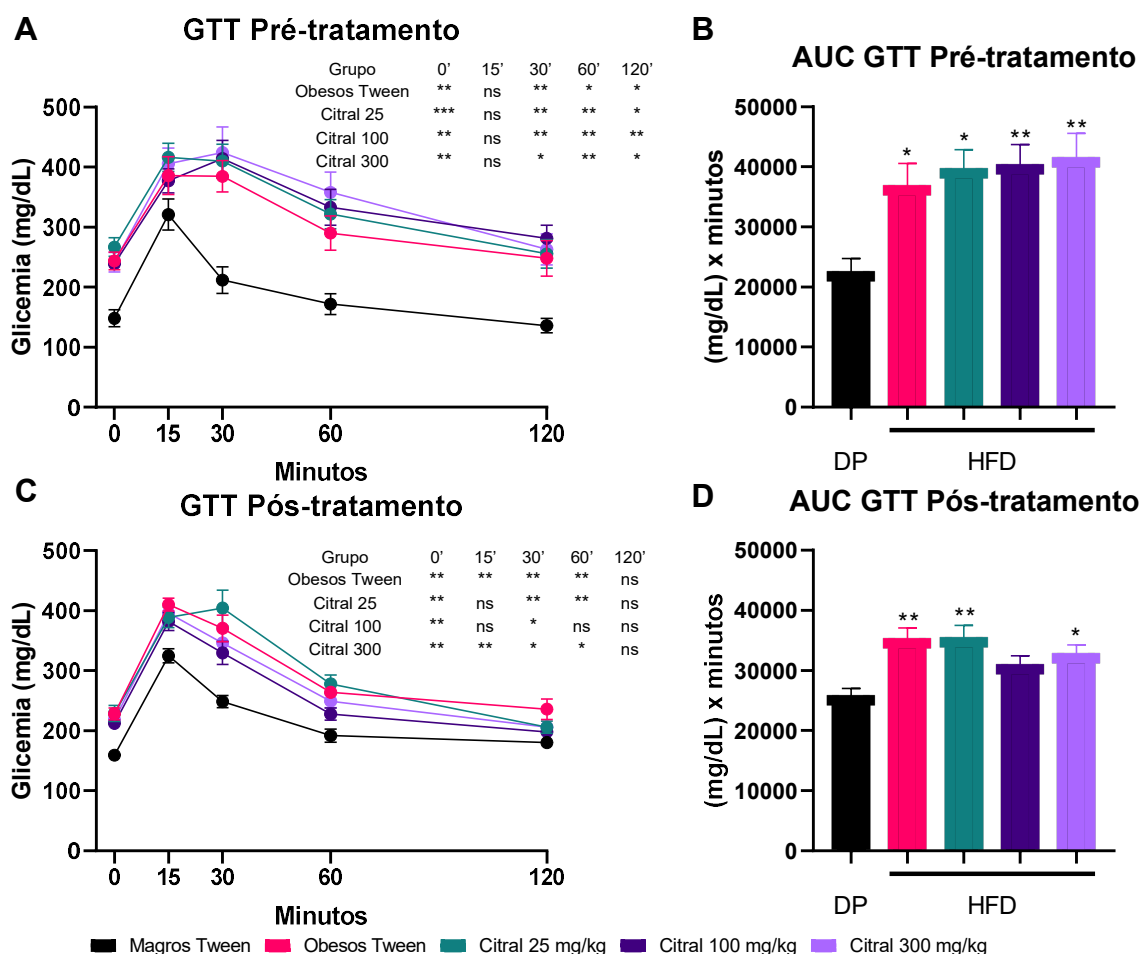


Figura 11 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à glicose (GTT) realizados antes (A) e após tratamento (B) de camundongos C57BL/6J (n=7) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD) tratados por dez dias consecutivos com veículo (Tween 80 1%; 10 mL/kg) e citral (25, 100 e 300 mg/kg). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey e teste t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (comparação ao grupo Magros Tween). ns: diferença não significativa.

As alterações persistiram mesmo com a administração de insulina como mostrado pelo ITT pré-tratamento (Figura 12). Contudo, o grupo tratado com citral na dose de 100 mg/kg foi capaz de diminuir o perfil glicêmico dos animais após dez dias de tratamento.

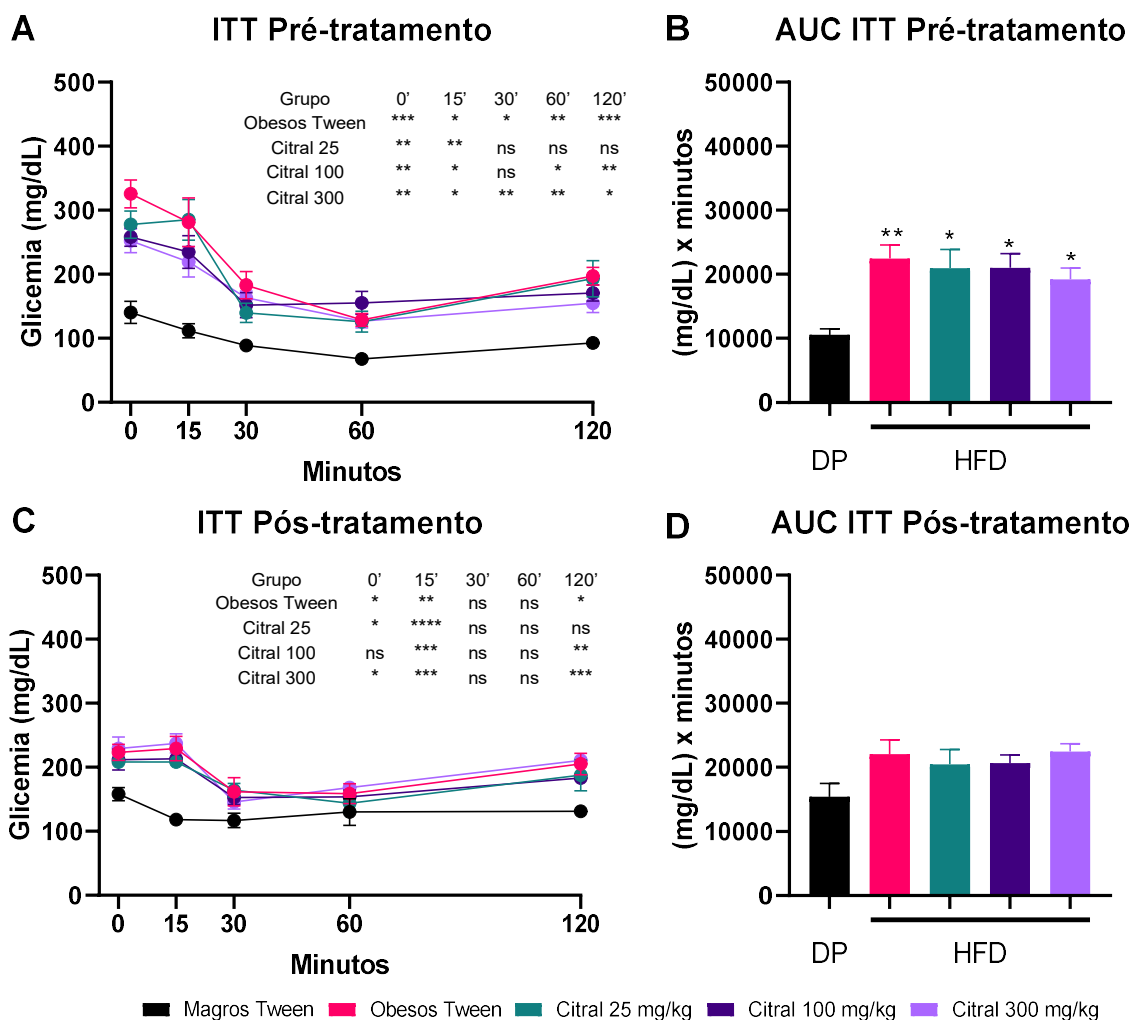


Figura 12 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à insulina (ITT) realizados antes (A) e após tratamento (B) de camundongos C57BL/6J (n=7) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD) tratados por dez dias consecutivos com veículo (Tween 80 1%; 10 mL/kg) e citral (25, 100 e 300 mg/kg). Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey e teste t de Student. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). ns: diferença não significativa.

Antes dos tratamentos, os grupos que receberam HFD apresentaram perfil glicêmico elevado em relação ao grupo alimentado com DP no GGT (Figura 13A e 13B) e ITT (Figura 14B). Entretanto, após os tratamentos Citral 100 mg/kg durante 17 dias consecutivos foi observada uma diminuição no perfil glicêmico no GTT, mas não no ITT.

