

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS 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: Profª Tit. Clélia Akiko Hiruma-Lima

Co-orientadora: Profª Dra. Lúcia Regina Machado da Rocha

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 – SP

2023

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 monoterpreno, 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 imunoensaio 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 nº 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-kB:	Fator Nuclear-kB
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-κB), 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-1β (IL-1β) (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- κ B, e promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias (SEONG *et al.*, 2019). Tais citocinas ativam vias intracelulares inflamatórias, as quinases JNK e o complexo I κ B 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 consequentemente, 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- κ B (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- κ B, 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- κ B. 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 glutathione 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-kB 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.

2-Objetivo Geral

Avaliar a ação do tratamento preventivo do citral na inflamação crônica de baixo grau em camundongos C57BL/6J machos obesos por HFD, investigando os mecanismos anti-inflamatórios, pró-inflamatórios e antioxidantes do citral sobre o eixo TA-hipotálamo.

2.1-Objetivos Específicos

- Identificar as adipocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias envolvidas no eixo TA-hipotálamo e determinar o efeito do tratamento com o citral sobre elas;
- Investigar o efeito do tratamento preventivo com citral sobre o metabolismo da glicose e massa corporal de camundongos C57BL/6J;
- Identificar a ação antioxidante com o tratamento preventivo do citral sobre o estresse oxidativo no ARC do hipotálamo em camundongos C57BL/6J obesos;
- Analisar o efeito do tratamento com citral sobre a expressão gênica de receptores de adiponectina no ARC do hipotálamo.

3-Materiais e Métodos

3.1-Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos, com aproximadamente 6 semanas, livre de patógenos, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB)-UNICAMP. Eles foram mantidos em caixas de polipropileno inicialmente com 10 animais sob temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12/12 horas e com livre acesso livre à água filtrada e ração. Os protocolos experimentais foram aprovados (Anexo 1) pelo CEUA (Comitê de Ética Uso de Animal) do Instituto de Biociências, UNESP (protocolo nº 3547180722).

3.2-Indução da Obesidade

Após a chegada dos animais ao biotério setorial, foram ofertadas para dois grupos de animais: DP (Presence®, Jaguaribara, CE, BR) com 15% de calorias provenientes de lipídios ou HFD (PragSoluções Biociências, SP, BR) com 60% de calorias provenientes de lipídios por 17 semanas (OHARA *et al.*, 2023) (Tabela 1). Ambos foram alimentados no período de 17 semanas (119 dias).

Tabela 1. Composição Nutricional e calórica em 1 kg das dietas DP e HFD. DP: Dieta Padrão; HFD: Dieta Hiperlipídica.

Componentes	Dieta Padrão (DP)		Dieta Hiperlipídica (HFD)	
	g/kg	kcal/kg	g/kg	kcal/kg
Amido de Milho (q.s.p.)	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Maltodextrina	132	528	132	528
Banha de Porco	-	-	312	2808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix de Minerais	35	-	35	-
Mix de Vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

3.3-Tratamentos e Coleta do Material

Após a aclimação de uma semana, os animais foram divididos em cinco grupos (n=10) que receberam a oferta de dieta juntamente com o tratamento crônico, via oral (gavagem) e diário, às 11 horas, durante o período de 17 semanas consecutivas (Fig. 1A). O primeiro grupo recebeu DP e veículo Tween 80 a 1%, 10 mL/kg (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, RJ, BR) e os outros quatro grupos receberam HFD e os respectivos tratamentos, com base na massa corporal de cada animal: veículo e citral (25 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg; grau de pureza $\geq 96\%$; Sigma, St.Louis, MO, EUA).

Finalizados os tratamentos, realizou-se a eutanásia dos animais com anestésico inalatório, isoflurano com a taxa de indução: 3-5% e taxa de manutenção: 1-2% (Isoforine®, Cristália–Produtos Químicos Farmacêuticos Ltd.a., Itapira, SP, BR), juntamente com a realização da punção cardíaca (Figura 1). Foram coletados os TAs

epididimal, visceral e retroperitoneal e órgãos como fígado, rins, baço e coração para posterior pesagem em uma balança analítica. As amostras foram depositadas junto com o solvente e feita a homogeneização com o microprocessador (Virtis, Gardiner, NY, EUA).

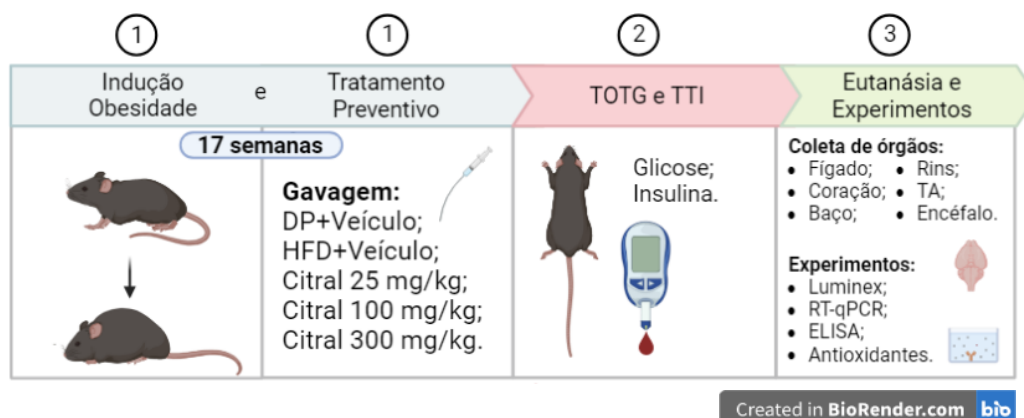


Figura 1. Esquema dos tratamentos crônicos com citral oferecidos durante 119 dias, eutanásia e experimentos subsequentes. Grupo eutrófico durante todo o período e indução de obesidade em camundongos C57BL/6J com HFD por 119 dias, sendo introduzido tratamento com citral nas doses de 25, 100 e 300 mg/kg e tween 10 mL/kg; desde o início da indução.

3.4-Coleta e Preparo do Tecido Hipotalâmico

O tecido encefálico foi coletado com o animal já eutanasiado através do anestésico isoflurano, seguido da punção cardíaca. Logo após, o animal foi decapitado, com uma tesoura, em formato de “V” por volta do pescoço, evitando danificar o encéfalo. A pele foi retirada juntamente com os músculos da cabeça, deixando o crânio exposto. Assim, o crânio foi quebrado de maneira delicada até expor o encéfalo e por fim, o tecido encefálico foi removido da cavidade craniana com uma espátula. Logo em seguida, o tecido foi congelado rapidamente por imersão em isopentano (Dinâmica, Indaiatuba, SP, BR), resfriado em gelo seco e, posteriormente, armazenado à -80 °C. O encéfalo foi cortado com uma matriz a partir da sua região mais caudal até alcançar o plano da comissura anterior do hipotálamo seguindo as coordenadas Bregma 0.14 mm, Interaural 3.94 mm até as coordenadas Bregma -0.10 mm, Interaural 3.70 mm (PAXINOS & FRANKLIN, 2019).

3.5-Índice de Adiposidade

O índice de adiposidade foi efetuado para analisar o efeito do tratamento preventivo com o citral sobre a massa do TA pela massa corporal dos camundongos, no dia da eutanásia. Para isto, foram somados os tecidos adiposos: visceral, retroperitoneal e epididimal, chegando a um valor de TA total de cada grupo. E

assim, o valor do TA total foi dividido pela massa corporal dos camundongos (LEOPOLDO *et al.*, 2016).

3.6-Ingestão Calórica

A ingestão calórica diária foi realizada para verificar se o tratamento preventivo com citral é capaz de interferir sobre a ingestão calórica de camundongos obesos. Para isto, mensuramos a quantidade das dietas: DP e HFD que os camundongos ingeriram, duas vezes por semana durante as 17 semanas de indução da obesidade. O cálculo da ingestão calórica diária por animal foi realizado através da somatória da ingestão alimentar semanal dividida por sete dias. Em seguida, a ingestão diária foi dividida pela quantidade de animais que continha em cada caixa (10 camundongos). E para finalizar, a ingestão diária por animal foi multiplicada pela quilocaloria (kcal) proveniente de lipídeos da dieta que cada grupo ingeriu (DP ou HFD). A ingestão diária dos animais que receberam HFD foi multiplicada por 3,17 kcal e dos animais que receberam DP foi multiplicada por 0,63 kcal.

Equação para cálculo de ingestão:

$$\frac{\text{Ingestão semanal}}{\text{sete dias}} = \text{Ingestão diária}$$

$$\frac{\text{Ingestão diária}}{\text{dez}} = \text{Ingestão diária por animal}$$

$$\text{Ingestão diária por animal} \times 0,63 \text{ kcal} = \text{Ingestão calórica diária por animal (DP)}$$

$$\frac{\text{Ingestão semanal}}{\text{sete dias}} = \text{Ingestão diária}$$

$$\frac{\text{Ingestão diária}}{\text{dez}} = \text{Ingestão diária por animal}$$

$$\text{Ingestão diária por animal} \times 3,17 \text{ kcal} = \text{Ingestão calórica diária por animal (HFD)}$$

3.7-Quantificação de adipocinas (Multiplex)

Para avaliar se o tratamento preventivo com o citral promoveu uma ação anti-inflamatória no eixo TA-hipotálamo, durante a obesidade e se a administração oral do citral é capaz de aumentar citocinas anti-inflamatórias, foi realizada a quantificação de citocinas anti-inflamatórias. Assim, foram utilizadas as amostras de encéfalo dos diferentes grupos (n=5) para determinação das citocinas IL-4 e IL-10, os tecidos foram processados com tampão RIPA (Sigma, St.Louis, MO, EUA) na diluição de 4x para lise celular, e foi realizado o ensaio Luminex-multiplex com o kit MCYTOMAG-70K-04C (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA). Os kits foram

utilizados de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes.

