

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/07/2025.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**



**Avaliação do Tratamento Preventivo
com o Citral sobre o Eixo Tecido
Adiposo-Hipotálamo em Camundongos
Obesos Induzidos por Dieta
Hiperlipídica**

Discente: Priscila Romano Raimundo

Orientadora: Prof^a Tit. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Co-orientadora: Prof^a Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração:
Biomoléculas, Estrutura e Função.

Priscila Romano Raimundo

**Avaliação do Citral no Eixo Tecido
Adiposo-Hipotálamo em
Camundongos Obesos Induzidos por
Dieta Hiperlipídica**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Mestra no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração:
Biomoléculas, Estrutura e Função.

Botucatu

2023

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

Raimundo, Priscila Romano.

Avaliação do citral no eixo tecido adiposo-hipotálamo em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica / Priscila Romano Raimundo. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

Capes: 21006008

1. Citral. 2. Obesidade. 3. Hipotálamo - Inflamação.
4. Tecido adiposo. 5. Dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: Citral; Inflamação hipotalâmica;
Obesidade; Tecido adiposo; Tecido hipotalâmico.

Agradecimentos

Durante esses dois anos do curso de mestrado, percorri caminhos que só consegui prosseguir com ajuda de pessoas muito especiais. Em meio a tantos desafios, eu fui lembrada em muitos momentos que não estava sozinha. Eu tinha e tenho uma família extraordinária no laboratório em que pude fazer parte desde minha iniciação científica. Não tenho palavras para agradecer por tudo que cada um fez por mim, dentre conversas, risadas e, principalmente, muito amor. Meus amigos de laboratório: Garboso, Felipinho, Felipe, Maycon, Gabriela, Riê e Renata, muito obrigada por tornarem meus dias mais leves, meus anos mais alegres, e me deram suporte na realização dos experimentos e em todas as tarefas, pois com vocês eu aprendi o que é o trabalho em equipe.

Também minhas professoras Clélia e Lúcia, que abriram as portas do laboratório desde a iniciação científica e continuaram a dedicar o seu tempo dando amparo até o mestrado. São mulheres fortes e inspiradoras que vou levar como exemplo sempre em minha vida. Muito obrigada por todo tempo e trabalho dedicado a me ensinar lições valiosas que com certeza me moldaram para chegar até aqui e que só irão somar em minha bagagem.

Minha família, que desde os meus primeiros passos, vem me apoiando em todos os meus caminhos. Amo imensamente todos vocês: mãe, pai, Débora e Fabiano. Mãe e pai, muito obrigada por nunca desistirem de mim e sempre estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas. Débora, minha irmã e melhor amiga, obrigada por vivenciar as experiências mais incríveis comigo e nunca largar a minha mão. Diana, obrigada por estar presente em minha vida desde o ensino fundamental e estar presente em todas as minhas conquistas e comemorar comigo em todas elas, também é muito bom comemorar as suas com você.

Não posso esquecer de todos os professores que foram essenciais na minha formação desde a pré-escola até este momento. Obrigada por toda a paciência, carinho e ensinamento durante esses anos.

Gostaria de agradecer a Loreana que colaborou de braços abertos para que algumas dúvidas fossem sanadas neste trabalho e ao laboratório do professor Ropelle que também colaborou prontamente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – processo nº 88887.669269/2022-00.

Resumo

Em 2022, a obesidade já atingiu mais de 41 milhões de brasileiros. O alto consumo de nutrientes e o baixo gasto energético provocam injúria do tecido adiposo (TA), desencadeando um processo de inflamação crônica de baixo grau com o predomínio na liberação de adipocinas pró-inflamatórias e diminuição de mediadores anti-inflamatórios. Ocorre também um aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido ao aumento de infiltração de células do sistema imunológico e amplificação da inflamação na região do hipotálamo. Diante do desbalanço sistêmico, ocorre um desequilíbrio da homeostase energética. Contudo, são poucos os estudos que investigam as vias de sinalização envolvidos na interação do eixo TA-hipotálamo como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da obesidade. O citral é um monoterpeneo, de origem vegetal, que possui atividade antioxidante e anti-inflamatória já comprovada na literatura. Assim, nosso objetivo foi avaliar a ação preventiva do citral na inflamação ocasionada pela obesidade em camundongos C57BL/6J, investigando os mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes do eixo TA-hipotálamo. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J com 6 semanas de idade (n=10), e a indução de obesidade com dieta hiperlipídica (HFD; 60% calorias provenientes de lipídios) durante 17 semanas (CEUA nº 3547180722). Os animais foram separados em cinco grupos: alimentados com dieta padrão (DP) e os que receberam HFD mais o veículo e os tratamentos com o citral por via oral (25, 100 ou 300 mg/kg). Ao final do período de indução, foram realizados os testes de tolerância à glicose e insulina (TOTG e TTI). Os TA epididimal e hipotalâmico foram coletados para quantificação de mediadores inflamatórios interleucina (IL)-4 e IL-10 pelo ensaio Luminex. Para a análise de expressão gênica dos mediadores inflamatórios IL-6 e IL-10, assim como o receptor de adiponectina no hipotálamo pela técnica de RT-qPCR. Foi realizada a determinação de mecanismos antioxidantes no tecido hipotalâmico, através quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e quantificação da enzima catalase (CAT). Por fim, foi executado a quantificação de leptina e adiponectina através do imunoenensaio ELISA sanduíche, no TA e soro. Foi efetuado o teste de normalidade e em seguida, os dados foram submetidos ao teste *t* de Student não pareado para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias para comparação entre três grupos ou mais, seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). Observamos o aumento significativo da massa corporal, índice de adiposidade e hiperglicemia dos animais que receberam HFD em comparação ao grupo DP. O tratamento dos animais HFD com citral 300 mg/kg foi capaz de promover a redução da massa corporal dos animais em relação ao grupo HFD sem tratamento. O grupo de animais tratados com citral 300 mg/kg apresentou redução da glicemia e diminuição da ingestão calórica. Tais resultados podem ser explicados pelo aumento da IL-4 no tecido hipotalâmico, aumento da IL-10 e IL-6 no TA com os animais HFD previamente tratados com citral na dose de 300 mg/kg em relação aos animais HFD que receberam somente o veículo. Também, o citral foi capaz de promover a redução dos níveis séricos de leptina e aumento de adiponectina. Em síntese, a administração de citral na dose de 300 mg/kg promoveu uma ação anti-inflamatória na resolução de alterações metabólicas decorrentes da obesidade. Diante disso, os novos desafios serão caracterizar mecanismos neurais da atuação do citral sobre neurônios hipotalâmicos.