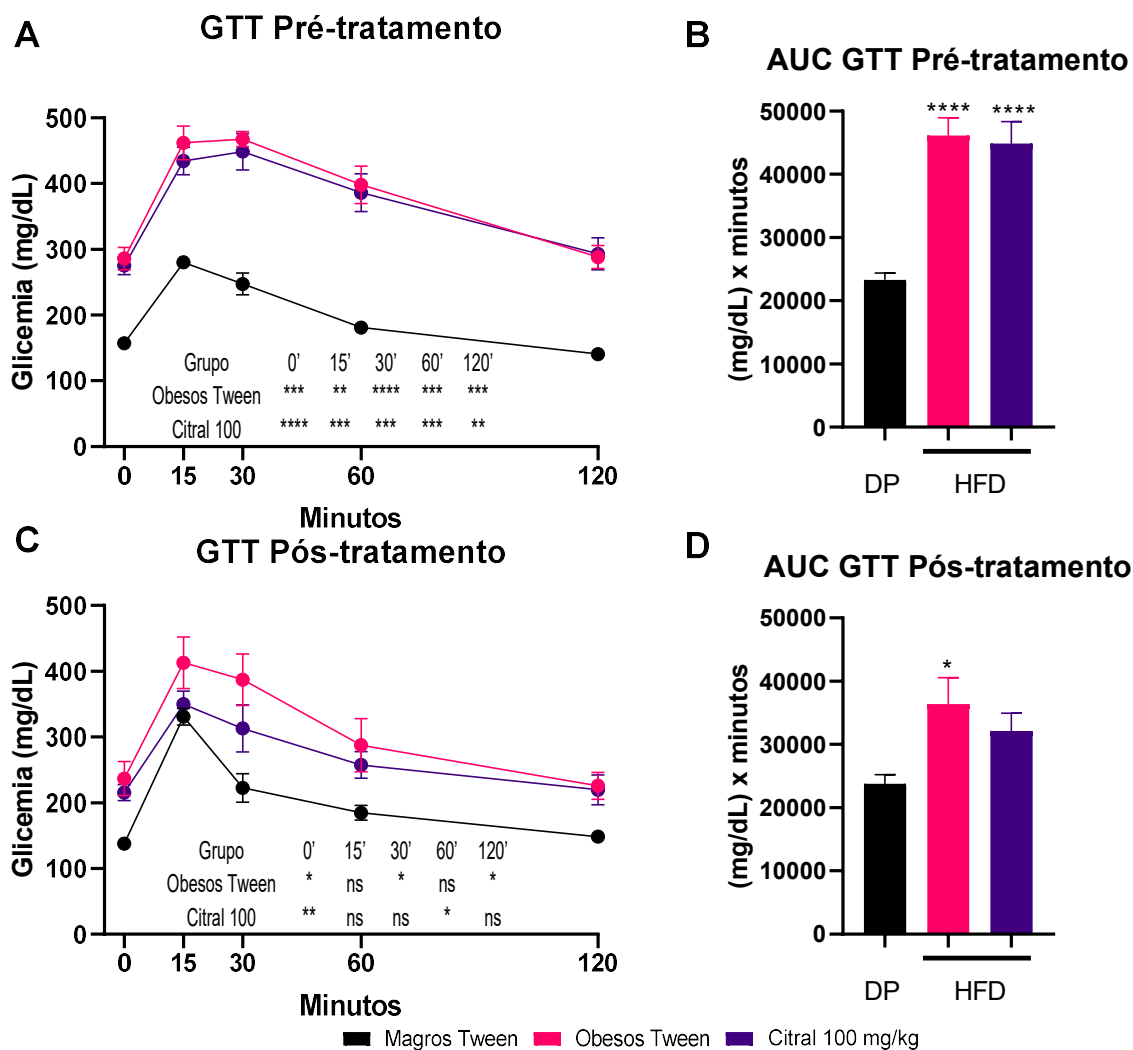


Figura 13 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à glicose (GTT) realizados antes (A) e após tratamento (B) de camundongos C57BL/6J (n=7) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD) tratados por 17 dias consecutivos com veículo (Tween 80 1%; 10 mL/kg) e citral (25, 100 e 300 mg/kg). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey e teste t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ (comparação ao grupo Magros Tween). ns: diferença não significativa.

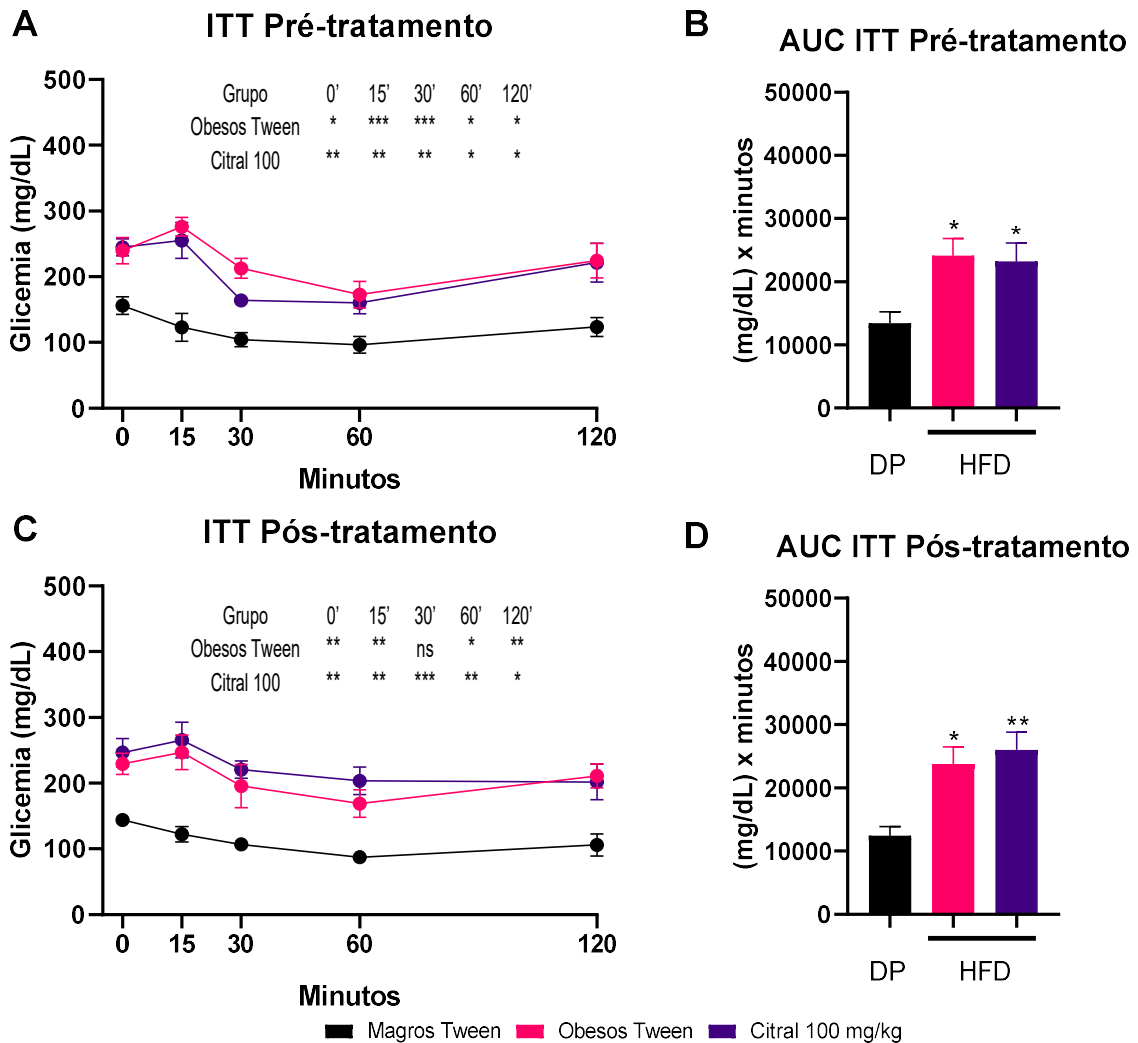


Figura 14 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à insulina (ITT) realizados antes (A) e após tratamento (B) de camundongos C57BL/6J (n=7) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD) tratados por 17 dias consecutivos com veículo (Tween 80 1%; 10 mL/kg) e citral (25, 100 e 300 mg/kg). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey e teste t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (comparação ao grupo Magros Tween). ns: diferença não significativa.