3.8-Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Durante a obesidade, a avaliação do tratamento preventivo com o citral, no melhoramento da resposta na captação de glicose pelos tecidos, foi realizada através do TOTG. Os testes foram realizados em animais eutróficos e obesos após o período da indução da obesidade e tratamento com citral (n=7). Para o TOTG, os animais foram submetidos ao jejum de 8 horas e depois foram coletadas amostras de sangue a partir da cauda. A glicemia basal foi determinada com um monitor de glicemia (Accu-chek Active Roche, Mannheim, Alemanha). Em seguida, os camundongos receberam uma solução de glicose (1 g/kg, v.o.) e as aferições da glicemia foram repetidas 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração. Para o retorno glicêmico foi calculada a subtração do valor da glicemia inicial e final.

3.9-Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

Para a avaliação do tratamento preventivo com o citral na sensibilidade à insulina, durante a obesidade, foi realizado o TTI. Os testes foram realizados em animais eutróficos e obesos após o período da indução da obesidade e tratamento com citral (n=7). Após um jejum de 8 horas, foi determinada a glicemia basal dos animais e, posteriormente, receberam uma injeção intraperitoneal de insulina Novolin[®] R Penfill[®] (Novo Nordisk, São Paulo, SP, BR) 0,75 U/kg, com ação rápida, sendo repetidas as leituras de glicemia nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90 minutos após a injeção de insulina (VIRTUE & VIDAL-PUIG, 2021).

3.10-Determinação de mecanismos antioxidantes (SOD, CAT)

Na análise da ação antioxidante pelo tratamento preventivo com o citral, na região hipotalâmica em camundongos obesos, foram realizadas a quantificação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e quantificação da enzima catalase (CAT). Para a quantificação da atividade da SOD, as amostras de tecido hipotalâmico foram homogeneizadas em RIPA e Coquetel Inibidor de Protease (PIC)-1%, utilizando um homogeneizador (Polytron PT2100, Kinematica, Malters, CHE) e centrifugadas à 18620 rcf por 45 minutos à 4°C. Foi utilizado o sobrenadante, diluído em tampão fosfato (1:20) e com solução contendo hipoxantina (0,1 mM), xantina oxidase (0,07 U) e o sal azul de nitrotetrazólium (NBT- 0,6 mM). Foi realizada a determinação da absorbância através do espectrofotômetro a 560 nm, 37°C, e os resultados expressos em unidade de SOD/mg de proteína do tecido (WINTERBOURN *et al.*, 1975).

Para a quantificação da CAT, as amostras de tecido hipotalâmico foram homogeneizadas em RIPA e Coquetel Inibidor de Protease (PIC)-1%, utilizando um homogeneizador (Polytron PT2100, Kinematica, Malters, CHE) e centrifugadas à 18620 rcf por 45 minutos à 4°C. Foi utilizado o sobrenadante, diluído em tampão fosfato (1:20). Em 100 µL de tampão foi adicionado metanol, uma solução de Peróxido de Hidrogênio 35,3 mM, Hidróxido de Potássio 10M, Purpald 34,2 mM e Periodato de Potássio 65,2 mM e uma curva com crescentes concentrações de formaldeído 4,24 mM (0-75 µM). Foi realizada a determinação da absorbância através do espectrofotômetro a 540 nm e os resultados expressos em µM/mg de proteína do tecido (AEBI, 1984).

Foi realizado o método de Bradford para quantificar proteínas presentes nas amostras e os resultados foram normalizados pela concentração de proteínas totais (BRADFORD, 1976).

3.11- Expressão Gênica de marcadores inflamatórios (RT-qPCR)

Para avaliar se o tratamento preventivo com o citral possui ação anti-inflamatória no eixo TA-hipotálamo, durante a obesidade e se é capaz de aumentar a citocina anti-inflamatória IL-10 e diminuir a citocina pró-inflamatória IL-6. Foram utilizadas as amostras de TA epididimal dos grupos eutróficos, obesos tratados com veículo e obesos tratados com citral (25, 100 e 300 mg/kg) para determinação da expressão gênica das citocinas IL-10 e IL-6 através da técnica de RT-qPCR. Nas amostras da região do ARC no hipotálamo dos grupos eutróficos, obesos tratados com veículo e obesos tratados com citral (25, 100 e 300 mg/kg) foram usados para determinação da expressão gênica do receptor de adiponectina. O RNA foi extraído do tecido usando Brazol (LGC biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), que posteriormente foi processado para a síntese de cDNA usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). As sequências foram amplificadas usando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O RT-qPCR foi realizado utilizando o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) por aproximadamente 40 ciclos. Os genes endógenos utilizados foram β -actina e GAPDH. Os dados da expressão foram analisados segundo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). As sequências dos primers utilizadas foram:

Genes alvos:	<i>Forward:</i>	<i>Reverse:</i>	Gene ID
IL-6	GGAGCCCAAGAACGAT A	CAGTCTCAATAGCTCCGCCA	16193
IL-10	AAAAGGTGCCACCCTGAAG A	GATGTGGTGGGACCAACCTT	16153
R-adiponectina	ATCTTCCGCATCCACACAGA	TTGGTCTCAGCATCGTCAAG A	72674
β -actina	ATGTGGATCAGCAAGCAGG AG	GGTGTAACCGCAGCTCAGT AAC	11461
GAPDH	CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	CAAATCCGTTACACCGACC	14433

3.12- Quantificação de Adipocinas (ELISA)

As adipocinas, adiponectina e leptina foram dosadas para verificar a ação do tratamento preventivo com o citral sobre estes hormônios em camundongos com obesidade induzida por HFD. Deste modo, foi realizado o imunoensaio, através de ELISA sanduíche no TA epididimal e soro. Primeiramente, o TA foi diluído a 0,5 pg/mL de proteínas. Não houve diluição do soro para a dosagem de leptina, já para a dosagem de adiponectina foi realizada a diluição do soro em 5000x. Assim, foi utilizado o kit Mouse Leptin DuoSet ELISA (DY498) e Mouse Adiponectin/Acrp30 DuoSet ELISA (DY1119) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA). Os kits foram utilizados de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes.

3.13-Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para determinação de normalidade. Dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias para comparação entre três grupos ou mais, seguido do teste de Tukey. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. O valor mínimo de significância estatística considerado foi de $p < 0,05$.

4-Resultados

O tratamento prévio dos animais obesos com citral 300 mg/kg promove atividade anti-obesogênica, por prevenir o aumento da massa corporal de camundongos obesos

Para a análise do efeito do citral sobre a indução de obesidade de camundongos C57BL/6J machos, foi verificada a evolução da massa corporal através de parâmetros como: massa corporal final, ganho de massa corporal e o índice de

adiposidade.

Ao avaliar a evolução da massa corporal dos camundongos, foi possível observar o aumento nos animais que receberam HFD (Figura 3A, Figura 2) a partir do dia 11 e até o final da indução de obesidade em comparação ao grupo DP durante as 17 semanas ($p < 0,05$). Isso demonstra que a dieta rica em lipídeos foi capaz de aumentar a massa corporal dos camundongos C57BL/6J em comparação à dieta normocalórica. Porém, podemos verificar que o grupo de camundongos que recebeu tratamento com o citral na dose de 300 mg/kg apresentou menor massa corporal em relação aos animais obesos que receberam somente o veículo a partir do dia 88 de indução da obesidade ($p < 0,05$). Também podemos evidenciar, na área sob a curva, o perfil do ganho de massa corporal dos diferentes grupos ao longo das 17 semanas de exposição à HFD e à DP. Desta forma, verificamos que os animais que receberam a HFD tiveram uma variação da massa corporal maior que os animais que receberam a DP (Figura 3B, Figura 2). Podemos observar também que os grupos que receberam citral 100 e 300 mg/kg apresentaram um menor ganho de massa corporal em comparação ao controle positivo (DP) ao longo das 17 semanas de indução da obesidade (Figura 3B, Figura 2). A dose de citral 300 mg/kg apresentou uma eficácia na prevenção do aumento no ganho da massa corporal 7,8% maior que a dose de citral 100 mg/kg. Assim, nota-se que o tratamento com citral 300 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento da massa corporal dos camundongos obesos alimentados com HFD durante 17 semanas.



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.

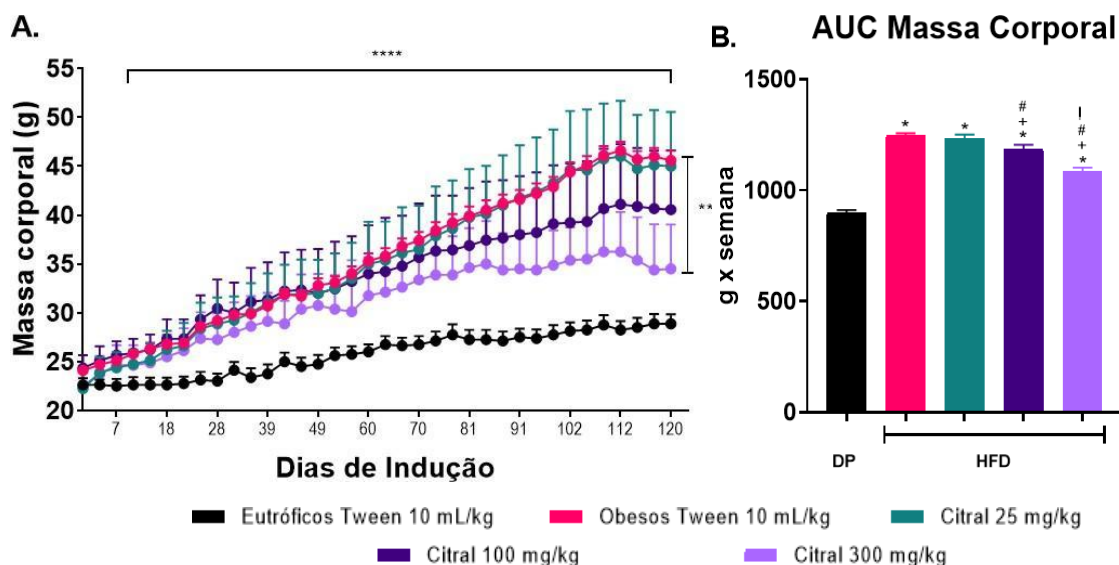


Figura 3. Evolução da massa corporal durante a indução de obesidade em camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. A indução e tratamentos foram introduzidos a partir do dia 0. Ganho de massa corporal ao longo das 17 semanas (A.) e área sob a curva (AUC) (B). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de duas vias e uma via, seguido pelo teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ vs obeso Tween, citral 25 e 100 mg/kg, ** $p < 0,01$ vs obeso Tween e citral 25 mg/kg, * $p < 0,0001$ vs Eutróficos Tween, + $p < 0,0001$ vs Obesos Tween, # vs citral 25, ! vs citral 100. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

Ao final do período de indução e tratamento, os animais que receberam HFD apresentaram um aumento na massa corporal em relação aos animais que receberam DP ($p < 0,0001$) (Tabela 2). Porém, camundongos tratados com citral na dose de 300 mg/kg apresentaram uma massa corporal menor que os animais obesos que receberam somente o veículo ($p < 0,0001$). Também podemos observar que a diferença inicial da massa corporal dos animais que receberam o tratamento com citral 25 mg/kg não afetou o desenvolvimento do experimento, isto porque este grupo apresentou o aumento significativo da massa corporal em comparação aos que receberam DP, sendo o citral, nesta dose, foi incapaz de influenciar na diminuição da massa corporal dos camundongos.