Palavras-chave: Tecido adiposo; tecido hipotalâmico; inflamação hipotalâmica; obesidade; citral; atividade anti-inflamatória

Abstract

In 2022, obesity affected more than 41 million Brazilians. The high consumption of nutrients and low energy expenditure causes injury to the adipose tissue (AT), triggering a process of chronic low-grade inflammation with a predominance of pro-inflammatory adipokines and a decrease in anti-inflammatory mediators, fundamental for the control of an inflammatory response. There is also an increase in reactive oxygen species (ROS) due to increased infiltration of immune system cells and amplification of inflammation in the hypothalamus region. Together with systemic imbalance, there is an imbalance in energy homeostasis. However, there have been few studies that investigate the signaling pathways involved in the interaction of the TA-hypothalamus axis as potential therapeutic targets for the treatment of obesity. Citral is a monoterpene, of plant origin, which has antioxidant and anti-inflammatory activity already proved in the literature. Thus, the aim of this study was to evaluate the preventive action of citral in low-grade chronic inflammation caused by obesity, investigating the anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of the TA-hypothalamus axis, in C57BL/6J mice. Male C57BL/6J mice (n=10) were used, and obesity was induced with high-fat diet (HFD; 60% calories from lipids) for 17 weeks (CEUA n° 3547180722). The animals were divided into five groups: those fed with a standard diet (SD) and those that received HFD plus oral citral treatment (25, 100 or 300 mg/kg). At the end of the induction period, glucose and insulin tolerance tests (TOTG and TTI, respectively) were performed. Epididymal AT and hypothalamic tissue were collected for quantification of interleukin (IL)-4 and IL-10 inflammatory mediators by Luminex. The gene expression of the inflammatory mediators IL-6 and IL-10, as well as the adiponectin receptor in the hypothalamic tissue, were performed by the RT-qPCR technique. The determination of antioxidant mechanisms was performed, through activity quantification of the enzyme superoxide dismutase (SOD) and quantification of the enzyme catalase (CAT). Lastly, the quantification of adipokines, leptin and adiponectin were performed through the sandwich ELISA immunoassay. A normality test was performed to analyze whether the data are parametric or non-parametric. Data were subjected to unpaired Student's t-test for comparison between two groups and one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) for comparison between three groups or more, followed by Tukey's test, $p < 0,05$. We observed an increase in body weight, adiposity index and hyperglycemia of the animals that received HFD compared to the SD-fed animals. Citral 300 mg/kg was able to promote the reduction of the animal's body weight in relation to the HFD group. Citral 300 mg/kg-treated mice showed a reduction in glycemia compared to eutrophic mice and a decrease in caloric intake. This can be explained by the IL-4 increase in the hypothalamic tissue and the IL-10 increase in AT with the citral preventive treatment at a dose of 300 mg/kg. In addition, this dose promotes a leptin levels reduction and an adiponectin increase in serum. In conclusion, the administration of citral at a dose of 300 mg/kg possibly promoted an anti-inflammatory action in the resolution of metabolic alterations such as: insulin resistance, caloric intake and body mass gain. Therefore, we will characterize the neural control of citral action on anorexigenic and orexigenic neurons through immunohistochemical techniques.

Keywords: Adipose tissue; hypothalamic tissue; hypothalamic inflammation; citral; obesity; anti-inflammatory activity.

Sumário

1-Introdução.....	12
2-Objetivo Geral.....	20
2.1-Objetivos Específicos.....	20
3-Material e Métodos.....	20
3.1-Animais.....	20
3.2-Indução da Obesidade.....	20
3.3-Tratamentos e Coleta do Material.....	21
3.4-Coleta e Preparo do Tecido Hipotalâmico.....	22
3.5-Índice de Adiposidade.....	22
3.6-Ingestão Calórica.....	23
3.7-Quantificação de Adipocinas (Multiplex).....	23
3.8-Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG).....	24
3.9-Teste de Tolerância à Insulina (TTI).....	24
3.10-Determinação de Mecanismos Antioxidantes (SOD, CAT).....	24
3.11-Expressão Gênica de Marcadores Inflamatórios (RT-qPCR).....	25
3.12-Quantificação de Adipocinas (ELISA).....	26
3.13-Análise Estatística.....	26
4-Resultados.....	26
5-Discussão.....	40
6-Conclusão.....	45
7-Disciplinas Cursadas.....	46
8-Atividades Desenvolvidas.....	46
9-Referências.....	49

Lista de Ilustrações

Figuras

- Figura 1: Esquema dos tratamentos crônicos com citral oferecidos durante 119 dias, eutanásia e experimentos subsequentes. Grupo eutrófico durante todo o período e indução de obesidade em camundongos C57BL/6J com HFD por 119 dias, sendo introduzido tratamento com citral nas doses de 25, 100 e 300 mg/kg e tween 10 mL/kg; desde o início da indução..... 22
- Figura 2: Imagens representativas de camundongos C57BL/6J machos eutróficos ou com obesidade induzida por HFD e tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 27
- Figura 3: Evolução da massa corporal durante a indução de obesidade em camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. A indução e tratamentos foram introduzidos a partir do dia 0. Ganho de massa corporal ao longo das 17 semanas (A.) e área sob a curva (AUC) (B)..... 28
- Figura 4: Índice de adiposidade de camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 30
- Figura 5: Índice de adiposidade de camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. 31
- Figura 6: Glicemia em jejum de camundongos C57BL/6J machos (n= 6-7) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 32
- Figura 7: Teste Oral de tolerância à glicose (TOTG) de camundongos C57BL/6J machos (n= 6-7) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Curva glicêmica de animais (A) nos minutos 0', 15', 30', 60', 120', e área sob a curva (AUC) do TOTG de todos os grupos experimentais (B). 33
- Figura 8: Retorno Glicêmico de camundongos C57BL/6J machos (n= 6-7) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 34
- Figura 9: Teste de tolerância à insulina (TTI) de camundongos C57BL/6J machos (n= 6-7) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Curva glicêmica de animais (A), e área sob a curva (AUC) do TTI de todos os grupos experimentais (B)... 35
- Figura 10: Expressão gênica das citocinas: A. IL-10 e B. IL-6 através de RT-qPCR, no TA epididimal de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 36
- Figura 11: Quantificação de citocinas anti-inflamatórias: A. IL-4 e B. IL-10 através de ensaio Luminex, no TA epididimal de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 36
- Figura 12: Expressão gênica do receptor de adiponectina, através de RT-qPCR, no tecido hipotalâmico de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 37
- Figura 13: Quantificação de citocinas anti-inflamatórias: A. IL-4 e B. IL-10 através do ensaio Luminex, no tecido hipotalâmico de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 38
- Figura 14: Quantificação das adipocinas anti-inflamatória, adiponectina no TA A. e no soro diluído 5000x C. e pró-inflamatória, leptina, no TA B. e no soro D. de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas..... 38

