

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

AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
CITRAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6J ADULTOS MACHOS
OBESOS

MARIA LUIZA ALVES AQUINO
PROF. TIT. CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA

MARIA LUIZA ALVES AQUINO

AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO CITRAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6J ADULTOS MACHOS OBESOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biotecnologia, Campus de
Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel
em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof. Tit. Clelia Akiko Hiruma
Lima

**BOTUCATU – SP
2025**

A657a

Aquino, Maria Luiza Alves

Ação antinociceptiva e anti-inflamatória do citral em camundongos C57BL/6J adultos machos obesos/ Maria Luiza Alves Aquino. -- Botucatu, 2025

33 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Clelia Akiko Hiruma-Lima

1. Camundongo. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Nocicepção. 4. Inflamação. 5. Citral. I. Título.

MARIA LUIZA ALVES AQUINO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO CITRAL EM CAMUNDONGOS C57BL/6J
ADULTOS MACHOS OBESOS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado
a Universidade Estadual Paulista, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Bacharel, do curso de Graduação em Ciências
Biomédicas.

Botucatu, 8 de julho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Tit. Clelia Akiko Hiruma Lima
Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Documento assinado digitalmente

CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA

Data: 28/07/2025 09:21:52-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Data: 25/07/2025 19:49:26-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Ass. Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP



Documento assinado digitalmente

ALANA REZENDE GODOI REBESCHINI

Data: 25/07/2025 16:20:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Alana Rezende Godoi Rebeschini
Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, é imensurável o quanto eu sou grata aos meus pais, cujo papel foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Agradeço por me guiarem, me acompanharem, torcerem por mim a cada conquista e, mais especialmente, me acolherem a cada dificuldade com o cuidado e todo o carinho que sempre recebi ao longo da vida. Sem vocês como inspiração e torcida, eu não teria chegado tão longe.

Agradeço também aos meus familiares, minha avó, minha tia, meu irmão e à minha prima, que mesmo de longe, sempre estiveram lá, e eu sei que sempre estarão. Sou grata por todo o apoio, todas as vivências, todas as maratonas de filmes, jogos de futebol e todos os momentos que passamos juntos.

Um agradecimento especial às minhas amigas e colegas de república. Elas foram as primeiras a me acolher durante o tormento da cidade nova, início de faculdade e pandemia, me ensinaram como viver e me mostraram como é possível formar uma segunda família longe de casa. Toda e cada geração da República Gritaria que acompanhei foi marcante de sua maneira única e eu sou eternamente grata por tudo que vivi sendo parte disso.

Agradeço também à minha amiga Leilane, minha primeira amiga da Biomed e irmã litorânea, que não soltou minha mão em momento algum durante todos os anos de graduação. Sou grata por todo o apoio, todos os cafezinhos, todo o acolhimento nos momentos difíceis e todas as vezes que nos encontramos por querer ou por acaso pelo campus.

Sou grata também por meus colegas de laboratório: Felipinho, Renata, Maycon, Felipe, Garboso, Laura, Mari e Isa. Não posso colocar em palavras o quanto conhecê-los foi importante para mim e para todo meu crescimento como pessoa e futura pesquisadora. Por todos os puxões de orelha, todas as jantinhas, as conversas sinceras, as piadas de tio e os singelos berros carinhosos, eu agradeço de verdade.

Agradeço também a minha orientadora, Clelia, que me surpreendeu ao se mostrar como uma orientadora presente, que acolhe, que se preocupa com os detalhes, e que ao mesmo tempo te incentiva a expandir seus horizontes com aspiração, responsabilidade e independência. Não poderia ter escolhido melhor para me orientar também na próxima etapa.

Agradeço ao CNPq e a reitoria da UNESP pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

A obesidade é condição complexa relacionada a um quadro inflamatório crônico e sistêmico, e vem se mostrando cada vez mais alarmante dado sua crescente incidência e sua relação com graves comorbidades como a dor crônica, que atinge diretamente a qualidade de vida da população. Atualmente, buscam-se formas terapêuticas alternativas aos fármacos anti-inflamatórios, considerando os efeitos adversos graves e potencialmente fatais decorrentes de seu uso contínuo. O citral é um monoterpene com efeitos analgésicos e anti-inflamatórios amplamente estudados. A partir disso, este trabalho avaliou o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do citral em camundongos adultos machos C57BL/6J obesos. Os animais (CEUA nº 6856030723) foram divididos em dois grupos, um alimentado com dieta padrão (SD) (n = 65) e outro alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) (n = 71) por 12 semanas. A evolução da massa corporal desses animais foi avaliada semanalmente e a indução da obesidade no grupo HFD foi comprovada com um teste de tolerância oral à glicose (OGTT). O teste de nocicepção induzido por formalina foi conduzido para avaliar a nocicepção nos animais tratados com citral (100 mg/kg ou 300 mg/kg), veículo (1% Tween 80, 10 mL/kg) ou morfina (5 mg/kg), observando a nocicepção nas fases de dor neurogênica (0-5 min) e de dor inflamatória (15-30 min). O teste da placa quente foi realizado para avaliar a nocicepção térmica nos animais. Para avaliação da atividade anti-edematogênica do citral, o teste de edema de pata foi realizado com injeção intraplantar de carragenina 5% ou salina 0,9% na pata traseira direita nos animais tratados com citral, veículo e Piroxicam (30 mg/kg) ou salina 0,9% na pata contralateral para controle do volume em todos os grupos. O volume das patas foi obtido por um pletismômetro digital em 1h, 2h, 3h, 4h e 6h após injeção de carragenina. Ao final, os animais foram eutanasiados e foram coletadas as patas para aferição do volume de edema e avaliação dos parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. O grupo HFD apresentou massa corporal significativamente maior em comparação com o grupo SD a partir da metade da primeira semana da introdução da dieta e, ao fim da 12ª semana, a média de massa corporal foi quatro vezes maior nos animais HFD, em relação aos animais SD. No OGTT, observou-se que o nível glicêmico foi mais elevado no grupo HFD em relação ao grupo SD, evidenciado pela diferença significativa das áreas sob as curvas de glicemia. Diante da injeção de formalina, observou-se redução significativa da resposta nociceptiva no grupo tratado com citral 300 mg/kg comparado ao grupo veículo. Além disso, o tratamento dos animais com citral 300 mg/kg resultou em efeito antinociceptivo mais pronunciado no grupo HFD, em comparação com SD. Não foi observada diferença significativa nos testes da placa quente e de edema induzido por carragenina após tratamento com citral em qualquer um dos grupos de dieta, assim como não houve diferença significativa nos marcadores de estresse oxidativo na pata dos animais. Em conclusão, o tratamento com citral não produziu efeito antiedematogênico ou antinociceptivo frente à estímulo térmico nos modelos selecionados para este trabalho, entretanto foi eficiente na antinocicepção frente à estímulo químico tanto na fase de dor neurogênica, quanto na fase inflamatória do teste, quando comparado ao tratamento com veículo. Além disso, este efeito antinociceptivo foi mais pronunciado em animais alimentados com HFD do que SD. Esses achados sugerem o citral como potencial terapêutico na modulação da dor, alternativo aos fármacos atuais, e reforçam a importância da investigação acerca de seus mecanismos de ação no contexto da dor na obesidade.