Novamente observamos que os animais obesos apresentaram perfis glicêmicos elevados em relação aos animais magros tanto no GTT (Figura 15 A e 15B) quanto no ITT (Figura 16A e 16B) pré-tratamento. O tratamento com citral (100 mg/kg) por 24 dias consecutivos foi capaz de diminuir a glicemia desses animais (Figura 15A e 15B; Figura 16A e 16B), além disso pudemos observar, também uma diminuição do perfil glicêmico do grupo Obesos Tween (Figura 15A e 15B; Figura 16A e 16B).

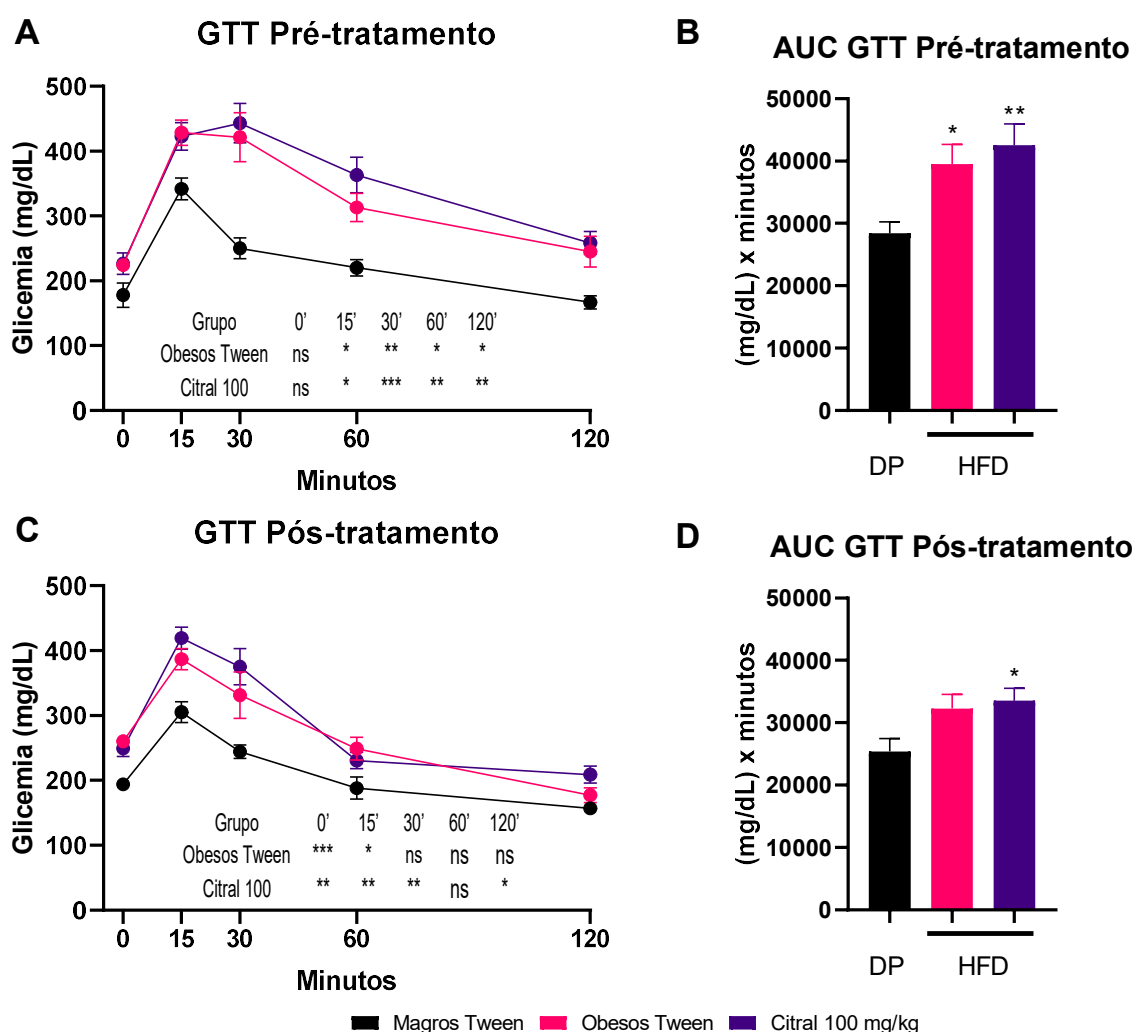


Figura 15 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à glicose (GTT) realizados antes (A) e após tratamento (B) de camundongos C57BL/6J (n=7) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD) tratados por 24 dias consecutivos com veículo (Tween 80 1%; 10 mL/kg) e citral (25, 100 e 300 mg/kg). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey e teste t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (comparação ao grupo Magros Tween). ns: diferença não significativa.

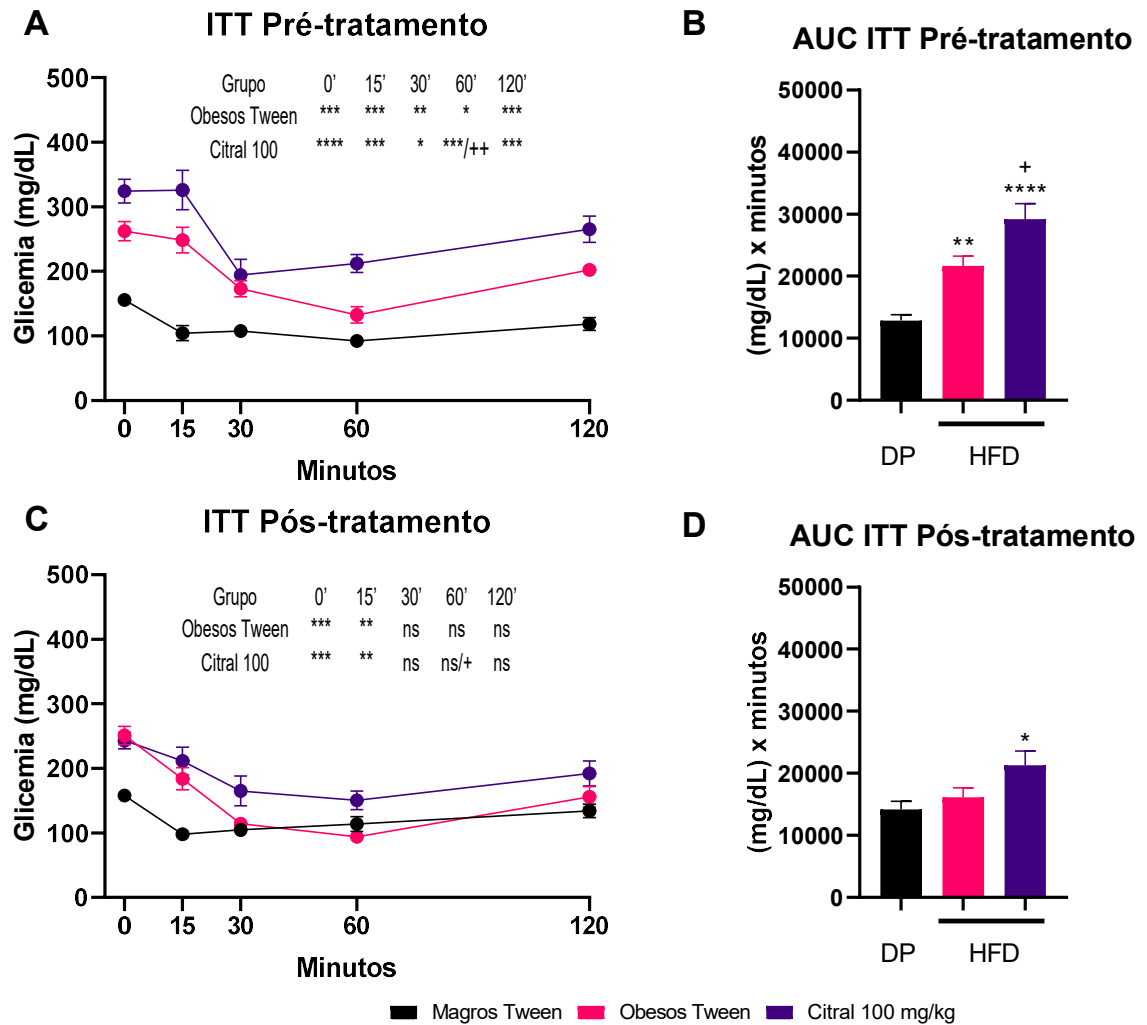


Figura 16 – Curva glicêmica obtida a partir dos testes de tolerância à insulina (ITT) realizados antes (A) e após tratamento (B) de camundongos C57BL/6J (n=7) alimentados com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD) tratados por 24 dias consecutivos com veículo (Tween 80 1%; 10 mL/kg) e citral (25, 100 e 300 mg/kg). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey e teste t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (comparação ao grupo Magros Tween) + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ (comparação ao grupo Obesos Tween). ns: diferença não significativa.