Figura 15: Quantificação de A. CAT e atividade de B. SOD, no tecido hipotalâmico de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas.....	40
--	----

Tabelas

Tabela 1: Composição Nutricional e calórica em 1 kg das dietas DP e HFD.....	21
--	----

Tabela 2: Massa corporal inicial, final e ganho de massa corporal total em camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas.....	28
---	----

Tabela 3: Análise da massa dos tecidos adiposos: epididimal, visceral, retroperitoneal e total de camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas.....	29
--	----

Tabela 4: Análise da massa dos órgãos: fígado, coração, baço e rins de camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas.....	31
---	----

Anexo

Anexo 1: Comprovante de submissão de proposta à CEUA.....	57
---	----

Lista de abreviatura e siglas

AGL:	Ácido Graxo Livre
AgRP:	Peptídeo Relacionado à Agouti
AMPK:	Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
ANOVA:	Análise de Variância
ARC:	Núcleo Arqueado
CAT:	Catalase
CEMIB:	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
CX3CL1:	Fructalquina
BSA:	Albumina Sérica Bovina
DL50:	Dose Letal 50
DP:	Dieta Padrão
EROs:	Espécies Reativas de Oxigênio
GLUT4:	Transportador de Glicose 4
GPR40:	Receptor acoplado à proteína G 40 de neurônios hipotalâmicos
GSH:	Glutationa Reduzida
TOTG:	Teste Oral de Tolerância à Glicose
HFD:	Dieta Hiperlipídica
IKK:	I κ B Quinase
IL:	Interleucina
IL-1ra:	Antagonista de receptor de interleucina-1
JNK:	c-jun-N-terminal quinase
LHA:	Área Lateral Hipotalâmica
LOAEL:	Nível do menor efeito observado
LPS:	Lipopolissacarídeo
NF- κ B:	Fator Nuclear- κ B
NOAEL:	Nível de efeito adverso não observado

NPY:	Neuropeptídeo Y
PIC:	Coquetel Inibidor de Protease
POMC:	Neurônios de Pró-opiomelanocortina
PKB:	Proteína Quinase B
PVN:	Núcleo paraventricular
SOCS3:	Supressor de Sinalização de Citocina 3
SOD:	Superóxido Dismutase
STAT3:	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
TA:	Tecido Adiposo
TLR:	Receptor do Tipo Toll
TNF- α :	Fator de Necrose Tumoral- α
TTI:	Teste de Tolerância à Insulina
VHM:	Núcleo Ventromedial do Hipotálamo
α -MSH:	Hormônio α -melanócito estimulante

1-Introdução

A obesidade se tornou a grande pandemia do mundo moderno. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2016, mais de 1,6 bilhões de adultos no mundo estavam com sobrepeso, sendo que 650 milhões eram obesos. Assim, em 2016, 39% da população adulta apresentava sobrepeso e 13% estava obesa. Desde 1975, o número de casos de obesidade quase triplicou no mundo inteiro (O.M.S, 2021). Em 2022, foi verificado que a obesidade e sobrepeso afetam quase 60% dos adultos, na região europeia (O.M.S, 2022). O Atlas da Obesidade Mundial, também estima que, até 2035, a obesidade poderá afetar até quatro bilhões de pessoas. Estes dados representam um aumento de 38% da população com obesidade, em 2020, para 50% da população, em 2035 (LOBSTEIN *et al.*, 2023). No Brasil, há um crescimento contínuo de pessoas com obesidade, atingindo mais de 41 milhões de brasileiros (Ministério da Saúde, 2022).

Esse crescimento na taxa de obesidade pode ser explicado pelo alto consumo de alimentos ultraprocessados ricos em gordura e açúcares, juntamente com o baixo gasto energético, devido a um estilo de vida mais sedentário (O.M.S, 2021). Tal desequilíbrio, resulta em um acúmulo de lipídeos no tecido adiposo (TA), causando a hipertrofia e hiperplasia deste tecido, trazendo prejuízos para a saúde (WANG *et al.*, 2021). O sobrepeso e a obesidade estão intimamente relacionados com o aumento do risco de desordens musculoesqueléticas (como a osteoartrite), alguns tipos de câncer (cólon, ovário, próstata, dentre outros), diabetes *mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares, sendo esta última, a principal causa de morte no mundo (O.M.S, 2021).

O TA possui diversas funções importantes além do seu papel na reserva energética, como por exemplo, a manutenção da temperatura corpórea e funções endócrinas, como a síntese e a secreção de adipocinas (citocinas, quimiocinas e hormônios) pelos adipócitos (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; LEE *et al.*, 2019). Este tecido pode ser dividido em dois tipos principais, o TA marrom, que é multilocular, ou seja, a célula possui vários vacúolos de lipídeos, e tem como função a dissipação de calor (ZWICK *et al.*, 2018). E há o TA branco que apresenta uma grande variedade de células que compõe e ajudam no seu desempenho, como: adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, macrófagos, monócitos e outras (FRIGOLET & GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2020). Os adipócitos do TA branco, são

células uniloculares e possuem o núcleo periférico com um vacúolo de lipídio, onde fica armazenada a reserva energética através de moléculas de triacilglicerol (FRIGOLET & GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2020).

Na obesidade, o consumo excessivo de nutrientes leva à injúria no TA, tendo como resposta, o início de um processo inflamatório. Isto ocorre, devido ao aumento na expressão das quinases c-jun-N-terminal quinase (JNK), que promovem a apoptose de células da região e o fator nuclear kappaB (NF- κ B), que possui o papel de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β) (GÓMEZ-APO *et al.*, 2021). Normalmente, quando a injúria é removida ou neutralizada, essa inflamação é solucionada. Porém, na obesidade esta resolução não ocorre, provocando uma resposta inflamatória crônica de baixo grau (WANG *et al.*, 2021). Além da liberação de citocinas pelo TA, também ocorre a produção de quimiocinas e produtos da apoptose de adipócitos que desencadeiam a ativação e maior infiltração das células do sistema imunológico, como macrófagos, no TA (WANG *et al.*, 2021).

O TA também é responsável pela expressão e liberação de adipocinas, que são estruturas proteicas e regulam diversas funções no organismo, como: sensibilidade à insulina, balanço energético, apetite e inflamação (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015). Na obesidade, os altos níveis destas citocinas pró-inflamatórias, possuem um papel crítico na homeostase energética, pois comprometem a cascata de sinalização da insulina e leptina, podendo desencadear uma resistência à resposta fisiológica destes hormônios (MARQUES *et al.*, 2021).