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. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. ** $p < 0,01$ vs Tween e citral 25, * $p < 0,0001$ vs DP, # $p < 0,0001$ vs Tween. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

Parâmetros (g)	Eutróficos	Obesos			
		Tween 10mL/kg	Citral 25mg/kg	Citral 100mg/kg	Citral 300mg/kg
Massa Corporal Inicial	22,30 $\pm$ 0,60	24,10 $\pm$ 0,28	21,90 $\pm$ 0,53**	24,10 $\pm$ 0,46	22,70 $\pm$ 0,42
Massa Corporal Final	28,88 $\pm$ 0,95	45,60 $\pm$ 0,97*	41,70 $\pm$ 2,70*	39,20 $\pm$ 2,26*	35,78 $\pm$ 1,91*#
Ganho de Massa Corporal	6,25 $\pm$ 0,56	21,50 $\pm$ 1,04*	19,63 $\pm$ 3,00*	17,25 $\pm$ 1,76*	13,63 $\pm$ 1,84*#

O tratamento preventivo com citral 300 mg/kg não foi capaz de interferir na massa dos TA e no índice de obesidade em camundongos obesos

Outro parâmetro importante para verificar se houve a instalação da obesidade nos camundongos C57BL/6J é a análise do índice de adiposidade. Com ele é possível verificar que o aumento da massa corporal dos animais foi devido ao aumento da massa dos diferentes TA. Assim, verificamos que ocorreu um aumento significativo deste índice em animais que receberam HFD em comparação à DP (Figura 4). Verifica-se, também, que os animais que receberam a dieta rica em lipídeos apresentaram uma maior massa dos TA epididimal, retroperitoneal e visceral em relação aos animais que receberam a DP (Tabela 3). Confirma-se, assim, a instalação da obesidade nos camundongos C57BL/6J que consumiram a HFD. Contudo, os tratamentos preventivos com as diferentes doses do citral não foram capazes de provocar uma diminuição do índice de adiposidade, assim como, não observamos diferença significativa na massa de TA quando comparados com animais obesos que receberam somente o veículo (Figura 4).

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. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs DP. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica, TA: tecido adiposo.

Parâmetros (g)	Eutróficos	Obesos			
	Tween 10 mL/kg	Tween 10 mL/kg	Citral 25 mg/kg	Citral 100 mg/kg	Citral 300 mg/kg
TA Epididimal	0,487 $\pm$ 0,053	2,454 $\pm$ 0,184*	2,128 $\pm$ 0,464*	2,483 $\pm$ 0,125*	2,253 $\pm$ 0,177*
TA Retroperitoneal	0,080 $\pm$ 0,016	0,787 $\pm$ 0,058*	0,883 $\pm$ 0,200*	0,936 $\pm$ 0,188*	0,754 $\pm$ 0,099*
TA Visceral	0,358 $\pm$ 0,048	0,885 $\pm$ 0,157	1,327 $\pm$ 0,396	1,457 $\pm$ 0,381	0,823 $\pm$ 0,153
TA Total	0,924 $\pm$ 0,098	4,126 $\pm$ 0,198*	3,694 $\pm$ 0,891*	5,014 $\pm$ 0,618*	3,953 $\pm$ 0,365*

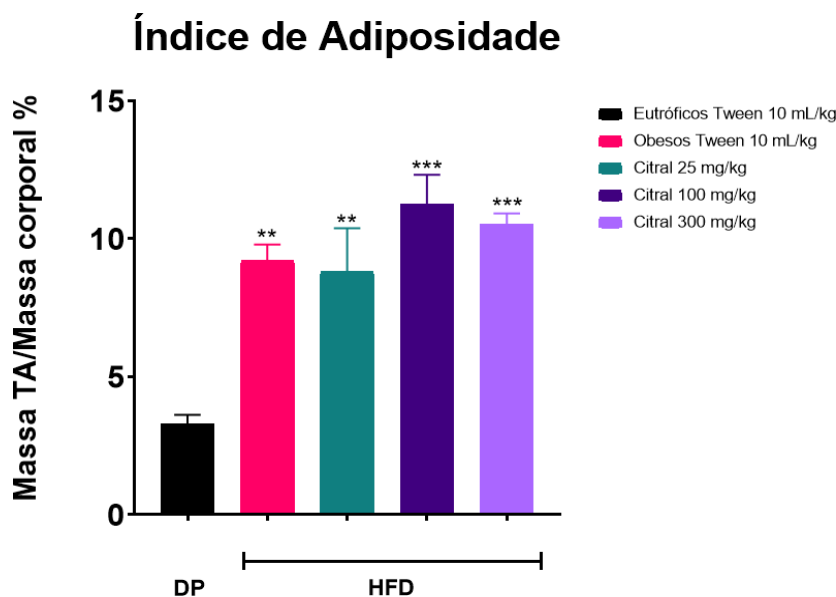


Figura 4. Índice de adiposidade de camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. ***p < 0,01 vs Eutróficos Tween 10mL/kg, **** p < 0,001 vs Eutróficos Tween. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

O tratamento preventivo dos animais obesos com citral 300 mg/kg possui atividade na prevenção do aumento na ingestão calórica dos camundongos obesos

Também analisamos o consumo calórico durante as 17 semanas de indução de obesidade, que está diretamente associado ao aumento da massa corporal e é influenciado pela ingestão de HFD. Observamos que os animais que receberam DP tiveram um menor consumo calórico provenientes de lipídios HFD ($p > 0,05$; Figura 5). E ao longo das semanas, os animais que receberam o tratamento com citral na dose de 300 mg/kg, apresentaram uma menor ingestão calórica proveniente de lipídios em relação aos animais obesos, se intensificando nas últimas cinco semanas de tratamento ($p < 0,05$; Figura 5).

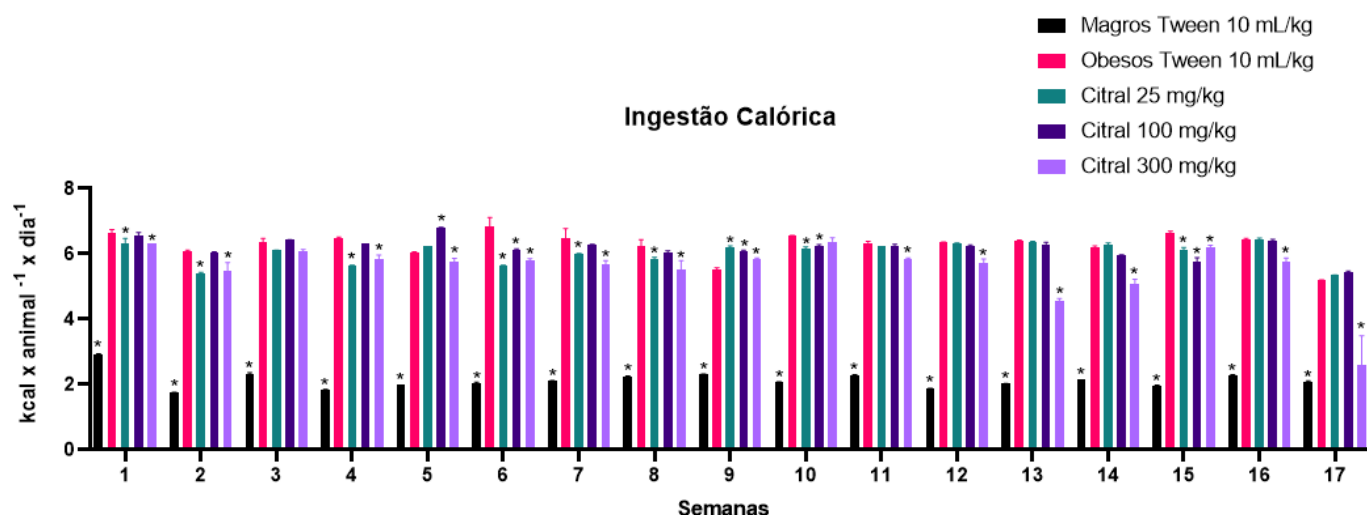


Figura 5. Ingestão Calórica por dia e por animal de camundongos C57BL/6J machos (n= 8-10) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. * $p < 0,01$ vs Obesos Tween. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

O tratamento preventivo com citral durante 17 semanas possivelmente não possui efeito tóxico em camundongos

Devido a oferta de HFD durante 17 semanas, também buscamos analisar a massa total do fígado, baço, rins e coração dos camundongos C57BL/6J, no entanto não observamos diferença significativa dos diferentes tecidos quando comparados ao grupo controle eutrófico (Tabela 4). De maneira semelhante, os tratamentos crônicos com as doses de citral (25, 100 e 300 mg/kg) não causaram qualquer alteração de massa destes órgãos, indicando ausência de um possível efeito tóxico do composto em camundongos C57BL/6J obesos.