6.3. Mediadores inflamatórios no tecido adiposo

A quantificação de interleucinas no TA epididimal nos mostra um aumento de IFN- γ , no grupo Citral 100 e uma elevação dos níveis de IL-1 β em todos os animais obesos (Tabela 20).

Tabela 20 – Níveis de mediadores pró-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL6J (n=7) após dez dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
TNF-α	218,4 $\pm$ 10,14	246,1 $\pm$ 12,36	262,2 $\pm$ 8,454	246,3 $\pm$ 19,23	263,3 $\pm$ 13,44
IFN-γ	68,69 $\pm$ 9,394	318,2 $\pm$ 68,79	252,9 $\pm$ 56,14	414,0 $\pm$ 90,46 ^b	196,4 $\pm$ 15,30
IL-1β	49,66 $\pm$ 7,327	175,7 $\pm$ 14,19 ^b	130,6 $\pm$ 21,68 ^a	154,4 $\pm$ 19,12 ^b	162,1 $\pm$ 19,43 ^b
IL-6	43,58 $\pm$ 3,486	72,68 $\pm$ 10,75	65,22 $\pm$ 4,211	78,61 $\pm$ 11,78	58,41 $\pm$ 7,701
MCP-1	16,30 $\pm$ 4,579	187,0 $\pm$ 74,79	320,4 $\pm$ 100,3	490,6 $\pm$ 203,8	352,7 $\pm$ 152,7

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; IL: interleucina; MCP: proteína quimiotática de monócitos.

Entretanto todas as doses de citral (25, 100 e 300 mg/kg) foram capazes de elevar os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-5 no tecido adiposo epididimal. Já a IL-17 se apresentou elevada em todos os animais alimentados com HFD (Tabela 21).

Tabela 21 – Níveis de mediadores anti-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL6J (n=7) após dez dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
IL-4	382,2 $\pm$ 55,77	563,5 $\pm$ 55,77	601,9 $\pm$ 32,10 ^a	585,8 $\pm$ 40,94 ^a	662,2 $\pm$ 30,92 ^b
IL-5	145,2 $\pm$ 11,46	179,5 $\pm$ 16,14	206,0 $\pm$ 8,478 ^a	208,9 $\pm$ 16,31 ^a	213,4 $\pm$ 12,38 ^a
IL-10	99,90 $\pm$ 35,11	218,4 $\pm$ 42,14	223,5 $\pm$ 47,34	167,7 $\pm$ 45,58	173,5 $\pm$ 22,02
IL-13	887,3 $\pm$ 196,1	1215 $\pm$ 154,9	1215 $\pm$ 163,9	1236 $\pm$ 276,4	1257 $\pm$ 205,9
IL-17	197,7 $\pm$ 14,24	331,7 $\pm$ 14,19 ^d	285,6 $\pm$ 14,62 ^b	363,7 $\pm$ 16,12 ^d	330,1 $\pm$ 13,38 ^d

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). IL: interleucina.

O tratamento durante 17 dias com citral (100 mg/kg) foi capaz de diminuir os níveis de TNF- α e IL-6 em relação ao grupo Magros Tween, os níveis de IL-1 β do grupo Citral 100 também se igualaram estatisticamente ao grupo Magros Tween, enquanto o grupo Obesos

Tween permaneceu elevado. Porém assim como ocorreu no tratamento de dez dias os níveis de IFN- γ aumentaram nos animais tratados com citral 100 mg/kg (Tabela 22).

Tabela 22 – Níveis de mediadores pró-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J (n=7) após 17 dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
TNF-α	235,4 $\pm$ 10,55	276,4 $\pm$ 23,15	211,1 $\pm$ 13,16 ^e
IFN-γ	229,5 $\pm$ 116,9	554,6 $\pm$ 130,7	815,0 $\pm$ 68,90 ^b
IL-1β	121,9 $\pm$ 33,06	309,3 $\pm$ 71,98 ^a	184,8 $\pm$ 27,70
IL-6	53,82 $\pm$ 5,740	115,7 $\pm$ 16,09 ^c	55,89 $\pm$ 6,483 ^f
MCP-1	53,82 $\pm$ 24,51	219,1 $\pm$ 136,7	470,0 $\pm$ 125,1 ^a

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 100 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01 e c=p<0,001 (comparação ao grupo Magros Tween). e=p<0,05 e f=p<0,01 (comparação ao grupo Obesos Tween). TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; IL: interleucina; MCP: proteína quimiotática de monócitos.

Além disso, o citral foi capaz de elevar as concentrações de IL-4 e IL-17 no TA epididimal dos animais tratados quando comparados aos animais magros (Tabela 23).

Tabela 23 – Níveis de mediadores anti-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J (n=7) após 17 dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
IL-4	502,5 $\pm$ 66,47	656,6 $\pm$ 46,87	710,8 $\pm$ 14,69 ^a
IL-5	165,4 $\pm$ 13,35	204,7 $\pm$ 24,75	210,9 $\pm$ 10,15
IL-10	98,43 $\pm$ 21,93	283,1 $\pm$ 43,67 ^b	174,4 $\pm$ 40,66
IL-13	1289 $\pm$ 158,6	1905 $\pm$ 192,5	1763 $\pm$ 196,0
IL-17	230,3 $\pm$ 37,45	340,1 $\pm$ 44,54	363,2 $\pm$ 20,02 ^a

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 100 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). e=p<0,05 e f=p<0,01 (comparação ao grupo Obesos Tween). IL: interleucina.

Após 24 dias de tratamento, apenas o TNF- α não apresentou aumento no grupo Citral 100 (Tabela 24 e Tabela 25). Já os animais tratados Obesos Tween apresentaram aumento nos níveis de IL-1 β e IL-4 (Tabela 24 e Tabela 25).

Tabela 24 – Níveis de mediadores pró-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J (n=7) após 24 dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
TNF-α	267,3 $\pm$ 9,901	284,1 $\pm$ 5,436	266,8 $\pm$ 18,11
IFN-γ	148,8 $\pm$ 25,29	262,3 $\pm$ 39,19	755,6 $\pm$ 152,0 ^{c, f}
IL-1β	99,93 $\pm$ 23,15	156,1 $\pm$ 25,95 ^a	272,9 $\pm$ 51,24 ^a
IL-6	46,49 $\pm$ 5,829	66,14 $\pm$ 8,429	95,87 $\pm$ 12,43 ^b
MCP-1	3,810 $\pm$ 1,737	3,204 $\pm$ 1,728	207,8 $\pm$ 83,04 ^a

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 100 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01 e c=p<0,001 (comparação ao grupo Magros Tween). f=p<0,01 (comparação ao grupo Obesos Tween). TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; IL: interleucina; MCP: proteína quimiotática de monócitos.

A quantificação de citocinas anti-inflamatórias revelou que o grupo Citral 100 apresentou aumento de todas as citocinas anti-inflamatórias em relação aos animais alimentados com DP e houve uma elevação de IL-10 em relação ao grupo Obesos Tween (Tabela 25).

Tabela 25 – Níveis de mediadores anti-inflamatórios do tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6J após 24 dias de tratamento.

(pg/g de tecido)	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
IL-4	560,7 $\pm$ 49,54	753,6 $\pm$ 11,95 ^b	743,2 $\pm$ 28,67 ^b
IL-5	196,2 $\pm$ 16,88	223,1 $\pm$ 10,52	245,0 $\pm$ 11,04 ^a
IL-10	75,24 $\pm$ 17,10	110,7 $\pm$ 15,25	381,8 $\pm$ 116,6 ^{a, c}
IL-13	1223 $\pm$ 161,1	1560 $\pm$ 131,4	1935 $\pm$ 232,6 ^a
IL-17	266,5 $\pm$ 25,63	298,5 $\pm$ 22,18	372,6 $\pm$ 22,07 ^a

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 100 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05 e b=p<0,01 (comparação ao grupo Magros Tween). c=p<0,05 (comparação ao grupo Obesos Tween). IL: interleucina.

6.4. Mecanismos antioxidante e mediador inflamatório hepático

Ao investigarmos os mecanismos antioxidantes no fígado dos animais após dez dias de tratamentos pudemos observar que apesar de não apresentarem alterações nos níveis de MDA e SOD houve uma diminuição nos níveis de CAT em todos os animais alimentados com HFD. Os níveis de GSH também diminuíram nesses animais com exceção do grupo Citral 300 (Tabela 26). Os animais obesos também têm níveis mais baixos de MPO em comparação ao grupo Magros Tween, com exceção do grupo Citral 100 (Tabela 26).

Tabela 26 – Mecanismos antioxidante e indicador inflamatório hepático de camundongos C57BL/6J (n=7) após dez dias de tratamento.