Outro tecido importante da regulação da homeostase energética é tecido hipotalâmico que está localizado na região do diencefalo, ventralmente e anteriormente ao tálamo, passando pelo terceiro ventrículo e alcançando os corpos mamilares (MARTIN, 2013). As projeções neurais existentes neste tecido podem ser divididas em núcleos, sendo os principais: arqueado (ARC) e ventromedial (VMH) (MARCHANT *et al.*, 2012). O hipotálamo possui diversas funções como controle da ingestão, regulação da temperatura corporal, secreção de hormônios, regulação do ciclo circadiano, entre outros. E mais especificamente, a região do ARC é o grande centro da homeostase energética, onde neurônios que projetam para esta região recebem sinalizações enviadas pelo próprio TA. E estes sinais indicam a condição da reserva energética, ou seja, o acúmulo de gordura corporal (REMMERS & DELEMARRE-VAN de WAAL, 2011). Com as informações captadas, o hipotálamo

é capaz de controlar o apetite e o metabolismo para regular a demanda energética (TAOUI, 2016). Porém, na obesidade essa sinalização não ocorre de maneira adequada (TAOUI, 2016).

Em indivíduos obesos, a inflamação não se restringe ao TA, atuando também em outros tecidos, como no tecido hipotalâmico. O aumento dos níveis de ácidos graxos livres (AGL) na obesidade promovem a ativação de receptores do tipo toll (TLR) presentes na membrana da micróglia, desencadeando um processo de inflamação hipotalâmica por ativar as vias c-Jun-N-terminal quinase (JNK) e NF-κB, e promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias (SEONG *et al.*, 2019). Tais citocinas ativam vias intracelulares inflamatórias, as quinases JNK e o complexo IκB quinase (IKK), que catalisam a inibição da fosforilação em resíduos de serina de proteínas importantes que participam da cascata de sinalização da via de resposta da leptina e insulina (DRAGANO *et al.*, 2017). Também ocorre a indução da expressão de fructalquina (CX3CL1) no hipotálamo, promovendo o recrutamento de monócitos e consequentemente a ampliação da inflamação (ARAUJO *et al.*, 2016).

Com o aumento de infiltração de células imunológicas e instalação da inflamação, na região do hipotálamo em camundongos obesos, há uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (de BONA SCHRAIBER *et al.*, 2019). Este dano oxidativo, pode prejudicar o bom funcionamento celular, por estabelecer uma peroxidação lipídica, danificando a membrana da célula e afetando sua integridade, e como consequência, pode ocorrer a apoptose de células na região (FAN, 2021; FISCHER & MAIER, 2015). Na homeostase, as EROs funcionam como mecanismo de defesa para o organismo, quando presente em níveis fisiológicos (SEPASI TEHRANI & MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018; de BONA SCHRAIBER *et al.*, 2019). Para isto, é necessário a atuação de um sistema antioxidante para manter os níveis ideais para o bom funcionamento da célula (BONA SCHRAIBER *et al.*, 2019). Um dos principais mecanismos antioxidantes é através da enzima superóxido dismutase (SOD), a qual realiza a conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (FISCHER & MAIER, 2015). Outra enzima antioxidante importante é a catalase (CAT), que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, moléculas que não são citotóxicas (SEPASI TEHRANI & MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018). Assim, estas enzimas têm como função proteger as células de uma possível oxidação e toxicidade. Estes mecanismos inflamatórios e oxidativos, devido aos altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados, podem levar a

um desbalanço na secreção de adipocinas como leptina e adiponectina, assim como um desequilíbrio em suas ações nos neurônios hipotalâmicos (FISCHER & MAIER, 2015; de BONA SCHRAIBER *et al.*, 2019).

No núcleo arqueado (ARC), há populações de neurônios que participam do balanço energético, como neurônios orexígenos, do tipo neuropeptídeo Y (NPY) e neurônios anorexígenos de pró-opiomelanocortina (POMC) (ENGIN, 2017). Os neuropeptídeos hormônio melanócito-estimulante (α -MSH) são produzidos pelos neurônios POMC, que são a população lateral de neurônios presentes no ARC do hipotálamo (REMMERS & DELEMARRE-VAN de WAAL, 2011). Já a população medial de neurônios no ARC, expressam neuropeptídeo Y, que também está presente na região do núcleo paraventricular. Estes neurônios também estão localizados em outros núcleos, como o núcleo paraventricular (PVN) e área lateral hipotalâmica (LHA) (REMMERS & DELEMARRE-VAN de WAAL, 2011). Estes neurônios hipotalâmicos são importantes na homeostase energética pois recebem informações periféricas de adipocinas como leptina e adiponectina secretadas pelo TA, que indicam a situação da reserva energética distribuída pelo corpo e também há a recepção de informação hormonal como de insulina (REMMERS & DELEMARRE-VAN de WAAL, 2011; DRAGANO *et al.*, 2017). A leptina é um peptídeo secretado pelos adipócitos, cuja principal ação é regular o gasto energético e a ingestão alimentar, promovendo a homeostasia energética (DRAGANO *et al.*, 2017). Após a ingestão alimentar e acúmulo de calorias, em condições fisiológicas, a leptina atua em seu receptor fazendo a sinalização por meio do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), desencadeando a inibição de NPY e o peptídeo relacionada ao agouti (AgRP), que estimulam o apetite. Ao mesmo tempo, esta adipocina atua na estimulação de neurônios POMC, que promove uma resposta de saciedade (LEE *et al.*, 2019).

Na obesidade, a inflamação no ARC juntamente com a hiperleptinemia, promove um aumento da fosforilação de STAT3 e conseqüentemente, a ativação do supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3), o qual atua como inibidor da sinalização da leptina. Ou seja, não há uma inibição dos neurônios orexígenos NPY e AgRP, juntamente com a ausência na ativação dos neurônios anorexígenos POMC (ENGIN, 2017; DRAGANO *et al.*, 2017). Essas alterações promovem disfunções na regulação da homeostasia energética, ao favorecer a resistência à leptina no encéfalo, diminuindo o efeito anorexígeno desse hormônio (LEE *et al.*, 2019).