Palavras-chave: Camundongo; Dieta hiperlipídica; Nocicepção; Inflamação; Citral

ABSTRACT

Obesity is a complex condition related to chronic and systemic inflammation, and it is becoming increasingly alarming given its growing incidence and its relationship with serious comorbidities such as chronic pain, which directly affects the quality of life of the population. Currently, alternative therapies to anti-inflammatory drugs are being sought, considering the serious and potentially fatal adverse effects resulting from their continuous use. Citral is a monoterpene with widely studied analgesic and anti-inflammatory effects. Based on this, this study evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory effects of citral in obese adult male C57BL/6J mice. The animals (CEUA No. 6856030723) were divided into two groups, one fed a standard diet (SD) (n = 65) and the other fed a high-fat diet (HFD) (n = 71) for 12 weeks. The evolution of the body mass of these animals was evaluated weekly, and the induction of obesity in the HFD group was confirmed with an oral glucose tolerance test (OGTT). The formalin-induced nociception test was conducted to evaluate nociception in animals treated with citral (100 mg/kg or 300 mg/kg), vehicle (1% Tween 80, 10 mL/kg) or morphine (5 mg/kg), observing nociception in the neurogenic pain (0-5 min) and inflammatory pain (15-30 min) phases. The hot plate test was performed to assess thermal nociception in the animals. To evaluate the anti-edematogenic activity of citral, the paw edema test was performed with intraplantar injection of 5% carrageenan or 0.9% saline in the right hind paw in animals treated with citral, vehicle, and Piroxicam (30 mg/kg) or 0.9% saline in the contralateral paw to control the volume in all groups. The volume of the paws was obtained by a digital plethysmometer at 1h, 2h, 3h, 4h, and 6h after carrageenan injection. At the end, the animals were euthanized, and the paws were collected to measure the volume of edema and evaluate inflammatory and oxidative stress parameters. The HFD group had significantly higher body mass compared to the SD group from the middle of the first week of diet introduction, and at the end of the 12th week, the average body mass was four times higher in HFD animals than in SD animals. In the OGTT, it was observed that the glycemic level was higher in the HFD group compared to the SD group, evidenced by the significant difference in the areas under the glycemic curves. Upon formalin injection, a significant reduction in the nociceptive response was observed in the group treated with 300 mg/kg citral compared to the vehicle group. In addition, treatment of animals with citral 300 mg/kg resulted in a more pronounced antinociceptive effect in the HFD group compared to SD. No significant difference was observed in the hot plate and carrageenan-induced edema tests after treatment with citral in any of the diet groups, nor was there a significant difference in oxidative stress markers in the animals' paws. In conclusion, treatment with citral did not produce an anti-edematogenic or antinociceptive effect against thermal stimulation in the models selected for this study, but it was effective in antinociception against chemical stimulation in both the neurogenic pain phase and the inflammatory phase of the test, when compared to treatment with vehicle. In addition, this antinociceptive effect was more pronounced in animals fed HFD than SD. These findings suggest citral as a potential therapeutic agent in pain modulation, alternative to current drugs, and reinforce the importance of investigating its mechanisms of action in the context of pain in obesity.

Keywords: Mice; High-fat diet; Nociception; Inflammation; Citral

SUMÁRIO

1	Introdução	9
1.1	Obesidade e metainflamação	9
1.2	Dor	10
1.3	Citral	12
2	Metodologia	13
2.1	Animais.....	13
2.2	Dieta hiperlipídica e indução da obesidade	14
2.3	Teste de tolerância oral à glicose	14
2.4	Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do citral.....	14
2.4.1	Nocicepção induzida por formalina.....	14
2.4.2	Nocicepção induzida por estímulo térmica quente - placa quente	15
2.4.3	Edema de pata induzida por λ -carragenina.....	15
2.5	Avaliação de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo da pata	16
2.5.1	Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	16
2.5.2	Quantificação de nitrito	16
2.6	Análise dos resultados	17
3	Resultados	17
4	Discussão.....	24
5	Conclusão	29
6	Referências bibliográficas	30

1 Introdução

1.1 Obesidade e metainflamação

A obesidade é uma doença crônica complexa e uma pauta constante no Brasil e no mundo. A Organização Mundial de Saúde destacou o aumento em mais de duas vezes da sua prevalência no mundo entre os anos de 1990 e 2022 (OPAS, 2024). No Brasil, é epidêmica e atingiu mais de 30% da população adulta em 2025 (SISVAN, 2025). Além disso, essa doença é fator de risco para o desenvolvimento de outros distúrbios severos como diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão, câncer e doenças coronárias. Esta última lidera o *ranking* de causas de morte no Brasil (SVSA/MS, 2025). Sendo assim, é uma doença que interfere diretamente na qualidade de vida. Essa condição é definida como um acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal com potencial de romper com o bem-estar e a saúde de um indivíduo, derivada principalmente de um desbalanço entre o consumo e gasto de calorias, com influência de fatores ambientais e genéticos (WHO, 2025).

Os adipócitos, principais células do tecido adiposo, são importantes para o processamento e armazenamento de lipídios, bem como o metabolismo energético, inflamação e homeostase (Barazzoni et al., 2018). Em estado fisiológico, os adipócitos secretam principalmente as citocinas anti-inflamatórias e protetivas, como interleucina (IL)-10 e IL-4. Quando há excesso no consumo de calorias e, conseqüentemente, um acúmulo excessivo de lipídeos, os adipócitos se tornam hipertróficos e disfuncionais, o que pode eventualmente causar dano celular e levar à apoptose. Esse dano tecidual gera uma resposta inflamatória local com infiltração de macrófagos M1, pró-inflamatórios, e mais tarde, neutrófilos. Além disso, os adipócitos e células imunológicas residentes passam a secretar citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-1 β , proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, IL-6 e óxido nítrico (Kawai; Autieri; Scalia, 2021). Esta resposta inflamatória progride de maneira gradual através da ativação de cascatas de sinalização, como a via da quinase inibidora de κ (IKK)/fator nuclear (NF) κ B, e resulta no estabelecimento de um microambiente favorável à inflamação crônica, que ativa e atrai células NK e linfócitos T CD8+/CD4. Ademais, a secreção dos mediadores pró-inflamatórios impacta outros órgãos como fígado, pâncreas, cérebro e músculo, sendo assim, o estado inflamatório se instala sistemicamente, uma metainflamação, caracterizada por ser crônica e de baixo grau (Da Cruz Fernandes et al., 2018; Gregor; Hotamisligil, 2011; Shoelson; Lee; Goldfine, 2006).

1.2 Dor e edema

A dor e edema representam dois dos cinco sinais cardinais da inflamação, sendo eles: rubor, tumor (edema), calor (febre), dor e perda de função. A dor pode ser classificada de acordo com a natureza do estímulo, e dois tipos de dor foram abordados neste trabalho. O primeiro é denominado dor nociceptiva, sentida quando um estímulo ambiental potencialmente nocivo é detectado, como calor e frio excessivo, perfurocortantes ou agentes químicos, a fim de proteger o organismo de lesões teciduais. O segundo, também com função protetiva, é a chamada dor inflamatória, decorrente da sensibilização dos neurônios nociceptores por mediadores pró-inflamatórios a fim de evitar contato ou movimento na região durante o processo de cicatrização (Araujo *et al.*, 2020; Woolf, 2010). Quando ocorre lesão tecidual propriamente dita, moléculas endógenas denominadas padrões moleculares associados a dano (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs), são liberadas pelas células danificadas. Os DAMPs se ligam aos receptores de reconhecimento de padrões como o receptor *toll-like* 4 (TLR4) presentes nas células imunes residentes do tecido lesionado, como macrófagos e mastócitos, e levam a produção e liberação de substâncias como histamina e prostaglandinas (PG) (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015). A histamina é uma amina vasoativa e exerce função no aumento da permeabilidade vascular em resposta a estímulos como trauma e lesão com a finalidade de recrutar células imunes efetoras para o local lesionado e induzir a resposta inflamatória. Este aumento da permeabilidade vascular resulta no acúmulo de líquido contendo proteínas plasmáticas e restos celulares, que é caracterizado como edema (Kumar; Abbas; Aster, 2023; Yam *et al.*, 2018).