	DP	HFD			
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 25	Citral 100	Citral 300
MDA (nmol/g de tecido)	0,039 ± 0,005	0,039 ± 0,010	0,042 ± 0,007	0,052 ± 0,008	0,047 ± 0,010
GSH (nmol/g de tecido)	0,137 ± 0,004	0,099 ± 0,008 ^b	0,095 ± 0,010 ^b	0,094 ± 0,006 ^c	0,110 ± 0,007
CAT (U/g de tecido)	1,073 ± 0,109	0,716 ± 0,012 ^c	0,642 ± 0,016 ^d	0,633 ± 0,013 ^d	0,706 ± 0,018 ^d
SOD (U/g de tecido)	8,288 ± 0,853	6,577 ± 0,610	5,486 ± 0,914	5,309 ± 1,252	6,142 ± 0,504
MPO (U/g de tecido)	11,35 ± 0,237	8,581 ± 0,679 ^a	8,267 ± 0,694 ^b	10,04 ± 0,608	8,680 ± 0,577 ^a

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 25, 100 e 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05; b=p<0,01; c=p<0,001 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). MDA: malondialdeído; GSH: glutatona; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase.

Diferente dos animais tratados por dez dias, não observamos nenhuma variação estatisticamente significativa nos parâmetros avaliados no fígado dos grupos tratados por 17 dias (Tabela 27).

Tabela 27 – Mecanismos antioxidante e mediador inflamatório hepático de camundongos C57BL/6J (n=7) após 17 dias de tratamento.

	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
MDA (nmol/g de tecido)	0,080 ± 0,010	0,072 ± 0,006	0,072 ± 0,004
GSH (nmol/g de tecido)	0,136 ± 0,005	0,118 ± 0,006	0,136 ± 0,006
CAT (U/g de tecido)	0,660 ± 0,009	0,637 ± 0,016	0,637 ± 0,021
SOD (U/g de tecido)	11,83 ± 1,053	12,98 ± 0,858	12,37 ± 0,528
MPO (U/g de tecido)	6,026 ± 0,138	6,848 ± 0,337	6,890 ± 0,431

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. MDA: malondialdeído; GSH: glutatona; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; MPO: mieloperoxidase.

Após 24 dias de tratamentos o grupo Obesos Tween apresentou diminuição dos níveis de GSH em relação os animais magros (Tabela 28) e o tratamento com citral (100 mg/kg) diminuiu os níveis de MDA e GSH em relação ao grupo Magros Tween, além de diminuir, também, os níveis de SOD em comparação aos animais alimentados com DP ao grupo Obesos Tween (Tabela 28).

Tabela 28 – Mecanismos antioxidante e mediador inflamatório hepático de camundongos C57BL/6J (n=7) após 24 dias de tratamento.

	DP	HFD	
	Magros Tween	Obesos Tween	Citral 100
MDA (nmol/g de tecido)	0,06861 ± 0,002	0,06219 ± 0,001	0,06175 ± 0,002 ^a
GSH (nmol/g de tecido)	0,175 ± 0,004	0,133 ± 0,005 ^d	0,130 ± 0,006 ^d
CAT (U/g de tecido)	0,602 ± 0,017	0,595 ± 0,021	0,580 ± 0,030
SOD (U/g de tecido)	17,38 ± 1,076	15,06 ± 0,955	9,379 ± 0,478 ^{d,g}
MPO (U/g de tecido)	7,548 ± 0,187	7,409 ± 0,283	8,812 ± 0,763

Os tratamentos (Tween 80 1% a 10 mL/kg ou citral 300 mg/kg) foram realizados após 84 dias de indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD). Animais alimentados com dieta padrão (DP) foram utilizados como controle e receberam veículo (Tween 80 1% a 10 mL/kg) concomitantemente. Os dados estão representados como média ± erro padrão da média. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. a=p<0,05 e d=p<0,0001 (comparação ao grupo Magros Tween). g=p<0,001 (comparação ao grupo Obesos Tween). MDA: malondialdeído; GSH: glutatona; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; MPO: mieloperoxidase.

Capítulo 3

7. Discussão

O camundongo é a espécie mais utilizada para o estudo da obesidade. O uso desse animal inclui vantagens como facilidade de manuseio, pequeno porte, ciclo reprodutivo relativamente curto, vasto conhecimento genético disponível e a disponibilidade de diversas ferramentas e testes direcionados especificamente para camundongos. Entretanto, a pesquisa com esses animais é afetada por um número de fatores responsáveis pela variação do desenvolvimento da obesidade ou suas comorbidades de interesse ⁶⁷.

A obesidade induzida por dieta é uma forma simples e direta de induzir o acúmulo de gordura nos camundongos, os animais são alimentados com uma dieta hipercalórica, normalmente com altos índices de lipídeos, devido à sua maior eficiência em induzir obesidade em comparação à altos índices de carboidratos ou proteínas ⁶⁸. Esse modelo mimetiza bem o desenvolvimento da obesidade humana, pois, ele cria um balanço energético positivo sustentado ao longo de um período extenso gerando um pequeno, porém constante ganho de peso nos indivíduos ⁶⁷.

Nossos resultados mostram que conseguimos induzir a obesidade com sucesso em todos os animais alimentados com a dieta com 60% de lipídeos denominada de HFD, apesar de observarmos variações no perfil de ganho de peso corporal entre os diferentes ensaios realizados com a linhagem *Swiss*. O aumento generalizado do TA em conjunto com o aumento do índice de adiposidade nesses animais confirma a instalação da obesidade nos animais ao final dos 84 dias de indução.

Entretanto, esse trabalho também evidenciou a diferença entre as linhagens de camundongos (*Swiss* e *C57BL/6J*) na resposta a dieta HFD. A primeira diferença entre as linhagens se evidencia com o índice de adiposidade. Os TAs coletados dos camundongos *Swiss* representam, em média, 4,1% da massa corporal dos grupos de animais magros e 6,9% dos animais obesos, enquanto na linhagem *C57BL/6J* essas proporções representam 3,1% e 10,5% da massa corporal dos animais magros e obesos, respectivamente, demonstrando, portanto, a maior adequação da linhagem *C57BL/6J* ao modelo proposto em relação à linhagem *Swiss*.

Além de avaliarmos a massa do TA dos animais, na linhagem *C57BL/6J* foram utilizados os testes de ITT e GTT antes e após realizarmos os tratamentos como forma de monitorar alterações no perfil metabólico dos camundongos, o que nos fez aumentar os períodos dos tratamentos em três dias. Com o ITT e GTT foi possível observar que a indução de obesidade

com a dieta hiperlipídica foi capaz de alterar o perfil glicêmico e o metabolismo de insulina em todos os animais C57BL/J6 alimentados com HFD.

Todos os animais obesos desse estudo apresentaram uma elevação na glicemia basal em jejum e precisaram de um período maior para que seus níveis glicêmicos voltassem ao basal quando comparados aos animais controle. O cálculo de área sob a curva (AUC) confirma uma alteração no metabolismo de glicose e uma possível resistência à insulina dos animais antes do início dos tratamentos. Resultados semelhantes aos encontrados por Lang⁶⁹ e colaboradores, que constataram que uma dieta hiperlipídica com 45% de gordura induziu hiperglicemia em camundongos C57BL/6J ao final de 12 semanas.

As AUCs dos grupos tratados com citral 100 mg/kg por dez, 17 e 24 dias apresentam níveis mais baixos de glicose após os tratamentos, porém não há alterações no perfil glicêmico desses grupos nos ITTs, sugerindo que a diminuição do índice glicêmico não ocorreu por uma melhora na sensibilidade desses animais à insulina. Ikemoto e colaboradores⁷⁰ demonstraram que uma dieta com 60% de banha de porco por 16 semanas foi capaz de alterar o metabolismo de glicose em camundongos C57BL/6J sem afetar seus níveis de insulina, o que poderia explicar altos níveis basais de glicemia, mas com uma diminuição significativa após a injeção de insulina.

Em 2018, Hu e colegas⁷¹ demonstraram que diferentes linhagens de camundongos, incluindo a C57BL/6J regulam a ingestão alimentar de acordo com sua ingestão energética, e dietas com 50-60% de calorias provenientes de lipídios são ingeridas em menor quantidade devido à alta densidade energética. Esse mecanismo pode explicar a diminuição dos níveis de ureia observada nos animais obesos, pois essa situação é comumente observada quando há baixa ingestão proteica⁷². Proporcionalmente, os animais alimentados com HFD ingeriram menos proteínas que os animais alimentados com DP devido à alta concentração de gordura na composição da dieta hiperlipídica, causando uma provável diminuição na ingestão alimentar desses animais em relação aos animais controle.