A adiponectina, juntamente com a leptina, desempenha papel no controle da homeostase energética, regulando a atividade anorexígena dos neurônios POMC, no ARC, por inibir os neurônios orexígenos NPY/AgRP e desinibir os neurônios POMC (LEE *et al.*, 2019). A adiponectina tem atividade anti-inflamatória, pois inibe a via NF- κ B em macrófagos e, conseqüentemente, diminui a resposta inflamatória. Além disto, a adipocina proporciona a polarização do macrófago M1, pró-inflamatório, para o macrófago tipo M2, anti-inflamatório, induzindo a liberação de citocinas anti-inflamatórias como: IL-10 e antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1ra) (LEE *et al.*, 2019). Em indivíduos obesos, há baixos níveis de adiponectina, comprometendo o controle adequado do gasto energético e ingestão alimentar. Sua ação anti-inflamatória também é diminuída, determinando um caráter pró-inflamatório da adiponectina para o tecido (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015).

As altas concentrações de lipídios e carboidratos provenientes de uma dieta hiperlipídica (HFD), promovem uma disfunção hipotalâmica, que acarreta na apoptose de neurônios anorexígenos do tipo POMC e de neurônios orexígenos do tipo NPY, e induzem a ativação do NF- κ B (ARAUJO *et al.*, 2016).

Um outro hormônio essencial na manutenção energética e equilíbrio no funcionamento do organismo é a insulina. Ela possui diversas atividades fisiológicas como: captação de glicose pelos tecidos, inibição da glicogenólise e gliconeogênese, assim como diminuição da lipólise (TONG *et al.*, 2021). Este hormônio, que é secretado pelas células beta pancreáticas, se liga ao seu receptor, na subunidade alfa, gerando a autofosforilação do receptor e seus substratos (TONG *et al.*, 2021). Com isto, promove a ativação da proteína quinase B (PKB), a qual possibilita o recrutamento do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática da célula, tendo assim, a captação da glicose estabelecida pelos tecidos (TONG *et al.*, 2021; WONDMKUN, 2020).

Na obesidade, pode ocorrer a diminuição de sensibilidade à insulina, pois ocorre uma diminuição na secreção da adiponectina, que possui ação na ativação da proteína ativada por AMP quinase (AMPK), melhorando a sensibilidade à insulina nos tecidos (WONDMKUN, 2020). Também ocorre um aumento na secreção da leptina na obesidade, que está associada com a resistência à insulina (WONDMKUN, 2020). Juntamente com estes eventos, ocorre uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, através do recrutamento de macrófagos e outras células imunes no TA e tecido hipotalâmico (SANTOS *et al.*,

2021; BENOMAR & TAOUIS, 2019; SCHOROEDER, 2020). Isto acontece, pois durante a instalação da obesidade, ocorre a interação de ácidos graxos saturados e TLRs, no hipotálamo e outros tecidos, promovendo uma resposta inflamatória através da ativação da sinalização de NF-kB (BENOMAR & TAOUIS, 2019; SCHOROEDER, 2020). E com o aumento da sinalização deste fator de transcrição, acontece a estimulação da expressão de SOCS3, que inibe a fosforilação dos receptores de insulina. Além de promover o estresse do retículo endoplasmático, tendo como resultado, a resistência à insulina (BENOMAR & TAOUIS, 2019; SCHOROEDER, 2020).

Na obesidade, também há o aumento de outras adipocinas anti-inflamatórias, como: IL-10 e IL-1ra. Essas citocinas têm como ação atenuar a inflamação nos tecidos. A IL-10 exerce essa função por inibir a via de sinalização do NF-kB, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Enquanto a IL-1ra funciona como antagonista competitivo do receptor da IL-1 β e, dessa forma, também promove a inibição da atividade do fator de transcrição NF-kB. Estas adipocinas anti-inflamatórias também participam na resistência à leptina por promoverem a indução da STAT3 (AGUILAR-VALLES *et al.*, 2015). Outra citocina anti-inflamatória importante nesse processo é a IL-4, a qual possui muitas ações importantes na obesidade, como por exemplo o papel na melhora na sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, além de contribuir para a redução de lipídios em adipócitos e promover a lipólise (CHANG *et al.*, 2019; SHIAU *et al.*, 2019). Porém, na inflamação hipotalâmica, os níveis dessas citocinas anti-inflamatórias são reduzidos, como elucidado no trabalho realizado por Bona Schraiber e colaboradores (2019) que constatou a diminuição da IL-10 na região hipotalâmica de camundongos com obesidade induzida por HFD.

À vista de toda esta relação entre inflamação do TA e inflamação hipotalâmica, alguns estudos buscam através de opções terapêuticas minimizar esse quadro inflamatório. A introdução de uma dieta rica em ômega-3 e ômega-9 em substituição a uma dieta rica em ácidos graxos saturados, em camundongos *Swiss*, mostrou a diminuição da citocina TNF- α e aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, reduzindo a inflamação hipotalâmica (CINTRA *et al.*, 2012). Estes ácidos graxos insaturados (ômega-6 e 9) atuam no receptor acoplado à proteína G 40 de neurônios hipotalâmicos (GPR40), aumentando a expressão de mRNA da POMC (SEONG *et al.*, 2019). Além disso, sabe-se que o exercício físico melhora a

sensibilidade à leptina por diminuir a expressão de mRNA de NPY e aumentar a expressão de mRNA de POMC, isto ocorre pois há uma redução da inflamação hipotalâmica por aumentar a expressão da IL-10 e consequente supressão da via IKK (SEONG *et al.*, 2019). Há estudos que demonstram outras estratégias terapêuticas, como a inibição e menor expressão de citocinas pró-inflamatórias, revelando um efeito positivo na diminuição da inflamação de baixo grau ou aqueles empregando as terapias anti-TNF- α , como os fármacos: etanercepte, infliximabe e adalimumabe, os quais não demonstraram resultados positivos com relação aos efeitos anti-inflamatórios (TERRA *et al.*, 2009; SEONG *et al.*, 2017). No entanto, a compreensão sobre os mecanismos e interação do eixo TA-hipotálamo na obesidade ainda é escassa, e as abordagens terapêuticas ainda necessitam ser mais exploradas.