As prostaglandinas (PG), como a PGE₂, têm função fisiológica constitutiva bem como patológica na febre, sensação dolorosa e inflamação (Kawahara *et al.*, 2015). A PGE₂ é produzida por uma enzima específica denominada ciclo-oxigenase (COX). Desta enzima, são encontradas, principalmente, duas isoformas funcionais no organismo, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente pelo organismo, exercendo funções homeostáticas incluindo manutenção da mucosa gástrica e fluxo sanguíneo renal. A COX-2 tem expressão induzida por lesão tecidual e age na manutenção do estado inflamatório, principalmente na dor. A PGE₂ participa na resposta nociceptiva sensibilizando as terminações dos neurônios aferentes primários, produzindo uma resposta de dor exacerbada frente a estímulos denominada hiperalgesia (Cashman, 1996; Simon, 1999). Além das moléculas supracitadas, o reconhecimento das DAMPs pelas células imunes também leva a produção e liberação de TNF- α e IL-1 β , que provocam uma cascata de sinalização, envolvendo a ativação de NF κ B que

culmina para uma resposta inflamatória aguda em poucos instantes após a injúria (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015; Swanson; Deng; Ting, 2019).

A obesidade já foi associada com a dor crônica por vários autores na literatura. Acreditava-se que a dor crônica observada na população com obesidade fosse decorrente principalmente do estresse mecânico que o excesso de peso ocasiona, mas ao longo dos anos a influência de diversos fatores genéticos, endócrinos e metabólicos foi elucidada. Em um estudo populacional em adultos de meia-idade nos Estados Unidos, de Stokes e colaboradores (2020) apontaram a relação entre o ganho de peso e obesidade com o aumento na tendência de dor severa e/ou limitante entre os anos 1992 e 2016. Foi apontado que pessoas com obesidade apresentaram maior prevalência de dor, bem como se mostraram mais sensíveis a diferentes estímulos dolorosos (Chin et al., 2020; Okifuji; Hare, 2015). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, e TNF- α , liberadas pelos adipócitos e macrófagos em meio ao estado inflamatório sistêmico de baixo grau que a obesidade representa, foram relacionadas com o processo da dor crônica e aguda na literatura (Chin et al., 2020; Zhang; An, 2007). Tian e colaboradores (2018) evidenciaram o aumento dos comportamentos referentes a nocicepção associada à fibromialgia em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) e enfatizaram a importância do TNF- α nessa resposta ao utilizar camundongos *knock-out* para o gene codificador do receptor de TNF- α . Em outro estudo de resposta de nocicepção em camundongo com obesidade induzida por HFD, em modelo de osteoartrite, além da hiperalgesia mecânica e térmica, foi observado aumento nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, e redução nos níveis de IL-10 nos grupos obesos, com ênfase para o grupo obeso com osteoartrite, evidenciando como a obesidade é capaz de exacerbar processos inflamatórios (Tamborena Malheiros et al., 2023).

A terapia para dor e edema associados a inflamação consiste no uso dos analgésicos e anti-inflamatórios. No mercado atual, estão disponíveis os analgésicos opioides e não-opioides (Milani; Davis, 2024). Os opioides são medicamentos com similaridade estrutural ao ópio, um produto natural extraído de uma espécie de papoula (*Papaver somniferum*), sendo o principal da classe a morfina (Trescot et al., 2008). Estes são prescritos para diferentes tipos de dor incluindo dor aguda e crônica e dor associada a câncer e seu uso prolongado pode gerar dependência química e tolerância (Dowell, 2022; Trescot, 2016). Dentre os fármacos não-opioides, estão os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e corticosteroides, amplamente utilizados para tratamento de dor aguda e crônica de origem inflamatória, assim como processos inflamatórios em geral. Os efeitos adversos decorrentes do uso contínuo destes

medicamentos são alarmantes e incluem úlceras gástricas, hipertensão, hepatotoxicidade, osteoporose e risco aumentado para infecções (Hodgens; Sharman, 2024; Kapugi; Cunningham, 2019; Milani; Davis, 2024; Munir; Enany; Zhang, 2007).

Estudos e pesquisas têm sido conduzidos com a finalidade de buscar terapêuticas alternativas que promovam um tratamento mais seguro e eficaz para a dor e inflamação e assegurem a qualidade de vida da população. Produtos naturais, como o citral, estão sendo cada vez mais explorados como possíveis novos tratamentos (Rishton, 2008).

1.3 Citral

O citral é um monoterpenoide abundante no óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus*), mas também presente em outras plantas como o gengibre (*Zingiber officinale*). Já é amplamente utilizado na indústria farmacêutica como aditivo alimentício ou fragrância pelo seu característico odor cítrico. Além disso, vem sendo amplamente estudado por suas comprovadas propriedades antissépticas, antipiréticas e sedativas e diversos estudos já demonstraram suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias, antiproliferativas, antioxidantes, anti-inflamatórias e analgésicas (Barbosa et al., 2008; Gutiérrez-Pacheco et al., 2023; Nishijima et al., 2014; PubChem, 2025). Em modelo de nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina utilizando camundongos *Swiss*, o citral reduziu a nocicepção tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória, causado por sua ação inibitória sobre citocinas pró-inflamatórias (Nishijima et al., 2014). Além disso, o citral demonstrou inibir a inflamação induzida, tanto por λ -carragenina, quanto por LPS, duas substâncias indutoras de edema através da liberação de citocinas e EROs (Gonçalves et al., 2020). Em ensaio *in vitro* com macrófagos RAW 264.7, o citral apresentou ainda efeito antioxidante ao inibir a atividade da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), isoforma da enzima catalisadora da produção do óxido nítrico, presente em macrófagos. Esta isoforma é ativada frente a estímulos como LPS e TNF- α e tem função inflamatória, diferente das isoformas expressas constitutivamente (cNOS) (Lin et al., 2008).

Poucos estudos foram realizados para avaliar os efeitos antinociceptivo e antiedematogênico do citral diferenciais na obesidade. Considerando a natureza inflamatória e emergente da doença, é de suma importância que haja a busca por terapêuticas naturais e eficientes para aprimorar a qualidade de vida da população atingida por essa condição, tomando como alvo a dor e os

processos inflamatórios exacerbados envolvidos, algumas das afecções que prejudicam essa qualidade de vida diretamente.

2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do citral sobre a hiperalgesia e o edema de pata na obesidade induzida por dieta hiperlipídica (HFD) em camundongos C57BL/6J machos adultos.