Tabela 4. Análise da massa total dos órgãos: fígado, coração, baço e rins 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. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

Parâmetros (g)	Eutróficos	Obesos			
	Tween 10 mL/kg	Tween 10 mL/kg	Citral 25 mg/kg	Citral 100 mg/kg	Citral 300 mg/kg
Fígado	1,201 $\pm$ 0,086	1,761 $\pm$ 0,170	1,108 $\pm$ 0,230	1,571 $\pm$ 0,176	1,524 $\pm$ 0,138
Baço	0,063 $\pm$ 0,006	0,075 $\pm$ 0,002	0,092 $\pm$ 0,010	0,100 $\pm$ 0,015	0,096 $\pm$ 0,015
Rim Esquerdo	0,176 $\pm$ 0,017	0,204 $\pm$ 0,008	0,194 $\pm$ 0,011	0,208 $\pm$ 0,013	0,178 $\pm$ 0,008
Rim Direito	0,186 $\pm$ 0,012	0,206 $\pm$ 0,008	0,175 $\pm$ 0,023	0,224 $\pm$ 0,006	0,184 $\pm$ 0,014
Coração	0,141 $\pm$ 0,011	0,158 $\pm$ 0,003	0,133 $\pm$ 0,009	0,152 $\pm$ 0,008	0,134 $\pm$ 0,004

Tratamento preventivo com citral 300 mg/kg promove a proteção contra o aumento da glicemia basal em camundongos obesos

Após a indução da obesidade nos camundongos C57BL/6J, avaliamos o perfil metabólico da tolerância à glicose após o período de 17 semanas. O TOTG é essencial para analisar a resposta da captação de glicose pelos tecidos na vigência da

obesidade.

Primeiramente, observamos que animais obesos tratados somente com o veículo e os grupos tratados com citral nas doses de 25 e 100 mg/kg apresentaram um nível basal de glicose em jejum maior em relação aos animais eutróficos ($p < 0,01$; Figura 6). Contudo, os animais que receberam o tratamento com o citral 300 mg/kg não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos animais eutróficos.

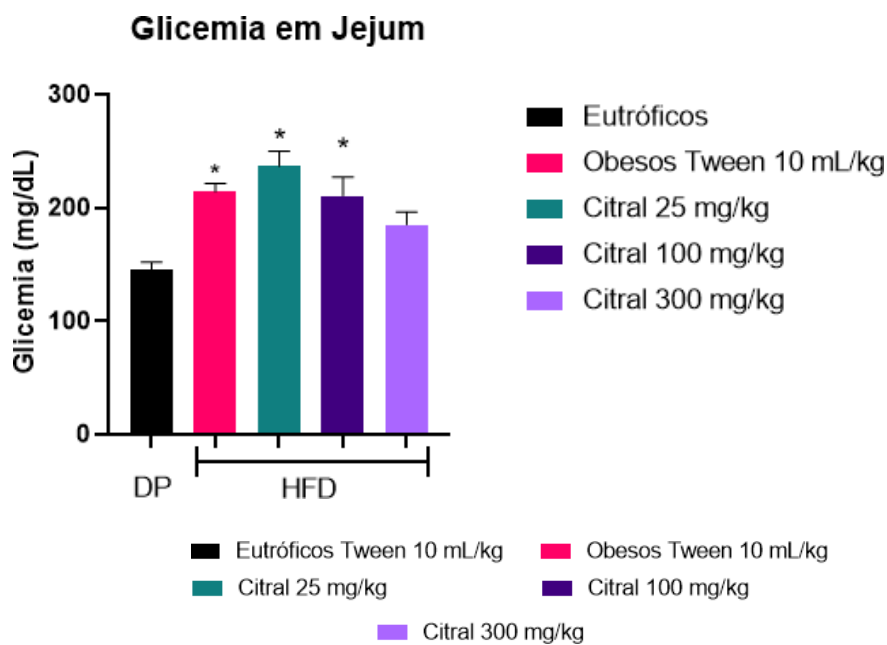


Figura 6. Glicemia em jejum de camundongos C57BL/6J machos ($n = 6-7$) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey. * $p < 0,01$ vs eutróficos.

HFD aumenta a glicemia e o retorno glicêmico dos camundongos obesos

Na análise do TOTG, podemos observar a curva glicêmica (Figura 7A), em que os maiores níveis de glicemia de todos os grupos, acontecem aos 15 e 30 minutos. Aos 60 minutos, a queda da glicemia dos animais eutróficos é maior em relação aos animais que receberam HFD. E aos 120 minutos, houve o retorno dos níveis basais em todos os grupos. Assim, verificamos que nos animais obesos, ocorreu ganho de massa corporal, elevação do índice de adiposidade e aumento da glicemia após a administração oral de glicose em comparação aos animais eutróficos durante todo o experimento.

A área sob a curva (Figura 7B) dos níveis glicêmicos durante o TOTG também foi avaliada, observamos que a variação na glicemia de animais obesos não tratados, foi 39,20% maior em relação aos animais eutróficos, porém não houve uma

diferença estatística neste aumento. Os animais submetidos ao tratamento com as doses de citral 25 e 300 mg/kg apresentaram uma variação glicêmica significativa em relação aos animais eutróficos ($p < 0,05$).

Ao analisar o retorno do nível glicêmico dos camundongos (Figura 8), observamos que os animais obesos tratados com citral nas doses de 25 e 100 mg/kg apresentaram a diferença entre a glicemia basal e no tempo final (120min) maior em relação aos animais eutróficos, porém não houve uma diferença significativa. Os animais tratados com citral 300 mg/kg apresentaram uma menor diferença no retorno glicêmico em relação aos animais obesos, mas também não houve uma diferença significativa (Figura 8).

Com isto, verificamos que os animais obesos induzidos por HFD apresentaram hiperglicemia no estado de jejum e uma velocidade menor ao retorno da glicemia basal. Os diferentes tratamentos com citral não foram capazes de diminuir a glicemia dos camundongos C57BL/6J.

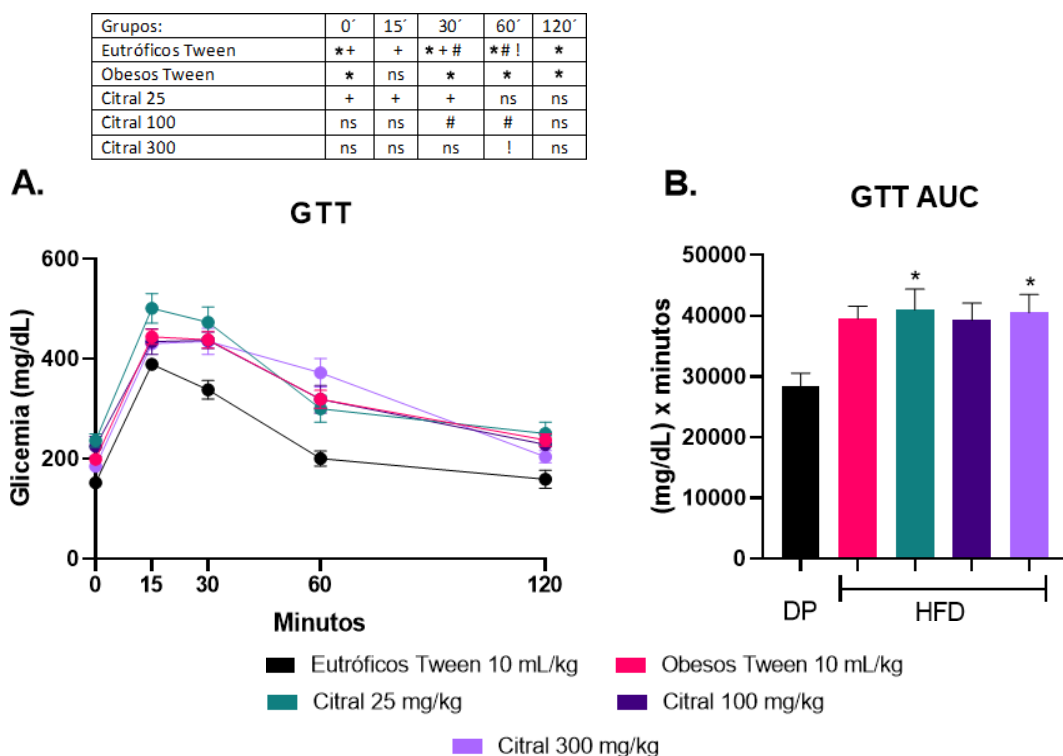


Figura 7. Teste Oral de tolerância à glicose (TOTG) de camundongos C57BL/6J machos ($n = 6-7$) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Curva glicêmica de animais (A) nos minutos 0', 15', 30', 60', 120', e área sob a curva (AUC) do TOTG de todos os grupos experimentais (B). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de duas vias e uma via, seguida do teste de Tukey. $p < 0,05$. B. * $p < 0,05$ vs Eutróficos Tween.

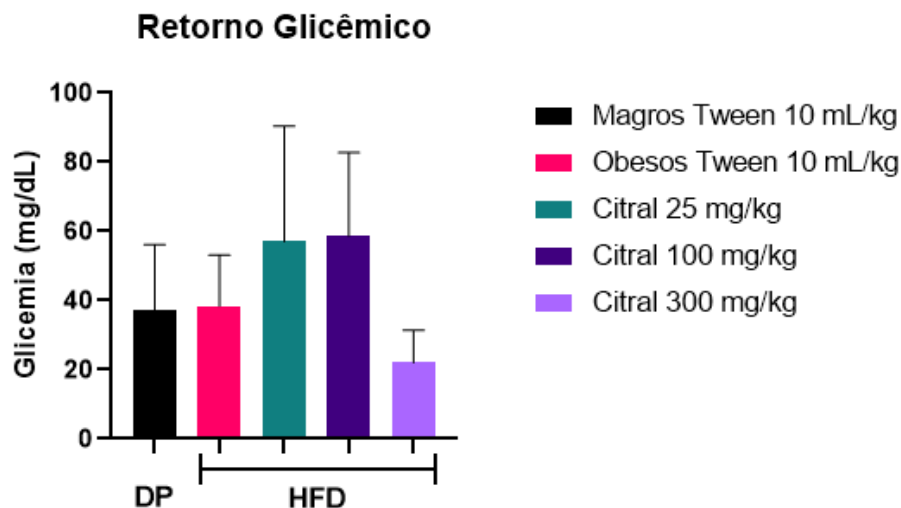


Figura 8. Retorno Glicêmico de camundongos C57BL/6J machos (n= 6-7) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey.* $p < 0,05$ vs Eutróficos Tween.