Uma alternativa relevante são os produtos naturais de origem vegetal, por apresentarem um potencial medicinal, como ações anti-inflamatória, antioxidante e analgésica, funcionando como base para o desenvolvimento de novos fármacos (BOUKHATEM *et al.*, 2014; RISHTON, 2008). Os produtos naturais são amplamente usados na terapia de diversas patologias e também, têm suas estruturas utilizadas para formulações sintéticas. Dentre os fármacos aprovados desde 1981 até 2019, 3,8% são produtos naturais e 18,9% são provenientes de algum produto natural e com alguma alteração semi sintética (NEWMAN & CRAGG, 2020). Desta forma, o citral é uma substância promissora, de origem vegetal, sendo um monoterpene de cadeia acíclica, composto por uma mistura de dois isômeros, o neral e o geranial (NISHIJIMA *et al.*, 2014). É o composto majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, popularmente chamado de capim-limão, e *Zingiber officinale*, o gengibre, possuindo diversas propriedades farmacológicas comprovadas como ação antioxidante, antifúngica, anti-inflamatória, antiviral, antipirética, analgésica, dentre outros (SRI DEVI & ASHOKKUMAR, 2018; EMÍLIO-SILVA *et al.*, 2020). Na revisão de Sharma e colaboradores (2020), foram destacadas a ação antioxidante do citral em células IEC-6 (linhagem celular derivada de epitélio intestinal de rato), que teve atuação no aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e nos níveis de antioxidantes não enzimáticos como a glutatona reduzida (GSH). E sua ação anti-inflamatória, possuindo a capacidade de inibir citocinas, como TNF- α e IL-8, induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos peritoneais murinos, assim como a inativação de NF- κ B em células HUVEC (SHARMA *et al.*, 2020). O citral é um composto lipofílico, desta maneira,

consegue atravessar a barreira hematoencefálica, por isso há uma alta probabilidade de sua ação ocorrer no hipotálamo (FUKUMOTO *et al.*, 2006). Este monoterpeno, também apresenta baixa toxicidade, na qual estudos com roedores comprovaram que a dose letal 50 (DL50) foi maior que 1000 mg/kg em camundongos e ratos de ambos os sexos. Já ao analisar a toxicidade em doses repetidas do citral por via oral, foi avaliado o nível de efeito adverso não observado (NOAEL), o qual foi observado que as doses de citral é maior que 500 mg/kg e avaliado o nível do menor efeito observado (LOAEL), o qual foi observado que as doses de citral é maior que 800 mg/kg em roedores (OECD, 2001). Nosso grupo demonstrou que os camundongos *Swiss* obesos tratados por via oral nas doses de 25 e 100 mg/kg, apresentou ação anti-inflamatória, pela diminuição sérica das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6 (EMÍLIO- SILVA *et al.*, 2020).

Também foi realizada a padronização da indução de obesidade por HFD, onde observou-se que em 12 semanas houve o aumento da massa corporal de camundongos *Swiss* obesos machos em comparação ao grupo que recebeu dieta padrão (DP), assim como o aumento do índice de adiposidade nos animais que receberam HFD (EMÍLIO-SILVA *et al.*, 2020).

Deste modo, nossa hipótese é que o citral será capaz de aumentar adipocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, adiponectina) e diminuir as adipocinas pró-inflamatória (IL-6 e leptina), envolvidas no eixo TA-hipotálamo. Bem como, a ação do citral pode envolver o aumento da expressão de receptores de adiponectina no hipotálamo, além de restaurar alterações metabólicas e possuir atividade anti-obesogênica. Por fim, nossa hipótese é de que o citral atue por via da atividade antioxidante sobre o estresse oxidativo no ARC do hipotálamo, em camundongos C57BL/6J obesos.

6-Conclusão

Foi possível observar a ação anti-obesogênica do tratamento preventivo com citral da dose de 300 mg/kg nos camundongos obesos alimentados com HFD. Essa resposta foi mediada por uma melhora na sensibilidade à insulina, com uma resposta semelhante à dos animais eutróficos. E também, o tratamento crônico com citral foi capaz de prevenir o aumento da ingestão calórica dos camundongos, ao longo das 17 semanas de indução. Esta melhora nas alterações metabólicas e a ingestão calórica em camundongos obesos, possivelmente pode ser explicada, devido ao tratamento preventivo com o citral na dose de 300 mg/kg, ser capaz de promover o aumento da citocina IL-4, no tecido hipotalâmico, mas não podendo ser explicada pelo aumento de IL-10, no TA. Além do tratamento crônico com citral promover o aumento dos níveis de adiponectina e diminuir os níveis de leptina no soro. O tratamento crônico dos animais com citral 300 mg/kg também não teve uma ação antioxidante na região hipotalâmica dos camundongos com obesidade. Deste modo, outras análises são necessárias para explicar melhor a resposta da dose citral 300 mg/kg, como a quantificação neurônios hipotalâmicos.

9-Referências

Abizaid, A., Gao, Q., Horvath, T. L. Thoughts for Food: Brain Mechanisms and Peripheral Energy Balance. *Neuron* **51**, 6, 691–702 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.025>

Aguilar-Valles, A., Inoue, W., Rummel, C., Luheshi, G.N. Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology* **96**, 124–134 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.023>

Araujo, E.P., Moraes, J.C., Cintra, D.E., Velloso, L.A. Mechanisms in endocrinology: Hypothalamic inflammation and nutrition. *Eur. J. Endocrinol* **175**, 97–105 (2016). <https://doi.org/10.1530/eje-15-1207>

Bear, M. F. Connors, B. W., Paradiso, M. A. Motivação. *In: Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 552-578 (2017).

Benomar, Y., Taouis, M. Molecular mechanisms underlying obesity-induced hypothalamic inflammation and insulin resistance: Pivotal role of resistin/tlr4 pathways. *Frontiers in Endocrinology*. **10** (2019). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00140>

Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Kebir, H.T. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J. Med.* **9**, 25431 (2014). <https://doi.org/10.3402/ljm.v9.25431>

Braune, J., Weyer, U., Hobusch, C., Mauer, J., Brüning, J. C., Bechmann, I., Gericke, M. IL-6 Regulates M2 Polarization and Local Proliferation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity. *The Journal of Immunology* **198**, 7, 2927–2934 (2017). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600476>

Cai, D., Liu, T. Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1243** (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06388.x>

Cintra, D. E., Ropelle, E. R., Moraes, J. C., Pauli, J. R., Morari, J., de Souza, C. T., Grimaldi, R., Stahl, M., Carvalheira, J. B., Saad, M.J., Velloso, L. A. Unsaturated Fatty Acids Revert Diet-Induced Hypothalamic Inflammation in Obesity. *PLoS One* **7**, 30571 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030571>

Citral CAS N°:5392-40-5. OECD SIDS CITRAL UNEP PUBLICATIONS (2001). Disponível em: <https://hpcchemicals.oecd.org/UI/handler.axd?id=0ea83202-3f4f-4355-be4f-27ff02>

e19cb9>.