2.1 Objetivos Específicos

- Comparar a resposta nociceptiva basal entre camundongos eutróficos e obesos;
- Avaliar e comparar o efeito antinociceptivo do citral diante de estímulo de injeção intraplantar de formalina em camundongos eutróficos e obesos;
- Avaliar e comparar o efeito antinociceptivo do citral diante de estímulo térmico quente em camundongos eutróficos e obesos;
- Avaliar e comparar o efeito anti-inflamatório do citral sobre o edema de pata induzida por injeção intraplantar de λ -carragenina em camundongos eutróficos e obesos;
- Quantificar e/ou avaliar os parâmetros de estresse oxidativo nas amostras de pata dos camundongos eutróficos e obesos.

3 Metodologia

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos ($n = 115$), com quatro a seis semanas de idade, obtidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB/UNICAMP. Foram aclimatados por sete dias antes dos experimentos sob condições padronizadas de temperatura ($27 \pm 2^\circ \text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram ao protocolo experimental

aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal/UNESP sob nº 6856030723 (Anexo 1).

3.2 Dieta hiperlipídica e indução da obesidade

Os animais com seis semanas de idade foram divididos em dois grupos de acordo com a dieta com a qual foram alimentados: grupo denominado de eutrófico, que recebeu dieta padrão ou *standard diet* (SD, 15% de lipídios como fonte calórica - Presence®), e grupo denominado de obeso, que recebeu dieta com alto teor de lipídeos ou *high-fat diet* (HFD, 60% de lipídios como fonte calórica). Ao final, os animais foram eutanasiados e os tecidos adiposos foram coletados para cálculo do índice de adiposidade através da seguinte fórmula:

$$\text{Índice de adiposidade (\%)} = \frac{\sum \text{massa dos tecidos adiposos}}{\text{massa do animal}} \times 100$$

A indução da obesidade foi baseada em estudos prévios realizados pelo nosso grupo (Emílio-Silva et al., 2020; Ohara et al., 2023), ocorrendo no decorrer de 12 semanas para instalação do estado inflamatório sistêmico de baixo grau.

3.3 Teste de tolerância oral à glicose

A fim de validar a instalação apropriada do estado inflamatório característico da obesidade nos grupos HFD e comparar com os grupos SD, foi realizado o teste de tolerância oral à glicose. Foi coletada uma gota de sangue da cauda de cada animal (n=8 por grupo), submetido a um jejum de 6 horas previamente ao experimento. O teste de glicemia foi realizado através de dispositivo de monitoramento eletroquímico (Accu-chek Active Roche, Mannheim, Alemanha) para determinação da glicemia basal. Em seguida, cada animal recebeu uma solução oral de glicose (1g/kg, *per os* [p.o.]). Após a administração, as medidas glicêmicas foram realizadas repetidamente nos intervalos de 15, 30, 60 e 120 minutos (Wang; Liao, 2012). Os valores foram expressos em mg/dL.

3.4 Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do citral

3.4.1 Nocicepção induzida por formalina

Para avaliar e comparar a intensidade da resposta nociceptiva entre os camundongos obesos e eutróficos, bem como avaliar o efeito do citral sobre a nocicepção, os animais (n = 10 por grupo) foram tratados com veículo (Tween 80 1% 10 mL/kg, p.o), citral (100 ou 300 mg/kg, p.o) ou

morfina (5 mg/kg, 5 mL/kg, subcutânea [s.c.], Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil). Cada animal foi posicionado sob um funil de vidro de 20 cm de diâmetro por pelo menos 20 minutos para permitir a aclimação. Após uma hora dos tratamentos, 20 µL de solução de formalina 2,7% (formaldeído 1%) em salina 0,9% foram injetados intraplantar na pata traseira direita de cada camundongo. A etapa de observação dos animais foi dividida em dois momentos: os primeiros cinco minutos após a injeção, representando a fase neurogênica da nocicepção; e de 15 a 30 minutos após a injeção, representando a fase inflamatória da nocicepção. A medida utilizada como indicativo de nocicepção para registro foi o tempo total em segundos em que o camundongo permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada. Experimento adaptado de Hunskaar e Hole (1987).

3.4.2 Nocicepção induzida por estímulo térmica quente - placa quente

Neste modelo foi avaliado o efeito do citral sobre a nocicepção induzida por estímulo térmico, utilizando uma placa (Insight®, Ribeirão Preto – SP, Brasil) aquecida à 56 ± 1 °C. Os animais (n = 9 por grupo) passaram por uma etapa de triagem um dia antes do experimento, foi aferida a latência basal ao estímulo térmico, para certificar que os animais respondiam de forma homogênea. Foi definido 30 segundos como tempo máximo de permanência na placa para que não houvesse dano tecidual. No dia do experimento, os animais foram tratados uma hora antes dos testes com veículo ou citral (100 ou 300 mg/kg, p.o.) ou 30 minutos antes com morfina (5 mg/kg, s.c.), por conta da via de administração e meia-vida mais curta em comparação aos outros tratamentos. Os animais foram avaliados aos 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos orais (30, 60 e 90 minutos após a aplicação da morfina). O tempo decorrido, em segundos, até o animal demonstrar o primeiro comportamento nociceptivo (lamber, chacoalhar, retirar a pata traseira da placa ou pular) foi registrado como período de latência e utilizado como comparativo na avaliação da nocicepção (Carlini; Mendes, 2011).

3.4.3 Edema de pata induzida por λ-carragenina

Este modelo avaliou o efeito antiedematogênico do citral sobre inflamação aguda induzida por λ-carragenina injetada na pata traseira dos animais (n = 5 por grupo). Inicialmente, foi aferido o volume basal, em mL, de ambas as patas de cada camundongo por meio de um pletismômetro digital (Insight®, Ribeirão Preto – SP, Brasil). Em seguida, os animais foram tratados p.o. com veículo, citral 300 mg/kg ou Piroxicam (30 mg/kg) e 30 minutos após a administração foi injetado 20 uL de λ-carragenina 5% na pata traseira direita e salina 0,9% na pata traseira

esquerda, para controle da alteração de volume decorrente da administração de líquido na pata. Um grupo teve salina 0,9% injetada em apenas uma das patas para aferição da absorção de salina ao longo do tempo. A medida de volume foi realizada 1h, 2h, 3h, 4h e 6h após a injeção para acompanhar o processo inflamatório. O edema da pata foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Edema de pata} = (V_{\text{pata teste}} - V_{\text{pata controle}})$$

Realizado o experimento, os animais foram eutanaziados e as patas traseiras foram coletadas para pesagem e as patas direitas traseiras reservadas para análise dos parâmetros inflamatórios. Experimento adaptado de Winter, Risley e Nuss (1962).

A massa final de edema das patas foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Massa do edema} = (\text{Massa}_{\text{pata direita}} - \text{Massa}_{\text{pata esquerda}})$$

3.5 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo da pata

3.5.1 Quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As TBARS são produtos da peroxidação lipídica e estresse oxidativo presente em células expostas a um processo inflamatório. As amostras de pata foram homogeneizadas em tampão RIPA + inibidores de protease na proporção 1:10, centrifugadas a $3000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Foi preparada uma solução com 200 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 200 μL de solução de amostra, 200 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. A solução foi incubada em banho-maria por 20 minutos a 100°C . A quantidade de malondialdeído nas amostras que reagiu com o TBA foi determinada sob espectrofotômetro a 532 nm e os resultados foram expressos em nmols de TBARS/g de tecido (Ohkawa; Ohishi; Yagi, 1979).