O tratamento preventivo com citral 300 mg/kg é capaz de prevenir contra a resistência à insulina dos camundongos obesos após a administração de insulina

A obesidade induzida por HFD possui alguma interferência na sensibilidade dos tecidos à insulina, investigada através do TTI. Observamos que ocorreu o decréscimo da glicemia nos minutos 30 e 45, se restabelecendo nos minutos 60 e 90 (Figura 9A). Os animais obesos Tween apresentaram maior glicemia em comparação aos animais eutróficos durante todo o período avaliado (Figura 9A), assim como a variação do nível de glicemia foi maior que a dos animais eutróficos, como visto no gráfico área sob a curva (Figura 9B). Ou seja, a redução dos níveis de glicose periférica nos animais obesos foi menor do que a dos animais eutróficos, o que reitera a instalação da obesidade. Já o tratamento com citral 300 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento, significativamente, da glicemia dos camundongos em comparação aos animais obesos ($p < 0,05$).

Podemos observar também que os animais obesos que receberam somente o veículo ao final de 90 minutos apresentavam uma maior glicemia em relação à glicemia basal (Figura 9A). Já os animais eutróficos e o grupo obeso tratado com citral 300 mg/kg apresentaram uma menor glicemia aos 90 minutos em relação à

glicemia basal (Figura 9A).

Assim, demonstra-se que os animais que foram tratados com citral na dose de 300 mg/kg apresentaram uma resposta semelhante aos animais eutróficos de sensibilidade à insulina.

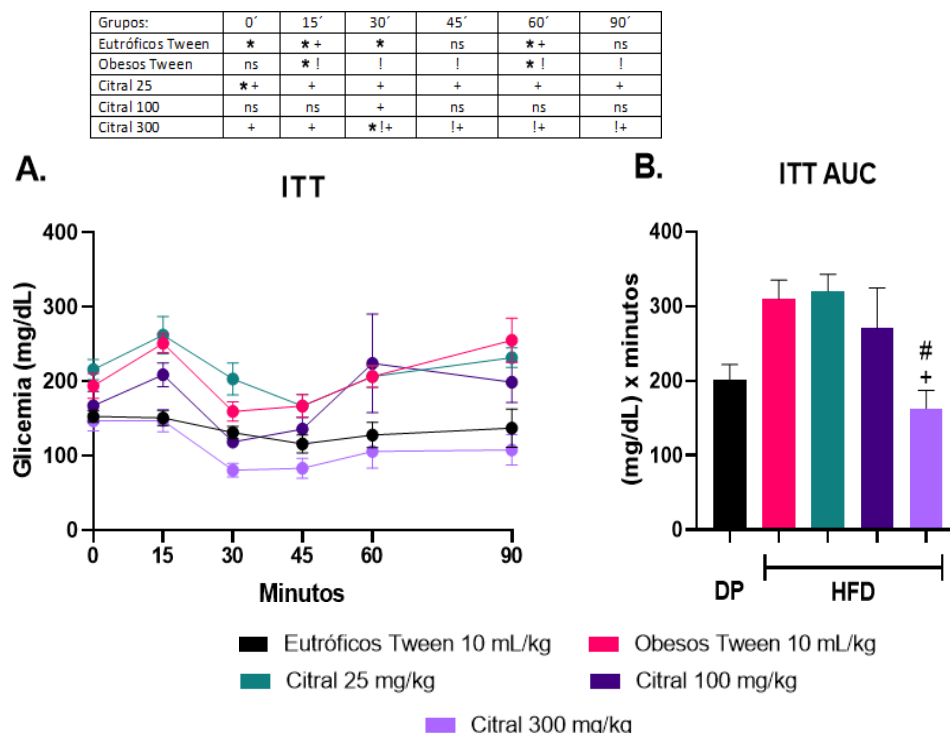


Figura 9. Teste de tolerância à insulina (TTI) de camundongos C57BL/6J machos (n= 6-7) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Curva glicêmica de animais (A), e área sob a curva (AUC) do TTI de todos os grupos experimentais (B). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de duas vias e uma via, seguida do teste de Tukey. $p < 0,05$. B. # $p < 0,05$ vs Obeso Tween; + $p < 0,05$ vs Citral 25 mg/kg.

O tratamento preventivo com a dose de citral 300 mg/kg promove a expressão gênica do mRNA dos mediadores inflamatórios: IL-10 e IL-6, mas não ocorre o aumento dos níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, no TA

Devido ao aumento do TA dos animais que receberam HFD, analisamos a expressão gênica de mediadores inflamatórios que estão envolvidas na regulação de uma resposta imune desse tecido em animais obesos, como as citocinas IL-10 e IL-6 no TA epididimal. Observamos que houve um aumento da expressão gênica da IL-10 do grupo obeso que recebeu citral na dose 300 mg/kg em relação ao grupo obeso que recebeu somente o veículo ($p < 0,05$) e uma diminuição da expressão gênica desta citocina do grupo citral 300 mg/kg em relação aos animais eutróficos ($p < 0,05$) (Figura 10 A). Já a expressão gênica da IL-6 do grupo citral 300 mg/kg foi maior em comparação ao grupo obeso que recebeu veículo e foi menor em comparação ao grupo de animais eutróficos ($p < 0,05$) (Figura 10 B). Com relação a quantificação

de citocinas anti-inflamatórias no TA, verificamos que as citocinas IL-4 e IL-10 no TA epididimal não apresentaram diferença significativa quando comparado entre todos os grupos (Figura 11).

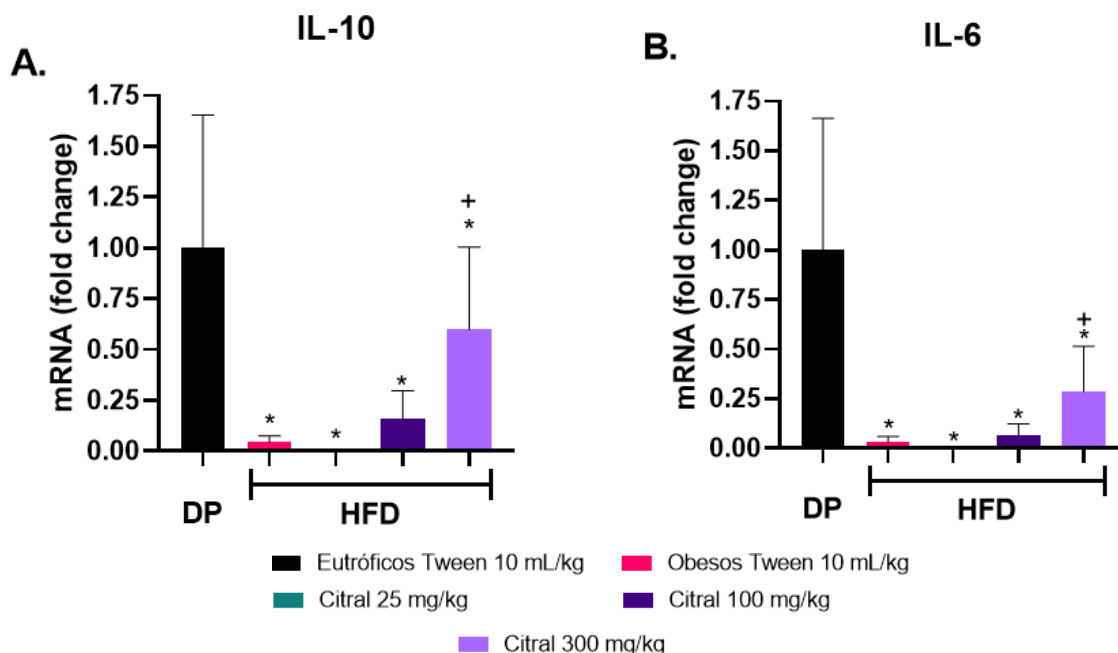


Figura 10. Expressão gênica das citocinas: A. IL-10 e B. IL-6 através de RT-qPCR, no TA epididimal de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. * p < 0,05 vs eutróficos; + p < 0,05 vs obesos. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

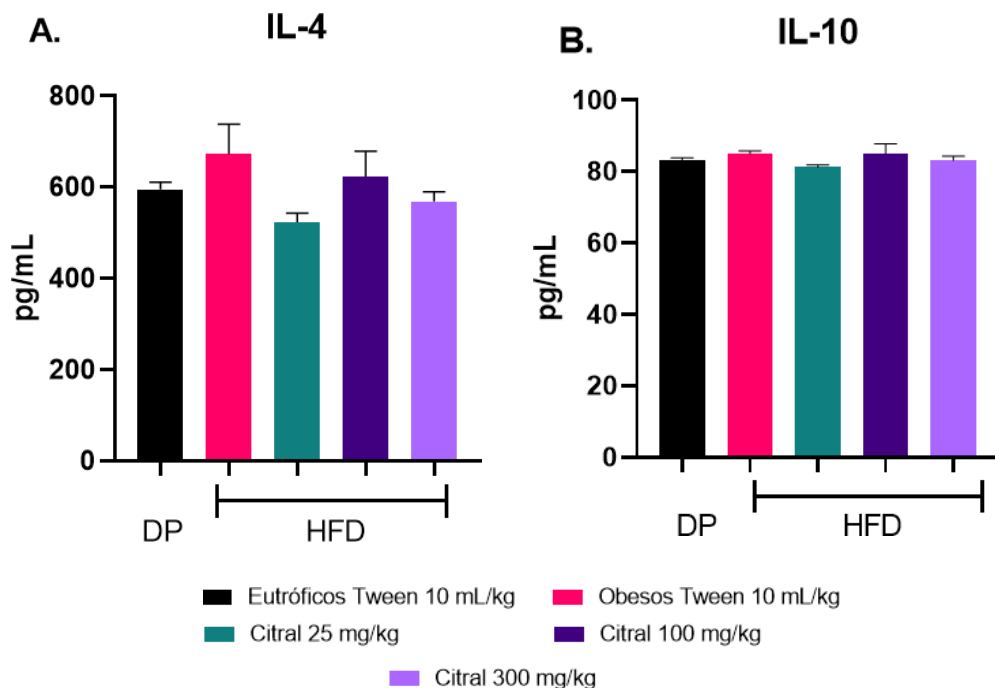


Figura 11. Quantificação de citocinas anti-inflamatórias: A. IL-4 e B. IL-10 através de ensaio Luminex, no TA epididimal de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

O tratamento preventivo com a dose de citral 300 mg/kg não altera a expressão gênica do mRNA do receptor de adiponectina, mas promove o aumento dos níveis da citocina anti-inflamatórias IL-4 no tecido hipotalâmico

No hipotálamo, foi verificada a expressão gênica do receptor de adiponectina. Observa-se que o grupo de animais obesos que receberam tratamento com citral 300 mg/kg tiveram um aumento da expressão do receptor de adiponectina em comparação ao grupo de animais obesos que receberam somente o veículo, porém não houve diferença estatística significativa (Figura 12). Também, no tecido hipotalâmico, houve um aumento dos níveis de IL-4 para o grupo de camundongos que receberam o tratamento com citral 300 mg/kg em relação aos animais eutróficos e aos outros obesos (Figura 13A). E não houve diferença significativa nos níveis da citocina IL-10 entre os diferentes grupos.