Chang, Y. H., Tsai, J. N., Chen, T. L., Ho, K. T., Cheng, H. Y., Hsiao, C. W., Shiau, M. Y. Interleukin-4 Promotes Myogenesis and Boosts Myocyte Insulin Efficacy. *Mediators of Inflammation* **2019** (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/4182015>

Clementi, A. H., Gaudy, A. M., van Rooijen, N., Pierce, R. H., Mooney, R. A. Loss of Kupffer cells in diet-induced obesity is associated with increased hepatic steatosis, STAT3 signaling, and further decreases in insulin signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1792**, 11, 1062–1072 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.007>

De Blasio, A., D'Anneo, A., Lauricella, M., Emanuele, S., Giuliano, M., Pratelli, G., Calvaruso, G., Carlisi, D. The beneficial effects of essential oils in anti-obesity treatment. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 21 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms222111832>

de Bona Schraiber, R., de Mello, A. H., Garcez, M.L., de Bem Silveira, G., Zacaron, R. P., de Souza Goldim, M. P., Budni, J., Silveira, P. C. L., Petronilho, F., Ferreira, G. K., Rezin, G. T. Diet-induced obesity causes hypothalamic neurochemistry alterations in Swiss mice. *Metab. Brain Dis.* **34**, 565–573 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0337-9>

Den Boer, M. A. M., Voshol, P. J., Schröder-van Der Elst, J. P., Korshennikova, E., Ouwens, D. M., Kuipers, F., Havekes, L. M., & Romijn, J. A. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* **147**, 10, 4553–4558 (2006). <https://doi.org/10.1210/en.2006-0417>

Demidova, T.Y., Volkova, A. V., Grickevich, A.Y. Obesity and COVID-19: A fatal link. *Infect. Dis. News, Opin. Train.* **9**, 25–32 (2020). <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-3S-25-32>

Dionysopoulou, S., Charmandari, E., Bargiota, A., Vlachos, N., Mastorakos, G., & Valsamakis, G. The role of hypothalamic inflammation in diet-induced obesity and its association with cognitive and mood disorders. *Nutrients* **13**, 2, 1–21 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13020498>

Dragano, N.R.V., Haddad-Tovoli, R., Velloso, L.A. Leptin, Neuroinflammation and Obesity. *Frontiers of Hormone Research* 84–96 (2017).

<https://doi.org/10.1159/000452908>

Emílio-Silva, M. T., Rodrigues, V. P., Bueno, G., Ohara, R., Martins, M. G., Horta-Júnior, J. A. C., Branco, L. G. S., Rocha, L. R. M., Hiruma-Lima, C. A. Hypothermic effect of acute citral treatment during lps-induced systemic inflammation in obese mice: reduction of serum tnf- α and leptin levels. *Biomolecules* **10**, 1–18 (2020). <https://doi.org/10.3390/biom10101454>

Engin, A.B., Engin, A. Obesity and Lipotoxicity, *Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing, Cham.* **960** (2017) <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5>

Fan, Jeane. Efeito da suplementação de eriocitrina no perfil lipídico, capacidade antioxidante e peroxidação lipídica em indivíduos com pré-diabetes. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2021. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/216282>>.

Fischer, R., Maier, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: Role of TNF. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015** (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/610813>

Fukumoto, S., Sawasaki, E., Okuyama, S. Miyake, Y., Yokogoshi, H. Flavor components of monoterpenes in citrus essential oils enhance the release of monoamines from rat brain slices. *Nutritional Neuroscience*, **9** 73–80 (2006). doi: 10.1080/10284150600573660

Friгоlet, M. E., Gutiérrez-Aguilar, R. The colors of adipose tissue. *Gaceta Medica de Mexico* **156**, 2. (2020). <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000356>.

Gómez-Apo, E., Mondragón-Maya, A., Ferrari-Díaz, M., Silva-Pereyra, J. Structural Brain Changes Associated with Overweight and Obesity. *J. Obes.* **2021**, 1–18 (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/6613385>

He, M. Q., Wang, J. Y., Wang, Y., Sui, J., Zhang, M., Ding, X., Zhao, Y., Chen, Z. Y., Ren, X. X., Shi, B. Y. High-fat diet-induced adipose tissue expansion occurs prior to insulin resistance in C57BL/6J mice. *Chronic Diseases and Translational Medicine* **6**, 3, 198–207 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2020.06.003>

Jais, A., Brüning, J. C., Jais, A., Brüning, J. C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* **127**, 24–32 (2017). <https://doi.org/10.1172/JCI88878>.the

Franklin, K. B. J, Paxinos G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates,

Compact : The Coronal Plates and Diagrams. 5^a ed. Oxford: Elsevier Inc., (2017).

Koenen, M., Hill, M. A., Cohen, P., Sowers, J. R. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. *Circulation Research* 951–968 (2021). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318093>

Lee, T. H., Cheng, K. K., Hoo, R. L., Siu, P. M., Yau, S. The Novel Perspectives of Adipokines on Brain Health. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5638 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20225638>

Leopoldo, A. S., Lima-Leopoldo, A. P., Nascimento, A. F., Luvizotto, R. A. M., Sugizaki, M. M., Campos, D. H. S., Da Silva, D. C. T., Padovani, C. R., Cicogna, A. C. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **49**, 4 (2016). <https://doi.org/10.1590/1414-431X20155028>

Lin, S. Y., Yang, C. P., Wang, Y. Y., Hsiao, C. W., Chen, W. Y., Liao, S. L., Lo, Y. L., Chang, Y. H., Hong, C. J., & Chen, C. J. Interleukin-4 improves metabolic abnormalities in leptin-deficient and high-fat diet mice. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 12, 1–19 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21124451>

Liu, Y., Huang, Y., Liu, T., Wu, H., Cui, H., Gautron, L. Lipopolysaccharide Rapidly and Completely Suppresses AgRP Neuron-Mediated Food Intake in Male Mice. *Endocrinology* **157**, 2380–2392 (2016). <https://doi.org/10.1210/en.2015-2081>

Lobstein, T., Jackson-Leach, R., Powis, J., Brinsden, H. *World Obesity Atlas 2023* (2023). https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/wof-files/World_Obesity_Atlas_2023_Report.pdf

Lumeng, C. N., Saltiel, A. R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 6, 2111–2117 (2011). <https://doi.org/10.1172/JCI57132>

Marchant, N. J., Zayra Millan, E., McNally, G. P. The hypothalamus and the neurobiology of drug seeking. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 4. (2012). <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0817-0>.

Marques, C. G., dos Santos Quaresma, M. V. L., Nakamoto, F. P., Magalhães, A. C. O., Lucin, G. A., Thomatieli-Santos, R. V. Does Modern Lifestyle Favor Neuroimmunometabolic Changes? A Path to Obesity. *Front. Nutr.* **8** (2021). <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.705545>

Martin, J. Anatomia macroscópica do hipotálamo. Neuroanatomia: Texto e Atlas.

4^a ed. Porto Alegre: Artmed, cap. O Hipotálamo e a Regulação de Funções Corporais, p. 361-362 (2013). ISBN 0071603964/9780071603966. *E-book*.