3.5.2 Quantificação de nitrito

O óxido nítrico é uma molécula liberada por macrófagos em resposta a um estado inflamatório. Este método utiliza-se do nitrito (NO_2^-), metabólito do NO, para medir a concentração indireta da molécula nas amostras. As amostras de pata foram homogeneizadas em tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M (7,4 pH) na proporção 1:4, centrifugadas a $12000 \times g$ a 4°C por 15 minutos. Foi preparada uma solução com 100 μL de PBS, 100 μL da solução de amostra e 100 μL da

mistura N-1-naftil-etilenodiamina (NED) 0,1% + sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico a 5%, na proporção 1:1. Depois de pipetadas em placa de 96 poços, as amostras foram agitadas em temperatura ambiente por 10 minutos. A quantidade de nitrito foi determinada sob espectrofotômetro a 546 nm e os resultados foram expressos em uM de NO/mg de tecido (Sun et al., 2003).

3.6 Análise dos resultados

Todos os dados obtidos passaram pelo teste Shapiro-Wilk de normalidade e os parâmetros obtidos foram expressos através da média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). As comparações entre grupos de dietas foram realizadas a partir do teste t não pareado ou teste t de Welch. Comparações múltiplas entre grupos de tratamento foram realizadas por ANOVA de uma ou duas vias, seguida do teste de Bonferroni ou Dunnet para os dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para os dados não paramétricos. O nível mínimo de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4 Resultados

Após as 12 semanas da indução, a média de massa corporal (g) (Figura 1A) dos animais que receberam SD foi de 26 gramas e a dos animais que receberam HFD foi de 42 gramas. A massa corporal dos animais HFD apresentou aumento significativo ($p < 0,0001$) em relação aos animais SD a partir de metade da primeira semana, e essa diferença se manteve até o fim da indução da obesidade. O índice de adiposidade (Figura 1B) dos animais HFD também foi significativamente ($p < 0,0001$) maior em comparação aos animais SD, com média mais de quatro vezes maior.

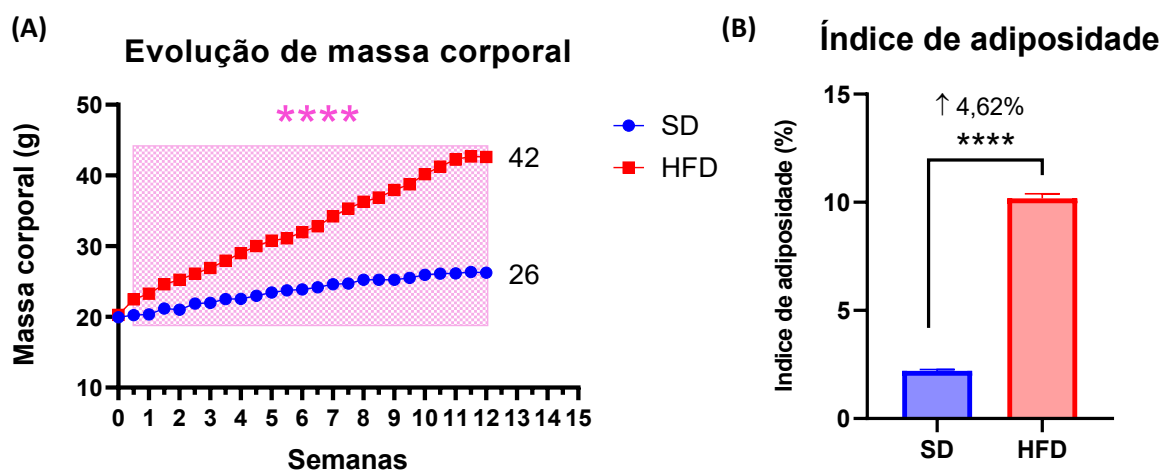


Figura 1: (A) Evolução de massa corporal dos animais durante 12 semanas de indução da obesidade e (B) Índice de adiposidade ao final dos experimentos (nSD = 65 e nHFD = 71). Os valores foram expressos em média $\pm$ E.P.M e o nível de significância estatística foi determinado por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni (A) e pelo teste t não pareado (B). **** $p < 0,0001$.

No teste de tolerância oral à glicose (Figura 2A), os animais HFD apresentaram aumento significativo da glicemia (mg/dL) no tempo 0 ($p < 0,0001$), 15 ($p < 0,05$), 60 ($p < 0,0005$) e 120 minutos ($p < 0,0001$) em relação aos animais SD. Esta diferença foi evidenciada também pela área sob a curva dos gráficos (Figura 2B), no qual o grupo HFD apresentou área significativamente maior ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo SD.

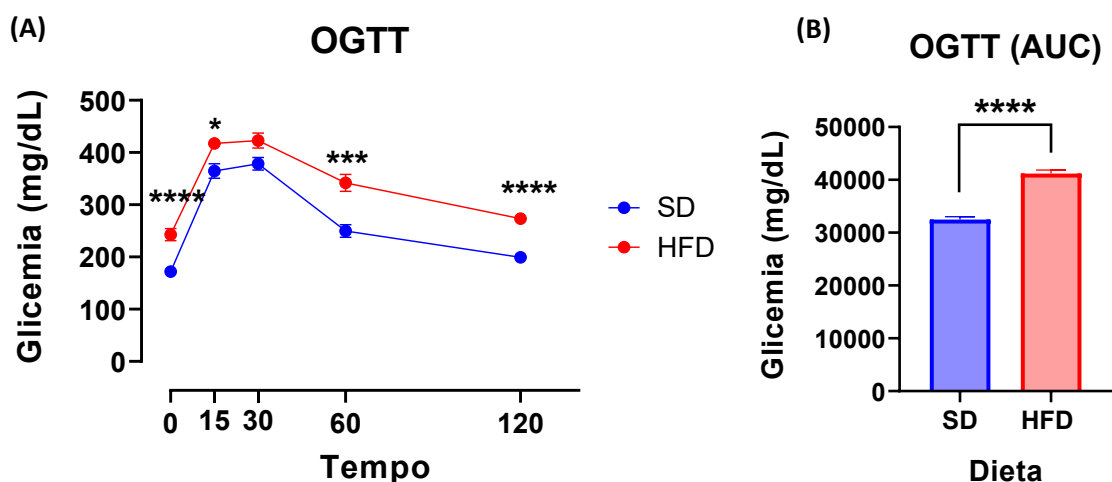


Figura 2: (A) Teste de tolerância oral à glicose (*Oral Glucose Tolerance Test* - OGTT) e (B) representação gráfica da área sob a curva (*Area Under Curve* - AUC) do gráfico (nSD = 21 e nHFD = 20). Os valores foram expressos em média $\pm$ E.P.M e o nível de significância estatística foi determinado por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni (A) e pelo teste t não pareado (B). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Na primeira fase do teste de nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina (Figura 3A), caracterizada como a fase de dor neurogênica, não houve diferença significativa entre os animais tratados com veículo entre dietas, ou seja, os animais apresentaram comportamentos estereotipados relacionados a dor de maneira semelhante, portanto, a HFD não alterou o limiar de dor dos animais com obesidade neste teste. A redução do tempo de resposta pela administração subcutânea de morfina foi significativa em ambos os grupos de dieta em comparação com seu respectivo grupo veículo ($p < 0,0001$ para SD e $p < 0,0001$ para HFD). O tratamento com citral na dose de 100 mg/kg não apresentou efeito na redução do tempo de resposta neste teste, já o tratamento dos animais com a dose de 300 mg/kg, reduziu o tempo de resposta de forma significativa tanto em SD ($p < 0,05$) quando em HFD ($p < 0,001$), comparado com os respectivos grupos de tratamento com veículo nessa fase.