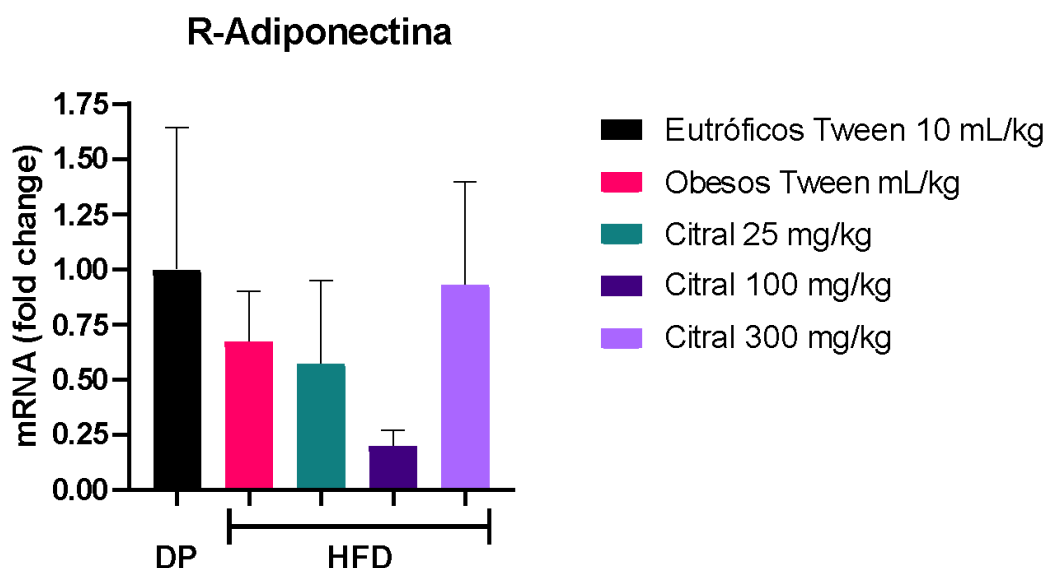


Figura 12. Expressão gênica do receptor de adiponectina, através de RT-qPCR, no tecido hipotalâmico de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica; R-Adiponectina: receptor de adiponectina.

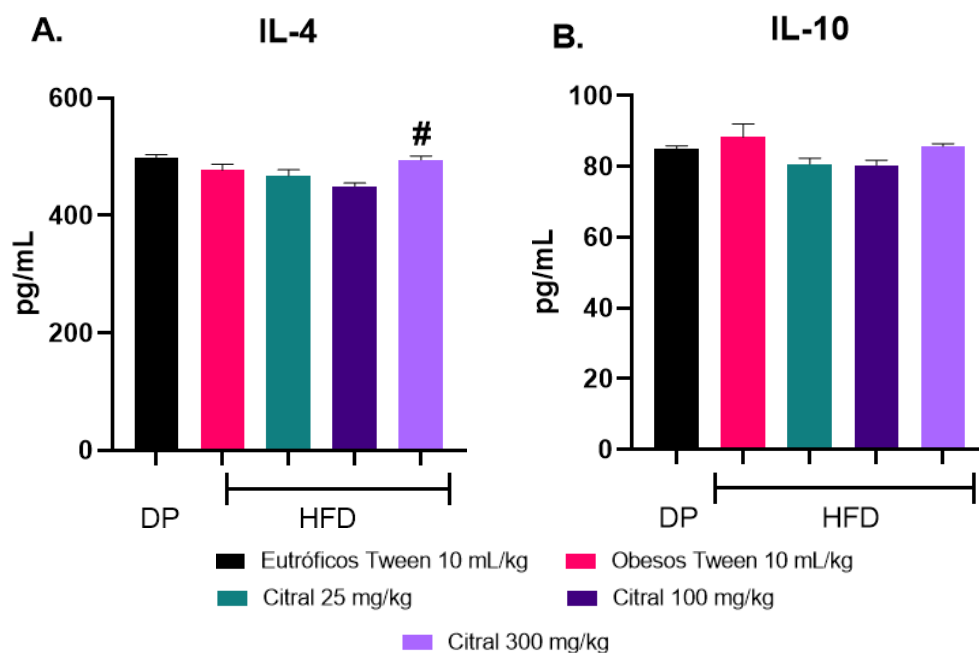


Figura 13. Quantificação de citocinas anti-inflamatórias: A. IL-4 e B. IL-10 através de ensaio Luminex, no tecido hipotalâmico de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. # $p < 0,01$ vs obesos. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

Tratamento preventivo com citral 300 mg/kg suprime a liberação de leptina e estimula a liberação de adiponectina no soro de camundongos obesos

A leptina e a adiponectina são hormônios importantes devido ao seu papel na homeostase energética. Deste modo, verificamos que não houve alteração nas adipocinas leptina e adiponectina no TA epididimal entre os diferentes grupos de tratamentos e dietas (Figura 14 A, B). Mas, quando investigamos os níveis séricos desses hormônios nos animais, verificamos um aumento nos níveis de adiponectina dos animais que receberam o tratamento com citral na dose de 300 mg/kg em relação aos animais eutróficos e obesos que receberam somente o veículo (Figura 14 C). E houve um aumento nos níveis de leptina do grupo obeso que recebeu somente veículo em relação ao grupo eutrófico e ocorreu a diminuição da leptina do grupo tratado com citral 300 mg/kg em relação ao grupo obeso que recebeu veículo (Figura 14 D). Demonstrando que o tratamento preventivo do citral na dose de 300 mg/kg foi capaz de suprimir a liberação da adipocina pró-inflamatória, leptina e estimular a liberação da adipocina anti-inflamatória, adiponectina, no soro dos camundongos C57BL/6J obesos induzidos por HFD.

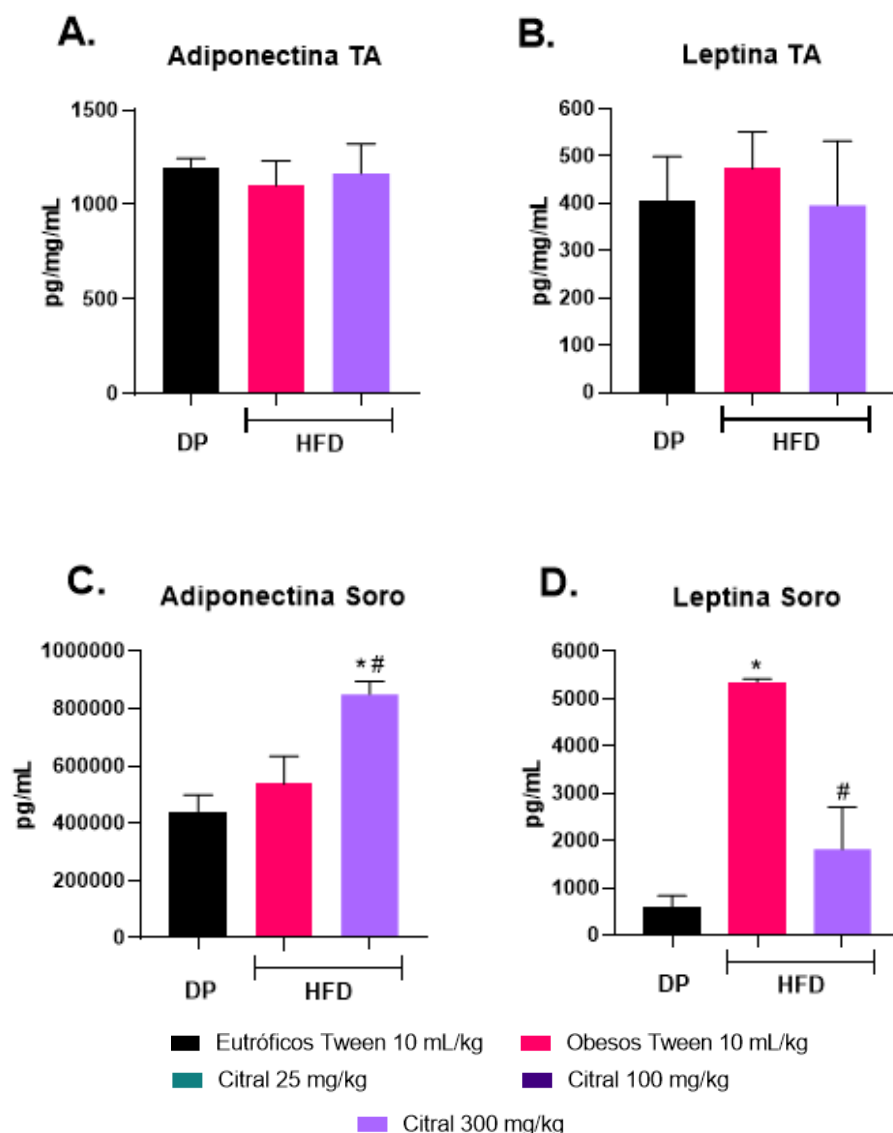


Figura 14. Quantificação das adipocinas anti-inflamatória, adiponectina no TA A. e no soro diluído 5000x C. e pró-inflamatória, leptina, no TA B. e no soro D. de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica. * p < 0,05 vs eutróficos; # p < 0,05 vs obesos tween.