Deji e colegas (2009)⁷³ demonstraram que o excesso de massa corporal e não apenas a ingestão de uma dieta com alto teor de lipídios está diretamente associado a alterações fisiopatológicas renais. Essas alterações estruturais e funcionais incluem acúmulo de gordura, fibrose e diminuição da capacidade de filtração glomerular, podendo ser uma possível explicação para o aumento da massa dos rins dos animais alimentados com HFD e o aumento de creatinina dos animais do grupo veículo no tratamento de 17 dias.

Durante a obesidade a expansão o TA sofre um comprometimento de suas funções energéticas, associado ao desenvolvimento de resistência à insulina, aumento da circulação de

ácidos graxos livres, e outros fatores resultam no acúmulo de lipídios nos hepatócitos podendo causar esteatose hepática^{74,75}. Caso o quadro de obesidade não seja revertido ou manejado de maneira eficiente, a inflamação de baixo grau instalada pode agravar ainda mais o acúmulo de gordura hepática, a inflamação no tecido hepático, causar fibrose, progredir para um quadro de hepatite e, possivelmente, culminar em cirrose^{37,75}. Contudo, essa progressão é multifatorial, os diferentes fatores atuam em intensidade diferente em cada indivíduo⁷⁴.

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima comumente utilizada como marcador de disfunções hepáticas e seu aumento está relacionado a obstruções hepatobiliares e doenças que acometem os hepatócitos⁷⁶. Entretanto, a FA atua na desativação do lipopolissacarídeo (LPS) convertendo-o em monofosforil lipídio A, um produto sem efeito tóxico para o organismo⁷⁷. Bentala e colegas (2002)⁷⁷ demonstraram que os níveis séricos de FA em camundongos diminuiu após uma injeção endovenosa de LPS. Diversos estudos apontam que indivíduos obesos apresentam maior permeabilidade intestinal, maiores níveis de LPS circulante e que a ingestão de alimentos ricos em lipídios está relacionada ao aumento da absorção intestinal de LPS⁷⁸, então podemos considerar a possibilidade de uma endotoxemia metabólica ser a causa dos baixos níveis de FA apresentados por alguns animais obesos.

Apesar de diversos órgãos apresentarem um estado pró-inflamatório durante a obesidade, quantificamos os mediadores pró-inflamatórios no tecido adiposo, pois ele, normalmente, apresenta uma grande quantidade de células imunes envolvidas na manutenção da homeostase desse tecido⁷⁹. Em animais magros as citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17 atuam na manutenção da homeostase metabólica em um organismo saudável, enquanto os mediadores pró-inflamatórios, que incluem TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e MCP-1 estão relacionados à resistência à insulina, desbalanço do metabolismo lipídico e diversas outras doenças relacionadas ao metabolismo⁶.

Já é bem descrito que indivíduos obesos apresentam maiores níveis de mediadores pró-inflamatórios em relação à indivíduos magros^{16,80–82} porém, não foi possível observar esse efeito nos camundongos da linhagem *Swiss*. Encontramos, na grande maioria uma ausência de variação significativa ou resultados contraditórios nessa linhagem, como níveis elevados de IL-1 β em animais controle (magros) em relação aos animais do grupo Obesos Tween por 14 e 21 dias.

Já nos animais da linhagem C57BL/J6 os resultados obtidos são mais compatíveis com o encontrado na literatura, isto é, nenhum grupo alimentado com DP apresentou citocinas pró-

inflamatórias elevadas em relação aos animais obesos, além disso os animais obesos apresentaram elevação dos mediadores pró-inflamatórios de maneira mais consistente.

Apesar de observarmos o aumento de IL-1 β (citral 25, 100 e 300 mg/kg) e IFN- γ (citral 100 mg/kg) em comparação ao grupo controle após dez dias de tratamento, os níveis de IL-4, IL-5 e IL-17 também estão elevadas nesses grupos. Após 17 dias de tratamento o grupo citral 100 mg/kg apresentou elevação nos níveis de MCP-1, porém os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 diminuíram em relação ao grupo veículo e ao mesmo tempo os níveis de IL-4 e IL-17 aumentaram indicando um possível efeito positivo no combate à inflamação causada pela obesidade. Entretanto, o grupo tratado com citral 100mg/kg por 24 dias apresentou um aumento generalizado das citocinas tanto pró-inflamatórias (com exceção do TNF- α) quanto anti-inflamatórias. O aumento concomitante das interleucinas pró e anti-inflamatórias pode ser explicada por uma maior exposição à um estímulo anti-inflamatório e ao mesmo tempo um estímulo pró-inflamatório. O citral pode estar estimulando uma maior produção de citocinas anti-inflamatórias que também é observado nos períodos mais curtos de tratamento, porém a continuidade do estímulo inflamatório, isto é, o consumo continuado da HFD, provavelmente é responsável por mantêm a produção das citocinas pró-inflamatórias em alta.

Uma, entre as diferentes consequências da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, é a progressão da Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA). O aumento sistêmico de TNF- α , IL-6 e IL-1 β eleva a concentração hepática dessas citocinas, responsáveis por alterações metabólicas cruciais ao desenvolvimento da DHGNA⁸³. Ao contrário do que é encontrado na literatura, nossos resultados demonstraram que não houve aumento de nenhum desses marcadores em nossos animais.

Com a instalação da DHGNA induzida por obesidade, o tecido hepático se torna resistente à insulina, aumentando a produção hepática de glicose resultando em hiperglicemia. A insulina também possui papel no metabolismo dos lipídios, reduzindo a produção de VLDL pelo fígado, mas devido a sua inibição, a produção de VLDL se mantém alta resultando em acúmulo de AGL nos hepatócitos⁸⁴

No processo normal de oxidação de AGL pelas mitocôndrias ocorre a formação de EROs que possuem poder oxidante devido a sua reatividade. Porém, no tecido hepático que apresenta acúmulo excessivo, esse processo é intensificado através de rearranjos cíclicos induzindo o ataque às gorduras poli-insaturadas de membrana do tecido, gerando MDA como produto final⁸⁵.

O estresse oxidativo está relacionado à diversas doenças, em especial àquelas com mecanismos inflamatórios, altos níveis de EROs e o desequilíbrio redox estão diretamente ligados ao desenvolvimento e severidade de doenças como DHGNA^{86,87}. Para a defesa do organismo contra as EROs, as células desenvolveram diferentes sistemas antioxidantes a fim de manter a homeostase celular sendo eles enzimáticos, incluindo CAT e SOD e o GSH⁸⁸.

A SOD atua na conversão de superóxido (O_2) em uma forma menos reativa como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), assim como a CAT que converte H_2O_2 em água e oxigênio molecular. O sistema antioxidante não enzimático, por sua vez, é formado por substâncias como flavonóides da dieta, ácido ascórbico, vitamina E e polifenóis, mas a GSH é um dos mais importantes antioxidantes das células⁸⁹.

A Glutathione é um tripeptídeo encontrado em maior quantidade no fígado de mamíferos. Aparece de forma abundante como tiol reduzida em concentrações milimolares e possui funções como desintoxicação de xenobióticos, eliminam radicais livres pela redução de H_2O_2 , mantem o tiol necessário das proteínas, fornecem reservatório de cisteína e atuam na modulação de processos importantes tais como síntese de DNA e função imune⁸⁹.

Na revisão feita por Ore e Akinlove⁸⁶, constatou-se que os níveis hepáticos de MDA encontram-se elevados em diversos modelos de diferentes animais e métodos de indução de DHGNA, incluindo no fígado de camundongos alimentados com HFD. Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram o oposto, no qual todos os animais *Swiss* alimentados com HFD apresentaram diminuição de MDA em relação ao grupo Magros Tween. Ore e Akinloye (2019) também reportam que em sua grande maioria os níveis hepáticos de CAT, SOD e GSH se encontram diminuídos em diversos modelos experimentais e em situações clínicas⁸⁶, divergindo, novamente, dos nossos resultados obtidos com camundongos.

Uma possível forma de ação do citral é através do receptor X hepático (LXR), pertencente de uma superfamília de fatores de transcrição, suas duas isoformas o LXR α e LXR β tem papel fundamental no metabolismo de carboidratos, lipídeos e na imunidade B⁹⁰. Os LXR regulam diversos passos no transporte reverso do colesterol, incluindo a transcrição do transportador ABCA1 e da apolipoproteína E (ApoE), que atuam no transporte de HDL proveniente de tecidos periféricos para o fígado⁹⁰.

Ativação sistêmica dos LXR é capaz de aumentar as quantidades plasmáticas de HDL ao estimular o efluxo lipídico de macrófagos⁹¹, além disso, a ativação prolongada desses receptores diminui os níveis de triglicérides plasmáticos e aumenta seu acúmulo hepático⁹¹.