Na segunda fase do teste (Figura 3B), a fase de dor inflamatória, também não houve diferença no limiar de dor por influência da dieta. A redução do tempo de resposta pela morfina foi significativa ($p < 0,0001$ para SD e $p < 0,001$ para HFD), assim como o tratamento com a dose de 300 mg/kg do citral ($p < 0,001$ para ambas as dietas). Em comparação entre os mesmos grupos de tratamento que receberam dietas distintas, observou-se que o tratamento com a dose efetiva de citral, 300 mg/kg, nos animais HFD apresentou redução significativa do tempo de resposta em comparação com o mesmo tratamento nos animais SD em ambas as fases do teste ($p < 0,0001$ na fase 1 e $p < 0,05$ na fase 2).

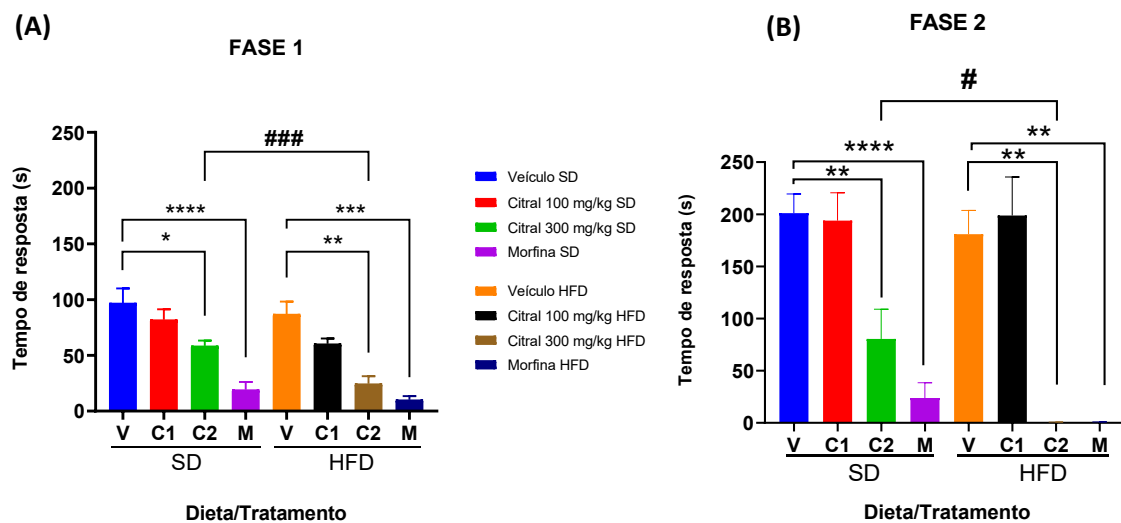


Figura 3: Teste de nociceção induzido por injeção intraplantar de formalina fases 1 (A) e 2 (B) (nSD = 34 e nHFD = 35). Os valores foram expressos em média $\pm$ E.P.M e o nível de significância estatística foi determinado por Teste ANOVA de uma via seguido de teste de Dunnett para animais SD, teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para animais HFD e teste t não pareado para comparação dos grupos de tratamento entre dietas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (comparações entre tratamentos do mesmo grupo de dieta); ### $p < 0,001$ (comparação entre dietas do mesmo grupo de tratamento).

A triagem do teste de placa quente (Figura 4A) revelou uma diferença significativa ($p < 0,0005$) no tempo de latência basal dos animais dependente da dieta. O grupo HFD apresentou um tempo menor, em média, em comparação ao grupo SD. No teste de placa quente propriamente dito (Figuras 4B, 4C e 4D), não foram observados efeitos significativos no tempo de latência de quaisquer tratamentos dentre os animais SD. Os animais HFD que receberam a administração de morfina apresentaram tempo de latência significativamente maior em comparação ao grupo que recebeu veículo em todos os tempos de medição [60 ($p < 0,0005$), 90 ($p < 0,0001$) e 120 minutos ($p < 0,05$)]. Além disso, o tempo de latência dos animais HFD que receberam veículo foi significativamente menor ($p < 0,001$) em relação aos animais SD do mesmo tratamento no

tempo 60 minutos. O tratamento com ambas as doses de citral não apresentou efeito sob o tempo de latência dos animais nesse modelo experimental.