Tratamento preventivo com citral não possui atividade antioxidante no tecido hipotalâmico

Devido ao estresse oxidativo que pode ser causado pela inflamação crônica de baixo grau na obesidade, foram analisados marcadores antioxidantes no tecido hipotalâmico, como a quantificação da CAT e atividade de SOD. Observamos que o grupo de animais obesos que receberam citral 300 mg/kg tiveram uma redução em 15,17% da atividade de SOD e 45,05% dos níveis de CAT, em relação aos animais obesos que receberam veículo, porém não houve uma diferença estatística significativa (Figura 15).

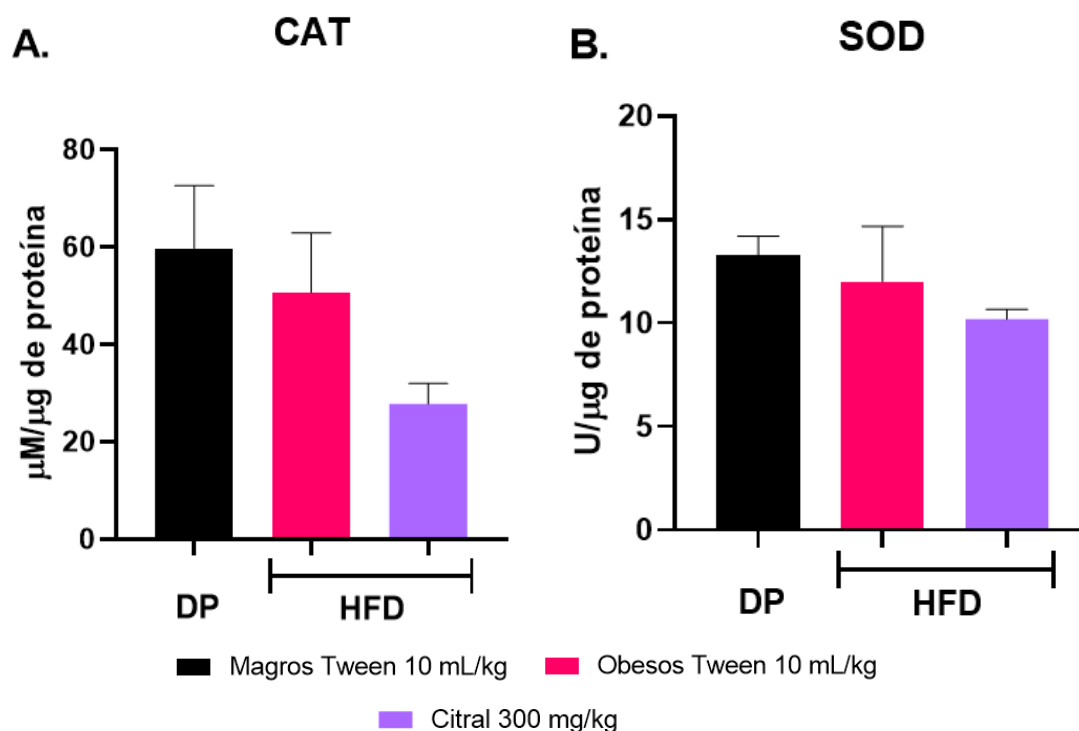


Figura 15. Quantificação de A. CAT e atividade de B. SOD, no tecido hipotalâmico de camundongos C57BL/6J machos (n=5) tratados com Tween 80 a 1% 10 mL/kg e citral (25, 100 e 300 mg/kg) durante 17 semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. DP: dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica.

5-Discussão

Para analisar a obesidade nos camundongos C57BL/6J, foram avaliados alguns parâmetros, como: aumento da massa corporal, índice de adiposidade, ganho de massa corporal e ingestão calórica. Foi observado um aumento da massa corporal dos animais que receberam HFD em relação aos animais eutróficos, assim como o aumento de TA (epididimal, visceral e retroperitoneal), demonstrado por um maior índice de adiposidade em animais obesos quando comparado a animais eutróficos, indicando assim, a instalação da obesidade nos camundongos C57BL/6J durante a oferta de HFD por 17 semanas, assim como demonstrado no trabalho de Zhong e colaboradores (2020).

O TA é de grande importância no armazenamento de energia, possuindo também uma função endócrina na liberação de hormônios e citocinas para o bom funcionamento do organismo (DE BLASIO *et al.*, 2021). Em animais saudáveis, o TA possui atividade na liberação de moléculas importantes na homeostase energética, como leptina e adiponectina que atuam no controle da ingestão alimentar e do gasto energético, além de influenciarem na resposta imunológica e possuírem um importante papel na manutenção da sensibilidade à insulina (KOENEN *et al.*,

2021). Porém, na obesidade, o consumo de nutrientes em excesso conduz a uma expansão do TA, resultado da hiperplasia e hipertrofia que resulta em um grande acúmulo de lipídeos nos adipócitos (CHEN *et al.*, 2022). Essas alterações podem gerar um desequilíbrio na homeostase, ocorrendo a infiltração de macrófagos no TA e causando inflamação (CHEN *et al.*, 2022). Com isto, ocorre o estabelecimento de distúrbios metabólicos causados pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (CHEN *et al.*, 2022).

Diante do aumento da massa corporal em animais obesos, os animais que foram tratados com citral 300 mg/kg apresentaram uma redução na massa corporal, demonstrando que este monoterpene possui uma ação anti-obesogênica. Assim como o trabalho de Sprenger e colaboradores (2022) demonstrou que o tratamento com citral, foi capaz de diminuir o acúmulo lipídico em pré-adipócitos, células 3T3-L1, confirmando a hipótese deste trabalho da atuação do citral na atividade anti-obesogênica.

Foi analisado o TOTG e TTI dos camundongos para verificar se os animais obesos desenvolvem resistência à insulina, um dos marcadores da diabetes *mellitus* do tipo 2 doença associada à obesidade (WONDMKUN, 2020). O TOTG indica a capacidade de preservação da homeostase glicêmica, através da liberação de insulina que atua na inibição da glicogenólise hepática e na captação de glicose pelas células insulino dependentes. O TTI é complementar aos dados de TOTG, pois indica a sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina (GELONEZE & TAMBASCIA, 2006). Através dos testes de TOTG e TTI, foi demonstrado que os animais que receberam HFD, demoraram um maior tempo para retornar à sua glicemia basal e exibiram uma resposta da captação de glicose inferior aos animais eutróficos. Isto demonstra que houve o estabelecimento da resistência à insulina no período estabelecido de tratamento com a dieta. O estudo de He *et al.* (2020), também demonstrou que camundongos C57BL/6J machos apresentaram resistência à insulina sob a oferta da HFD (60% calorias provenientes de lipídios) durante sete e 21 semanas. Isto porque, com o aumento do armazenamento de lipídios no TA dos camundongos C57BL/6J pode resultar em lipotoxicidade, inflamação crônica e alterações neuronais que podem gerar uma resistência à insulina (TONG *et al.*, 2021; SCHOROEDER, 2020).

No entanto, o tratamento dos animais obesos com citral na dose de 300 mg/kg, foi capaz de prevenir o estabelecimento da resistência à insulina em camundongos

C57BL/6J, ao apresentar uma resposta semelhante aos animais eutróficos, e demonstrar um retorno mais rápido à glicemia basal, assim como os animais eutróficos. Indicando assim, uma elevação na sensibilidade à insulina, através da captação de glicose pelos tecidos. Possivelmente, essa resposta pode estar associada ao efeito do citral na dose de 300 mg/kg sobre a inflamação do eixo TA-hipotálamo, atuando na atenuação da secreção de citocinas pró-inflamatórias e leptina e maior liberação de adiponectina, melhorando assim, a sensibilidade da insulina nos tecidos.

Além do hipotálamo ser importante na sinalização da insulina, também é o grande centro de regulação da homeostase energética, responsável pelo controle da saciedade e gasto energético (JAIS & BRUNING, 2017). A ingestão calórica é essencial para observar se houve um desequilíbrio energético dentre os animais alimentados com a dieta rica em lipídeos. Quando ocorre a ingestão de nutrientes, o TA libera a leptina na corrente sanguínea, indicando qual é o estado da reserva energética para o hipotálamo (BEAR *et al.*, 2017; BENOMAR & TAOUIS, 2019). Este hormônio atua ativando os receptores em neurônios anorexígenos e orexígenos, presentes no núcleo arqueado do hipotálamo e a resposta final é saciedade, aumento do metabolismo e diminuição do ganho de massa corporal (REMMERS & DELEMARRE-VAN de WAAL, 2011; SOHN, 2015). Outro hormônio importante na sinalização de neurônios orexígenos e anorexígenos é a adiponectina, que possui uma atividade anti-inflamatória, proporcionando a liberação de citocinas anti-inflamatórias (LEE *et al.*, 2019).

Deste modo, verificamos que o tratamento preventivo com citral na dose de 300 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento da ingestão calórica em animais obesos induzidos por HFD. Isto pode ser explicado, devido à capacidade dessa dose de citral em promover a diminuição nos níveis da leptina. Na obesidade, ocorre uma secreção exacerbada de leptina pelo TA, ocasionando o acúmulo de lipídeos nos adipócitos, que promove a dessensibilização da leptina com o seu receptor, e resulta em um aumento de sua liberação em resposta a uma alta ingestão de lipídios (BENOMAR & TAOUIS, 2019). Assim, esses ácidos graxos acumulados no TA, vão para a corrente sanguínea e atingem a região hipotalâmica, interagindo assim, com TLR4, ocorrendo a ativação da cascata de sinalização do NF- κ B e JNK, produzindo citocinas pró-inflamatórias e instalando-se a inflamação hipotalâmica (SEONG *et al.*, 2019; DIONYSOPOULOU *et al.*, 2021; BENOMAR & TAOUIS, 2019). Quando não ocorre a resolução da inflamação no tecido, o resultado é a apoptose de neurônios

hipotalâmicos (LEE *et al.*, 2020).