Recentemente Pierantonelli e colaboradores (2020)⁹² demonstraram que a ativação do receptor X hepático (LXR) α por HDL tem papel protetor no fígado.

Outra ação importante dos LXR é a modulação fenotípica que eles exercem sobre células imunes, e mais especificamente sobre os macrófagos. A ativação dos LXR expressos nessas células imune pode fazer com que elas passem a produzir mediadores anti-inflamatório, como a IL-10, induzindo a expressão do fenótipo tipo 2^{93,94}.

A simples exposição à uma dieta hipercalórica nem sempre é o suficiente para o desenvolvimento dos parâmetros desejados pelo pesquisador, essa variação na resposta ao estímulo obesogênico se deve às diferenças genótípicas intraespecífica dos roedores⁹⁵. Os modelos monogênicos, que utilizam animais *knock-out* por exemplo, não representam bem o que ocorre em humanos e por isso são reservados para estudos de mecanismos mais específicos, enquanto modelos poligênicos, com as linhagens C57BL/6, C3H/HeJ, *Swiss* (SWR/J) e *Swiss-Webster* (A/J) são amplamente empregados, porém cada linhagem responde de maneira diferente à mesma indução^{96,97}.

Inicialmente nós escolhemos a linhagem *Swiss*, pois ela não apresenta uma propensão à obesidade, em uma tentativa de aproximar nossos estudos à etiologia da obesidade humana, contudo nossos resultados mostram que essa linhagem não apresentou uma resposta adequada aos nossos objetivos, evidenciado pela diferença na evolução de massa corporal durante a indução de obesidade para os diferentes períodos de tratamento, bem como a resposta de mediadores pró-inflamatórios.

Com os resultados obtidos nos experimentos realizados com a linhagem *Swiss* nos deparamos com duas possíveis linhas de ação, aumentar o período de indução de obesidade ou utilizar outra linhagem mais propensa a desenvolver as alterações necessárias para o estudo. Levando em consideração o tempo disponível optamos pela troca de linhagem, passando a empregar camundongos C57BL/6J em nossos experimentos. Nós realizamos algumas modificações nos protocolos, incluindo testes de tolerância à glicose, à insulina e consideramos o tempo necessário para a realização dos testes e adequamos os períodos de tratamento acrescentando três dias em cada experimento.

Nossos resultados macroscópicos/morfométricos com a linhagem C57BL/6J corroboram os dados encontrados na literatura, porém os dados relacionados à fisiopatologia da obesidade e DHGNA não estão em consonância com o encontrado em maior parte dos estudos ou simplesmente apresentam dados à primeira vista conflitantes entre si.

Uma investigação mais aprofundada das vias inflamatórias envolvidas está em andamento e é necessária para tentar entendermos melhor os resultados que temos à mão. O estudo também revelou um possível alvo a ser investigado que não havia sido considerado inicialmente. As vias metabólicas implicadas neste projeto são muito complexas e interconectadas, normalmente em mais de um componente, além disso os LXR estão envolvidos em muitas vias metabólicas com diversos efeitos, porém, considerando seus papéis no metabolismo é razoável considerá-los como peças importantes na mediação do efeito do citral.

8. Conclusões

Considerando nossos resultados fica evidente que, nessas condições, a exposição da linhagem *Swiss* à dieta hiperlipídica não foi suficiente para as alterações metabólicas necessárias para que nossos objetivos iniciais fossem alcançados.

A dieta hiperlipídica utilizada foi capaz de induzir obesidade no período de 84 dias aumentando a massa corporal, índice de adiposidade, glicemia e perfil lipídico dos animais alimentados com HFD. O citral foi capaz de diminuir a glicemia sem alterar a sensibilidade à insulina dos animais tratados por dez e 17 dias, observou-se também a diminuição de mediadores pró-inflamatórios e um aumento nas citocinas anti-inflamatórias nos animais obesos tratados com citral, indicando um efeito positivo contra a inflamação metabólica.

9. Referências

1. WHO, W. H. O. Obesity and overweight. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (2018).
2. IBGE, I. B. de G. e E. Pesquisa nacional de saúde 2019: Atenção primária à saúde e informações antropométricas. (IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento, 2020).
3. Rohde, K. *et al.* Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental* **92**, 37–50 (2019).
4. Lakerveld, J. & Mackenbach, J. The Upstream Determinants of Adult Obesity. *Obesity Facts* **10**, 216–222 (2017).
5. Dai, H. *et al.* The global burden of disease attributable to high body mass index in 195 countries and territories, 1990–2017: An analysis of the Global Burden of Disease Study. *PLoS Medicine* vol. 17 (2020).
6. Reilly, S. M. & Saltiel, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology* **13**, 633–643 (2017).
7. Kawai, T., Autieri, M. v. & Scalia, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **320**, C375–C391 (2021).
8. Ogston, D. & McAndrew, G. M. M. FIBRINOLYSIS IN OBESITY. *The Lancet* **284**, 1205–1207 (1964).
9. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).
10. Vaisse, C. *et al.* Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics* **14**, 95–97 (1996).
11. Loffreda, S. *et al.* Leptin regulates proinflammatory immune responses. *The FASEB Journal* **12**, 57–65 (1998).
12. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I. & Kim, J. B. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology* **7**, 1–16 (2016).
13. Rocha, V. Z. & Folco, E. J. Inflammatory Concepts of Obesity. *International Journal of Inflammation* **2011**, 1–14 (2011).
14. Reilly, S. M. & Saltiel, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology* **13**, 633–643 (2017).

15. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**, 1023–1033 (2007).
16. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology* **29**, 415–445 (2011).
17. Wensveen, F. M., Valentić, S., Šestan, M., Turk Wensveen, T. & Polić, B. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. *European Journal of Immunology* **45**, 2446–2456 (2015).
18. Talukdar, S. *et al.* Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nature Medicine* **18**, 1407–1412 (2012).
19. Tam, C. S. *et al.* Short-Term Overfeeding May Induce Peripheral Insulin Resistance Without Altering Subcutaneous Adipose Tissue Macrophages in Humans. *Diabetes* **59**, 2164–2170 (2010).
20. Jeffery, E., Church, C. D., Holtrup, B., Colman, L. & Rodeheffer, M. S. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nature Cell Biology* **17**, 376–385 (2015).
21. Amano, S. U. *et al.* Local Proliferation of Macrophages Contributes to Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metabolism* **19**, 162–171 (2014).
22. Kanda, H. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* **116**, 1494–1505 (2006).
23. Cildir, G., Akıncılar, S. C. & Tergaonkar, V. Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage. *Trends in Molecular Medicine* **19**, 487–500 (2013).
24. Molofsky, A. B. *et al.* Interleukin-33 and Interferon- γ Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* **43**, 161–74 (2015).
25. Solinas, G. & Karin, M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *The FASEB Journal* **24**, 2596–2611 (2010).
26. Nandipati, K. C., Subramanian, S. & Agrawal, D. K. Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Molecular and Cellular Biochemistry* **426**, 27–45 (2017).
27. Karpe, F., Dickmann, J. R. & Frayn, K. N. Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes* **60**, 2441–2449 (2011).

28. Nguyen, M. T. A. *et al.* A Subpopulation of Macrophages Infiltrates Hypertrophic Adipose Tissue and Is Activated by Free Fatty Acids via Toll-like Receptors 2 and 4 and JNK-dependent Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 35279–35292 (2007).
29. Pal, D. *et al.* Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nature Medicine* **18**, 1279–1285 (2012).
30. Adams, J. M. *et al.* Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* **53**, 25–31 (2004).
31. Jayashree, B. *et al.* Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **388**, 203–210 (2014).
32. Saad, M. J. A., Santos, A. & Prada, P. O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology* **31**, 283–293 (2016).
33. Lee, M. K. S. S., Yvan-Charvet, L., Masters, S. L. & Murphy, A. J. The modern interleukin-1 superfamily: Divergent roles in obesity. *Seminars in Immunology* **28**, 441–449 (2016).
34. Kotas, M. E. & Medzhitov, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell* **160**, 816–827 (2015).
35. Brestoff, J. R. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature* **519**, 242–246 (2015).
36. Lee, M.-W. W. *et al.* Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* **160**, 74–87 (2015).
37. Samala, N., Tersey, S. A., Chalasani, N., Anderson, R. M. & Mirmira, R. G. Molecular mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease: Potential role for 12-lipoxygenase. *Journal of Diabetes and its Complications* **31**, 1630–1637 (2017).
38. Marra, F. & Svegliati-Baroni, G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis. *Journal of Hepatology* **68**, 280–295 (2018).
39. Kitade, H., Chen, G., Ni, Y. & Ota, T. Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: New insights and potential new treatments. *NutR.nts* **9**, 1–13 (2017).
40. Serviddio, G., Bellanti, F. & Vendemiale, G. Free radical biology for medicine: Learning from nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine* **65**, 952–968 (2013).