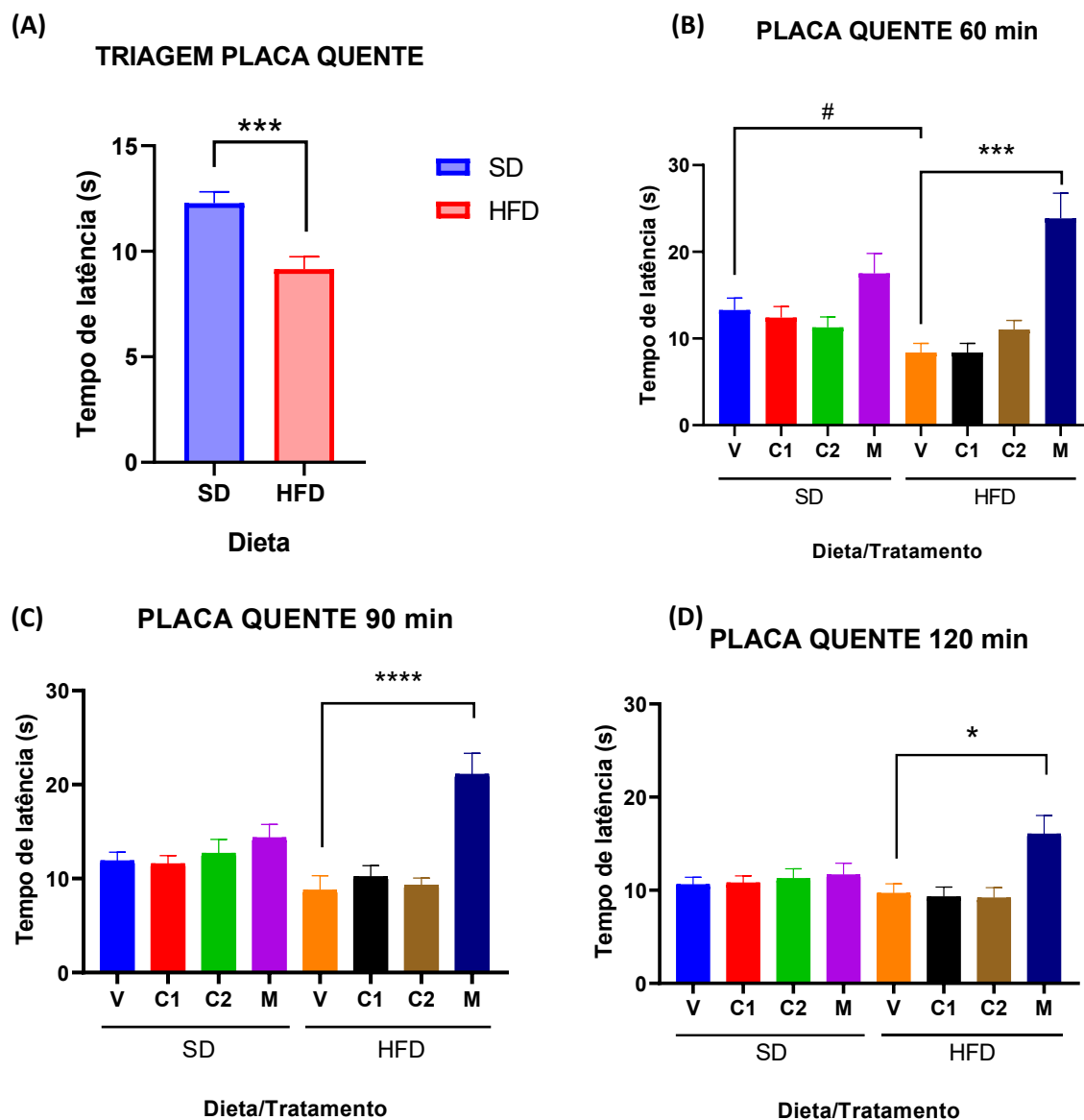


Figura 4: (A) Triagem dos animais para teste da placa quente e Teste da placa quente nos tempos 60 (B), 90 (C) e 120 (D) minutos (nSD = 31 e nHFD = 36). Os valores foram expressos em média $\pm$ E.P.M e o nível de significância estatística foi determinado por Teste t de Welch (A), ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett para SD, Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ou ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett para HFD (B e C) e teste t não pareado para comparação entre dietas (D). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,05$ (comparação entre dietas do mesmo grupo de tratamento)

No teste de edema de pata induzido por injeção intraplantar de λ -carragenina, não houve diferença significativa entre os grupos de animais tratados com veículo, sendo assim a HFD não alterou a variação de massa decorrente do edema entre os animais eutróficos (Figura 5A e 5B). A partir do gráfico representativo da área sob curva de cada um dos tratamentos (Figura

5C), foi possível observar um aumento significativo do volume das patas dos animais que receberam a injeção intraplantar de λ -carragenina, mas que foram tratados apenas com veículo, tanto no grupo SD ($p < 0,05$) quanto no grupo HFD ($p < 0,001$), quando comparados aos animais que apenas receberam a injeção de salina. Não foram observadas diferenças significativas no volume da pata traseira dos animais após os tratamentos com as doses de citral ou Piroxicam em qualquer dos grupos de dieta.

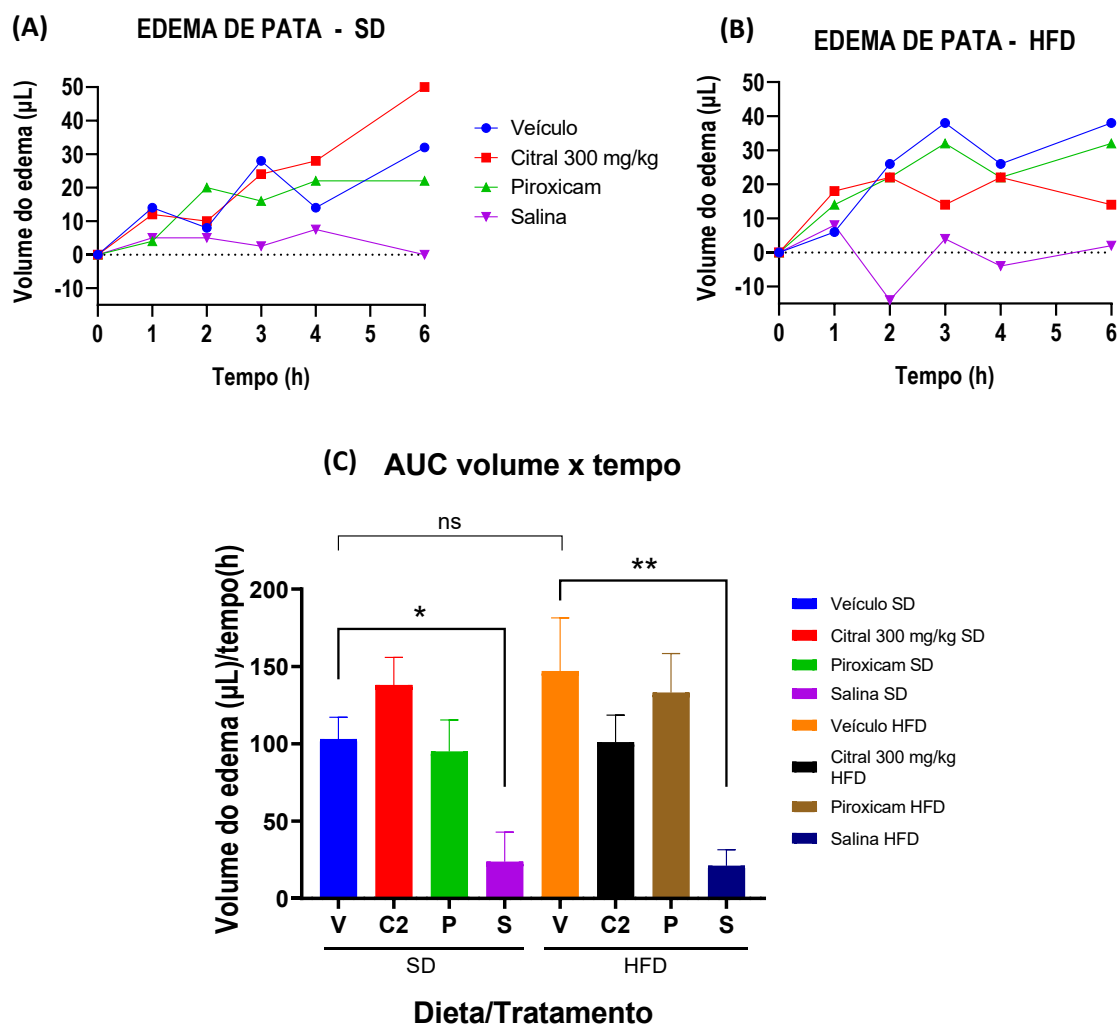


Figura 5: (A) Teste de edema de pata com variação do volume ao longo do tempo dos animais SD e (B) HFD e (C) representação gráfica da área sob a curva da variação do edema (nSD = 22 e nHFD = 30). Os valores estão expressos em média e nível de significância estatística foi determinado por ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. (A e B) e ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett para comparação entre tratamentos ou teste t não pareado para comparação entre dietas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

A pesagem das patas após eutanásia revelou diferença significativa na massa do grupo veículo em relação ao grupo salina tanto em SD ($p < 0,001$) quanto em HFD ($p < 0,05$). Além disso, foi

possível observar redução significativa ($p < 0,001$) do peso das patas dos animais SD tratados com Piroxicam comparado com os tratados com veículo. O mesmo efeito não foi observado no grupo de animais HFD (Figura 6).