Mauer, J., Chaurasia, B., Goldau, J., Vogt, M. C., Ruud, J., Nguyen, K. D., Theurich, S., Hausen, A. C., Schmitz, J., Brönneke, H. S., Estevez, E., Allen, T. L., Mesaros, A., Partridge, L., Febbraio, M. A., Chawla, A., Wunderlich, F. T., Brüning, J. C. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nature Immunology* **15**, 5, 423–430 (2014). <https://doi.org/10.1038/ni.2865>

Ministério da Saúde. O impacto da obesidade (2022). <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-brasil/eu-queroter-peso-saudavel/noticias/2022/o-impacto-da-obesidade>

Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **83**, 3, 770–803. (2020). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>

Nishijima, C. M., Ganev, E. G., Mazzardo-Martins, L., Martins, D. F., Rocha, L. R. M., Santos, A. R. S., Hiruma-Lima, C. A. Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **736**, 16–25 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.04.029>

Ohara R., Dario F. L., Emílio-Silva M. T., Assunção R., Rodrigues V. P., Bueno G., Raimundo P. R., da Rocha L. R. M., Hiruma-Lima C. A. Citral Modulates MMP-2 and MMP-9 Activities on Healing of Gastric Ulcers Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity. *J Mol Sci.* **24**, 5, 4888 (2023). doi: 10.3390/ijms24054888. PMID: 36902320

Oh-I S., Thaler J. P., Ogimoto K., Wisse B. E., Morton G. J., Schwartz M. W.. Central administration of interleukin-4 exacerbates hypothalamic inflammation and weight gain during high-fat feeding. *J Physiol Endocrinol Metab.* **299**, 1, 47- 53 (2010). doi: 10.1152/ajpendo.00026.2010.

Rishton, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. *J. Cardiol.* **101** (2008). <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.007>

Remmers, F., Delemarre-van de Waal, H. A. Developmental programming of

energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocrine Reviews* **32**, 2, 272–311 (2011). <https://doi.org/10.1210/er.2009-0028>.

Santos, A., Magro, D. O., Evangelista-Poderoso, R., Saad, M. J. A. Diabetes, obesity, and insulin resistance in COVID-19: molecular interrelationship and therapeutic implications. *Diabetology and Metabolic Syndrome* **13**, 1 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00639-2>

Seong, J., Kang, J. Y., Sun, J. S., Kim, K. W. Hypothalamic inflammation and obesity: a mechanistic review. *Arch. Pharm. Res.* **42**, 383–392 (2019) <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01138-9>

Sepasi Tehrani, H., Moosavi-Movahedi, A. A. Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **140**, 5–12 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>

Sharma, S., Habib, S., Sahu, D., Gupta, J. Chemical Properties and Therapeutic Potential of Citral, a Monoterpene Isolated from Lemongrass. *Med. Chem.* **17**, 2–12 (2020). <https://doi.org/10.2174/1573406416666191227111106>

Shiau, M. Y., Chuang, P. H., Yang, C. P., Hsiao, C. W., Chang, S. W., Chang, K. Y., Liu, T. M., Chen, H. W., Chuang, C. C., Yuan, S. Y., Chang, Y. H. Mechanism of Interleukin-4 Reducing Lipid Deposit by Regulating Hormone-Sensitive Lipase. *Scientific Reports* **9**, 1 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47908-9>

Schoroedar, H. Acompanhamento Temporal da Composição Corporal, Sensibilidade à Insulina e Inflamação de Baixo Grau em Camundongos C57BL/6J e os Efeitos do Tratamento Hipertérmico. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, p.120. (2020).

Solas, M., Milagro, F.I., Ramírez, M.J., Martínez, J.A. Inflammation and gut-brain axis link obesity to cognitive dysfunction: plausible pharmacological interventions. *Curr. Opin. Pharmacol.* **37**, 87–92 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.10.005>

Sohn, J. W. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Reports* **48**, 4, 229–233 (2015). <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.4.272>

Sprenger, S., Woldemariam, T., Kotchoni, S., Elshabrawy, H. A., Chaturvedi, L.S. Lemongrass essential oil and its major constituent citral isomers modulate

adipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. *Journal of Food Biochemistry* **46**, 14037 (2022). <https://doi.org/10.1111/jfbc.14037>

Sri Devi, S., Ashokkumar, N. Citral, a Monoterpene Inhibits Adipogenesis Through Modulation of Adipogenic Transcription Factors in 3T3-L1 Cells. *Indian J. Clin. Biochem.* **33**, 414–421 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0692-z>.

Taouis, M. MicroRNAs in the hypothalamus. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism.* **30**, 5, 641–651 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.beem.2016.11.006>.

Terra, X., Montagut, G., Bustos, M., Llopiz, N., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Arola, L., Blay, M. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* **20**, 210–218 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.02.005>

Tong Y, Xu S, Huang L, Chen C. Obesity and insulin resistance: Pathophysiology and treatment. *Drug Discov Today* **27**, 822-830 (2022). [doi:10.1016/j.drudis.2021.11.001](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.11.001). Epub 2021 Nov 9. PMID: 34767960.

Virtue, S., & Vidal-Puig, A. GTTs and ITTs in mice: simple tests, complex answers. *Nature Metabolism* **3**, 7, 883–886 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00414-7>

Zheng, H., Corkern, M. M., Crousillac, S. M., Patterson, L. M., Phifer, C. B., Berthoud, H. R. Neurochemical phenotype of hypothalamic neurons showing Fos expression 23 h after intracranial AgRP. *J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **282**, 1773–1781 (2002). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00019.2002>

Zhong H., Abdullah, Deng L., Zhao M., Tang J., Liu T., Zhang H., Feng F. Probiotic- fermented blueberry juice prevents obesity and hyperglycemia in high fat diet- fed mice in association with modulating the gut microbiota. *Food Funct.* **11**, 9192-9207 (2020). [doi: 10.1039/d0fo00334d](https://doi.org/10.1039/d0fo00334d). PMID: 33030465.

Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V., Plikus, M. V. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metabolism* **27**, 1 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.002>.

Wang, Q., Wang, Y., Xu, D. The roles of T cells in obese adipose tissue inflammation. *Adipocyte* **10**, 435–445 (2021). <https://doi.org/10.1080/21623945.2021.1965314>

Wueest, S., Konrad, D. The controversial role of IL-6 in adipose tissue on obesity-induced dysregulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **19**, 3, 607–613 (2020). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00306.2020>

Wondmkun, Y. T. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: Associations and therapeutic implications. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* **13**, 3611–3616 (2020). <https://doi.org/10.2147/DMSO.S275898>

WHO, W.H.O. Obesity and overweight (2021)

WHO, W.H.O. European regional obesity report 2022 (2022)