41. Burska, A. N., Sakthiswary, R. & Sattar, N. Effects of Tumour Necrosis Factor Antagonists on Insulin Sensitivity/Resistance in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* **10**, e0128889 (2015).
42. Chen, H.-H. *et al.* Association between use of disease-modifying antirheumatic drugs and diabetes in patients with ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, or psoriasis/psoriatic arthritis: a nationwide, population-based cohort study of 84,989 patients. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **Volume 13**, 583–592 (2017).
43. Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M. & Taylor, R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* **45**, 881–885 (1996).
44. Solomon, D. H. Association Between Disease-Modifying Antirheumatic Drugs and Diabetes Risk in Patients With Rheumatoid Arthritis and Psoriasis. *Jama* **305**, 2525 (2011).
45. Sloan-Lancaster, J. *et al.* Double-Blind, Randomized Study Evaluating the Glycemic and Anti-inflammatory Effects of Subcutaneous LY2189102, a Neutralizing IL-1 Antibody, in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **36**, 2239–2246 (2013).
46. Hawley, S. A. *et al.* Europe PMC Funders Group The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science* **336**, 918–922 (2012).
47. Goldfine, A. B. *et al.* The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Annals of internal medicine* **152**, 346–57 (2010).
48. Goldfine, A. B. *et al.* A randomised trial of salsalate for insulin resistance and cardiovascular risk factors in persons with abnormal glucose tolerance. *Diabetologia* **56**, 714–723 (2013).
49. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine* **27**, 1–93 (2006).
50. Rishton, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. *American Journal of Cardiology* **101**, (2008).
51. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **79**, 629–661 (2016).
52. Koziol, A. *et al.* An Overview of the Pharmacological Properties and Potential Applications of Natural Monoterpenes. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **14**, 1156–1168 (2015).

53. Lee, H. J. *et al.* Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF- κ B activation in RAW264.7 cells. *Archives of Pharmacal Research* **31**, 342–349 (2008).
54. Katsukawa, M. *et al.* Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1801**, 1214–1220 (2010).
55. Bachiega, T. F. & Sforcin, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* **137**, 909–913 (2011).
56. Costa, C. A. R. A. *et al.* Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 2268–2272 (2011).
57. Modak, T. & Mukhopadhaya, A. Effects of citral, a naturally occurring antiadipogenic molecule, on an energy-intense diet model of obesity. *Indian Journal of Pharmacology* **43**, 300 (2011).
58. Mishra, C. *et al.* Effects of citral on oxidative stress and hepatic key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin / high-fat-diet induced diabetic dyslipidemic rats. (2018) doi:10.22038/ijbms.2018.26889.6574.
59. de Fraia Pinto, L. *et al.* The immunosuppressant drug, thalidomide, improves hepatic alterations induced by a high-fat diet in mice. *Liver International* **30**, 603–610 (2010).
60. Nishijima, C. M. *et al.* Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. *European Journal of Pharmacology* **736**, 16–25 (2014).
61. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **95**, 351–358 (1979).
62. Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M. & Carrell, R. W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **85**, 337–41 (1975).
63. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* **105**, 121–6 (1984).
64. Anderson, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in enzymology* **113**, 548–55 (1985).
65. Emílio-Silva, M. T. *et al.* Hypothermic effect of acute citral treatment during lps-induced systemic inflammation in obese mice: reduction of serum tnf- α and leptin levels. *Biomolecules* **10**, (2020).

66. Wang, C.-Y. & Liao, J. K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **821**, 421–33 (2012).
67. Kleinert, M. *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* **14**, 140–162 (2018).
68. Hariri, N. & Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews* **23**, 270–299 (2010).
69. Lang, P., Hasselwander, S., Li, H. & Xia, N. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Scientific Reports* **9**, 19556 (2019).
70. Ikemoto, S. *et al.* High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: Differential effects of dietary oils. *Metabolism* **45**, 1539–1546 (1996).
71. Hu, S. *et al.* Dietary Fat, but Not Protein or Carbohydrate, Regulates Energy Intake and Causes Adiposity in Mice. *Cell Metabolism* **28**, 415–431.e4 (2018).
72. Lamb, E. J. & Jones, G. R. D. Kidney Function Tests. in *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (eds. Rifai, N., Horvath, A. R. & Wittwer, C. T.) 479–517 (Elsevier, 2018).
73. Deji, N. *et al.* Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **296**, 118–126 (2009).
74. Benedict, M. & Zhang, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World Journal of Hepatology* **9**, 715 (2017).
75. Polyzos, S. A., Kountouras, J. & Mantzoros, C. S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism: Clinical and Experimental* **92**, 82–97 (2019).
76. Poupon, R. Liver alkaline phosphatase: A missing link between cholestasis and biliary inflammation. *Hepatology* **61**, 2080–2090 (2015).
77. Bentala, H. *et al.* Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. *Shock* **18**, 561–566 (2002).
78. Chakaroun, R. M., Massier, L. & Kovacs, P. Bacteria in Metabolic Disease: Perpetrators or Bystanders? *Nutrients* (2020).
79. Saltiel, A. R. & Olefsky, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation* **127**, 1–4 (2017).

80. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. & Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **95**, 2409–2415 (1995).
81. Shoelson, S. E. *et al.* Inflammation and insulin resistance Find the latest version : Review seR.s Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* **116**, 1793–1801 (2006).
82. Berg, A. H. & Scherer, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research* **96**, 939–949 (2005).
83. Niederreiter, L. & Tilg, H. Cytokines and fatty liver diseases. *Liver Research* **2**, 14–20 (2018).
84. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell Metabolism* **27**, 22–41 (2018).
85. Arroyave-Ospina, J. C., Wu, Z., Geng, Y. & Moshage, H. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Implications for Prevention and Therapy. *Antioxidants* **10**, 174 (2021).
86. Ore, A. & Akinloye, O. A. Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in Clinical and Experimental Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Medicina* **55**, 26 (2019).
87. Bellanti, F., Villani, R., Facciorusso, A., Vendemiale, G. & Serviddio, G. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine* **111**, 173–185 (2017).
88. Delli Bovi, A. P. *et al.* Oxidative Stress in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. An Updated Mini Review. *Frontiers in Medicine* **8**, 595371 (2021).
89. Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J. & Li, H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine* **152**, 116–141 (2020).
90. Bilotta, M. T., Petillo, S., Santoni, A. & Cipitelli, M. Liver X Receptors: Regulators of Cholesterol Metabolism, Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
91. Korach-André, M. & Gustafsson, J. Å. Liver X receptors as regulators of metabolism. *Biomolecular Concepts* vol. 6 177–190 (2015).
92. Pierantonelli, I. *et al.* HDL cholesterol protects from liver injury in mice with intestinal specific LXRA activation. *Liver International* **40**, 3127–3139 (2020).
93. Bilotta, M. T., Petillo, S., Santoni, A. & Cipitelli, M. Liver X Receptors: Regulators of Cholesterol Metabolism, Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Frontiers in Immunology* **11**, 2867 (2020).

94. Schulman, I. G. Liver X receptors link lipid metabolism and inflammation. *FEBS Letters* **591**, 2978–2991 (2017).
95. West, D. B., Boozer, C. N., Moody, D. L. & Atkinson, R. L. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *The American journal of physiology* **262**, R1025-32 (1992).
96. Surwit, R. S. *et al.* Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* **44**, 645–651 (1995).
97. Leibowitz, S. F. *et al.* Phenotypic profile of SWR/J and A/J mice compared to control strains: Possible mechanisms underlying resistance to obesity on a high-fat diet. *Brain Research* **1047**, 137–147 (2005).

Anexo 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



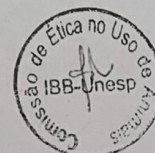
Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Obesidade induzida por dieta hipercalórica: avaliação do efeito do citral na inflamação metabólica", Protocolo nº 1115-CEUA, sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	() Ensino	(x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 25/3/2018	Término: 01/03/2022
Espécie/linhagem:	Camundongo Swiss	
Nº de animais:	140	
Peso:	30g	Idade: 4-6 semanas
Sexo:	Macho	
Origem	Centro de Pesquisa e Produção de Animais – CPPA – Botucatu/SP	

Botucatu, 21 de setembro de 2018.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Coordenador da CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Instituto de Biociências da Unesp - Câmpus de Botucatu
Rua Prof. Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250 - Distrito de Rubião Júnior - CEP 18618-689 Botucatu/SP
Tel 14 3880 0851 mail: secda@ibb.unesp.br