Essa diminuição da ingestão calórica nos camundongos obesos, e consequentemente a diminuição da massa corporal desses animais, também pode ser explicada pela capacidade do tratamento preventivo com citral 300 mg/kg em promover o aumento da adipocina anti-inflamatória, adiponectina. Isto é importante na homeostase energética, pois, na obesidade, ocorre uma menor secreção dessa adipocina, prejudicando a resposta de saciedade, pois não ocorre a inibição de neurônios orexígenos e ativação de neurônios anorexígenos (LEE *et al.*, 2019). Além disso, a baixa concentração de adiponectina propicia o desenvolvimento do perfil pró-inflamatório no eixo TA-hipotálamo (LEE *et al.*, 2019). Porém, com a resolução desta inflamação hipotalâmica, devido ao aumento de citocinas anti-inflamatórias e da adiponectina, o controle energético pode voltar aos seus níveis fisiológicos, restaurando assim, o estado de saciedade perante a ingestão de nutrientes (SEONG *et al.*, 2019).

Também, foi possível observar que o tratamento preventivo dos animais com citral na dose de 300 mg/kg, foi capaz de aumentar a citocina anti-inflamatória, IL-4 no tecido hipotalâmico. A IL-4 atua na melhora da resistência à insulina e ingestão alimentar nos camundongos obesos induzidos por HFD. Lin e colaboradores (2020), verificaram que esta citocina anti-inflamatória, teve um papel importante no metabolismo da glicose de camundongos que receberam HFD, sendo capaz de prevenir o aumento da ingestão alimentar, massa corporal dos camundongos e melhora na sensibilidade à insulina. Isto porque a IL-4 pode atuar em macrófagos, induzindo um perfil anti- inflamatório (LIN *et al.*, 2020; LUMENG & SALTIEL, 2011). Em contrapartida, alguns artigos indicam que a IL-4 possui um papel pró-inflamatório, por ativar a micróglia e a cascata de sinalização NF-kB, promovendo a inflamação hipotalâmica (OH-I *et al.*, 2010; CAI & LIU, 2011). Foi possível observar um papel anti-inflamatório do citral sobre o tecido hipotalâmico, pois houve um aumento da citocina IL-4 nesta região. No entanto, este monoterpeno, não possui uma atividade antioxidante sobre este tecido. Não tendo a influência do citral, na resolução de EROs nas células. E os mecanismos antioxidantes podem não ter a influência na resolução das alterações metabólicas pelo citral.

O tratamento preventivo com o citral 300 mg/kg foi capaz de proporcionar o aumento da expressão gênica das citocinas IL-10 e IL-6, no TA. A citocina anti-inflamatória, IL-10 é essencial na resolução do quadro inflamatório, por

promover a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α . Porém, estudos demonstram que essa citocina não possui um papel fundamental na resolução da resistência à insulina, pois ao analisar a resistência à insulina em camundongos C57BL/6J e *knockout* para o gene da citocina IL-10 induzidos com HFD, observaram que a deficiência desta citocina melhorou a resistência à insulina ao contrário do que se esperava (CLEMENTI *et al.*, 2009; DEN BOER *et al.*, 2006). Já a IL-6 é descrita por possuir tanto a atividade pró-inflamatória, como anti-inflamatória e seu papel na obesidade e resistência à insulina é contraditório entre os diferentes estudos. Alguns estudos relatam que essa citocina possui um papel no desenvolvimento da diabetes *mellitus* do tipo 1 e 2 (BRAUNE *et al.*, 2017). Já outros trabalhos relatam sua atividade anti-inflamatória, na obesidade, como seu papel na polarização de macrófagos para o tipo M2 e na prevenção da resistência à insulina. Isto porque, foi observado que camundongos knockout para a citocina IL-6 têm o metabolismo da glicose prejudicado e a inativação da sinalização hepática da IL-6, promove a resistência à insulina (MAUER *et al.*, 2014; WUEEST & KONRAD, 2020). Assim, o citral 300 mg/kg pode ter um papel anti-inflamatório, via IL-6, na prevenção do desenvolvimento da resistência à insulina, na obesidade.

Em síntese, observa-se que o TA secreta hormônios como adiponectina e leptina que interagem com os neurônios hipotalâmicos, criando assim, uma resposta de saciedade ou apetite. Além de ser um tecido de reserva energética, e na obesidade, podendo ocasionar a liberação de ácidos graxos que influenciam na inflamação hipotalâmica. Assim, possivelmente, o tratamento crônico com citral 300 mg/kg atua nesta resolução da inflamação, permitindo a resposta da saciedade em animais que receberam HFD, resultando na prevenção do aumento da ingestão calórica. E como consequência, os animais apresentam a diminuição da massa corporal em relação aos animais obesos. Além do citral atuar na melhora da sensibilidade à insulina. Isto pode ser devido à capacidade deste monoterpene em promover a liberação de adiponectina, suprimir a liberação de leptina e promover o aumento de citocinas anti-inflamatórias. Desta forma, são necessários mais estudos para verificar se o citral é capaz de participar na melhora do quadro inflamatório na obesidade, por via da IL-4 e, se essa citocina tem um papel anti-inflamatório no eixo TA-hipotálamo. Por fim, é necessária a análise da modulação do citral sobre mediadores inflamatórios, como as citocinas pró- inflamatórias, no TA e hipotálamo. Além de verificar a ação do citral na ativação e inibição de neurônios orexígenos e

anorexígenos, para melhores respostas em relação aos efeitos do citral, na obesidade.

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.

7-Disciplinas Cursadas

Disciplina:	Créditos:
Imunomodulação por produtos naturais	6
Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia	6
Biologia Celular	3
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada	2
Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Toxinologia Básica e Aplicada: Biotecnologias de Toxinas Úteis à Saúde Humana e Animal	4
Cultura Celular Animal	3
Prática Pedagógica no Ensino Superior (II): Recursos de Ensino-Aprendizagem	3
Cientista Empreendedor: Soluções Inovadoras para Projetos de Pesquisa	4
Introdução à Bioestatística	2

8-Atividades Desenvolvidas

Eventos

- Unesp Conecta - "Inovação, Empreendedorismo e (Des)construção";
- II Curso/Seminário de TOXINOLOGIA BÁSICA & APLICADA: BIOTECNOLOGIAS DE TOXINAS ÚTEIS À SAÚDE - Campus Virtual Fiocruz;
- Oficina de Matemática: Funções;
- Curso ESIB de Inverno em Dor e Sinalização Intracelular – Butantan;
- “O que você quer ser quando crescer?” Natália Pasternak, Alicia Kowaltowsky e Andrea de Poian;
- Expositora das atividades durante o evento “XIV Venha Conhecer o IB”; Apresentação do trabalho intitulado “Avaliação do citral no eixo tecido adiposo-hipotálamo em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica” no Simpósio Anual do Programa de Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de

Biociências;

- Curso: PCR em tempo real: do zero à análise de dados.

Artigo Publicado

- 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. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4888. <https://doi.org/10.3390/ijms24054888>

Projeto de Extensão

- Diretora do Departamento de Consultoria Social do Centro de Voluntariado Universitário (CVU)-UNESP;
- Monitora no curso de férias "Reprodução de A a Z", como parte das atividades do Programa Universitário "Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico", realizado no Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu, SP) e vinculado à Rede Nacional de Educação e Ciência: Novos Talentos da Rede Pública.

Resumos Publicados

- **Raimundo, P.**; Rodrigues, V.; Emílio-Silva, M.; Gomes, V.G.; Bueno, G.; Machado da Rocha, L.; Hiruma-Lima, C. Is citral's anti-inflammatory action capable of changing the hypothalamic inflammation in obese mice?, in Proceedings of the MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomed., Comput. & Network Science and Engineering, 7th ed., 25 January–30 December 2021, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/mol2net-07-11806;
- Emilio-Silva, M.T.; Zarricueta, M.L.; Rodrigues, V.P.; **Raimundo, P.R.**; da Rocha, L.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 Proceedings of the MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomed., Comput. & Network Science and Engineering, 7th ed., 25 January–30 December 2021, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/mol2net-07-11807
- Fioretto, A.C.; Ohara, R.; Tavares Emílio Silva, M.; Peixoto Rodrigues, V.; Bueno, G.; Assunção, R.; Lima Dario, F.; Gomes, V.; **Romano Raimundo, P.**;

Machado da Rocha, L.R.; Akiko Hiruma-Lima, C. Evaluation of protective effect of citral on gastroesophageal reflux disease in eutrophic and obese mice, in Proceedings of the MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomed., Comput. & Network Science and Engineering, 7th ed., 25 January–30 December 2021, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/mol2net-07-11803

- Peixoto Rodrigues, V.; Emílio-Silva, M.T.; Ohara, R.; Bueno, G.; **Romano Raimundo, P.**; Gomes, V.G.; Machado da Rocha, L.R.; Akiko Hiruma-Lima, C. Citral, a valuable aid against metabolic inflammation?, in Proceedings of the MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomed., Comput. & Network Science and Engineering, 7th ed., 25 January–30 December 2021, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/mol2net-07-11805
- Bueno, G.; Peixoto Rodrigues, V.; Ohara, R.; Tavares Emílio Silva, M.; Assunção, R.; Gomes, V.G.; Lima Dario, F.; **Raimundo Romano, P.**; Fioretto, A.C.; Machado da Rocha, L.R.; 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 Proceedings of the MOL2NET'21, Conference on Molecular, Biomed., Comput. & Network Science and Engineering, 7th ed., 25 January–30 December 2021, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/mol2net-07-11804

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://hvpchemicals.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'Anne, 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 $\text{tnf-}\alpha$ 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

Frigolet, 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-quero-ter-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., Ganey, 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)

ANEXO 1- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À CEUA



Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do citral no eixo tecido adiposo-hipotálamo em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.", protocolada sob o CEUA nº 3547180722 (ID 000454), sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima e equipe; Priscila Romano Raimundo** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 04/11/2022.

We certify that the proposal "Citral's evaluation in the adipose tissue-hypothalamus axis in obese mice induced by a high-fat diet.", utilizing 50 Isogenics mice (50 males), protocol number CEUA 3547180722 (ID 000454), under the responsibility of **Clélia Akiko Hiruma-Lima and team; Priscila Romano Raimundo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University/Biosciences Institute (IBB/UNESP) in the meeting of 11/04/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2022 a 02/2023 Área: Ciências Biológicas

Origem: CEMIB - UNICAMP

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

idade: 4 a 6 semanas

Quantidade: 50

Linagem: C57BL/6J

Peso: 25 a 30 g

Botucatu, 10 de abril de 2023



Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