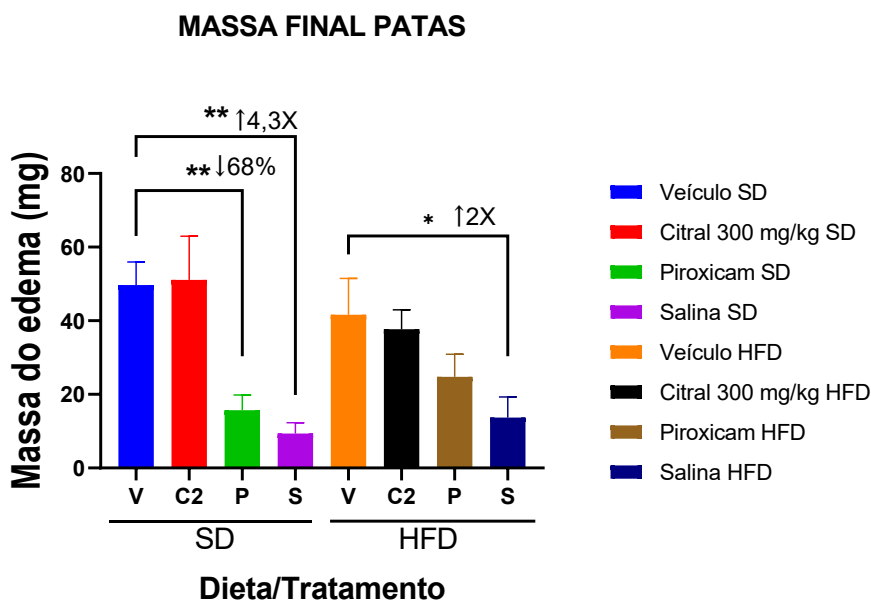


Figura 6: Massa das patas após o final dos experimentos ($n_{SD} = 22$ e $n_{HFD} = 30$). Os valores estão expressos em média e E.P.M. e nível de significância estatística foi determinado por ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

O ensaio de TBARS revelou uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre os grupos veículo entre dietas, onde o grupo SD apresentou maior quantidade relativa de TBARS em comparação com o grupo HFD. Não houve diferenças significativas no tratamento com citral em qualquer grupo de dieta (Figura 7).

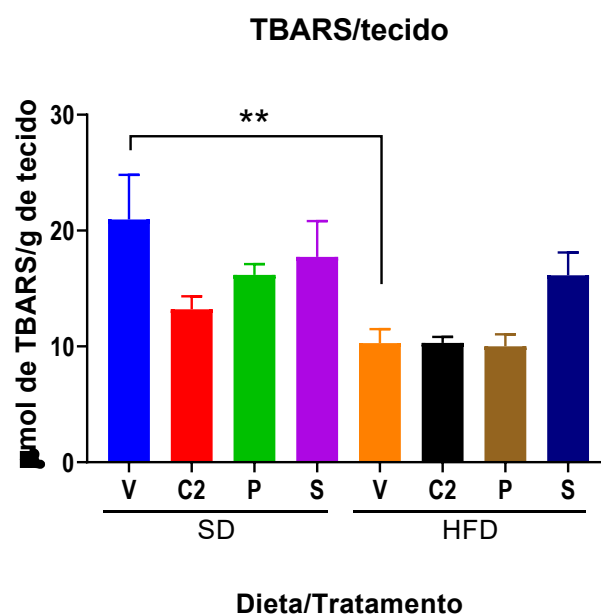


Figura 7: Ensaio de quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Tiobarbituric acid reactive substances – TBARS) (nSD = 22 e nHFD = 30). Os valores estão expressos em média e e.p.m. e nível de significância estatística foi determinado por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. ** $p < 0,005$.

No ensaio de quantificação de nitrito, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) da quantidade relativa de nitritos entre os animais HFD tratados com Piroxicam em comparação aos animais HFD tratados com veículo. No grupo SD não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 8).

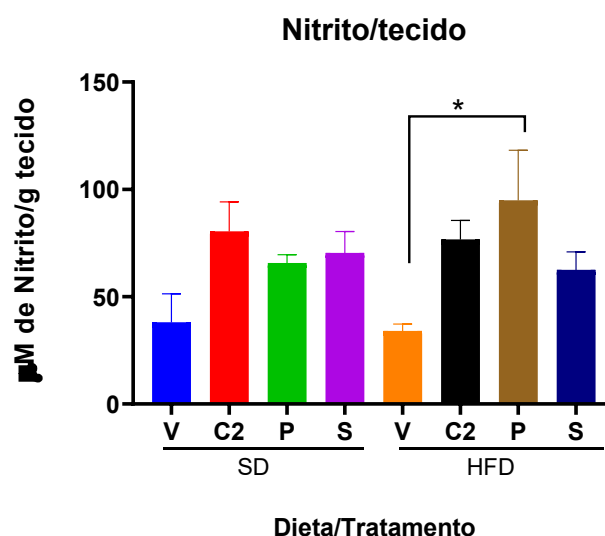


Figura 8: Ensaio de quantificação de nitrito (NO_2^-) (nSD = 22 e nHFD = 30). Os valores estão expressos em média e E.P.M. e nível de significância estatística foi determinado por ANOVA de uma via seguido de teste de Dunnet. * $p < 0,05$.

5 Discussão

A obesidade afeta milhões de pessoas no Brasil e no mundo, representando uma condição complexa que pode envolver diversas complicações para o organismo por sua natureza inflamatória sistêmica baseada no acúmulo e expansão de tecido adiposo, entre outros fatores genéticos e ambientais. No contexto da experimentação animal, um dos modelos empregados para obesidade é a oferta de HFD, que mimetiza a complexidade do organismo humano combinando influências genéticas e nutricionais (Fuchs et al., 2018). Neste trabalho foi utilizado o camundongo C57BL/6J, linhagem que apresenta predisposição genética a obesidade e resistência à insulina (Buettner; Schölmerich; Bollheimer, 2007; Collins et al., 2004; Surwit et al., 1995). Diante da oferta de HFD por 12 semanas, os animais apresentaram média de massa corporal final mais elevada em comparação aos animais alimentados com SD. Complementarmente, o índice de adiposidade, ou seja, a composição corporal de gordura em porcentagem dos camundongos HFD foi mais de 4 vezes maior em comparação aos animais SD, indicando que esse ganho de massa corporal deveu-se pelo aumento do tecido adiposo, o que é característico da obesidade (Emílio-Silva et al., 2020; Lee et al., 2019; Ohara et al., 2023). Além disso, foi observado que o perfil glicêmico dos animais HFD foi alterado, evidenciado pelo nível glicêmico em jejum e pós-prandial (15, 60 e 120 minutos pós administração de glicose) elevados em comparação aos níveis glicêmicos nos respectivos momentos dos animais SD, indicando resistência à insulina por consequência da ingestão da HFD, uma alteração metabólica que pode estar presente na obesidade (Collins et al., 2004; Lang et al., 2019; Parekh et al., 1998). De acordo com estes resultados, é possível então confirmar a validade do modelo de indução de obesidade utilizado neste estudo.

A relação da obesidade com a dor foi demonstrada por diversos estudos clínicos e pré-clínicos, sendo reportado que indivíduos e animais obesos apresentam respostas de dor mais frequentes e/ou mais intensas (Okifuji; Hare, 2015). A ligação entre obesidade e dor envolve fatores mecânicos, genéticos, endócrinos e ambientais (Chin et al., 2020).

Em estudo prévio realizado pelo nosso grupo, o efeito antinociceptivo do citral foi avaliado sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos eutróficos *Swiss* nas doses de 25, 100 e 300 mg/kg, e foi efetivo nas doses de 100 mg/kg na segunda fase do teste e 300 mg/kg, em ambas as fases do teste (Nishijima et al., 2014). Considerando as adversidades alarmantes acerca dos tratamentos atuais para dor, o citral nas doses 100 mg/kg e 300 mg/kg foram testadas nos experimentos deste trabalho.

O teste de nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina é um modelo experimental bem fundamentado e amplamente utilizado para avaliar a resposta nociceptiva a estímulo nocivo em seus dois estágios distintos. O primeiro estágio representa a dor neurogênica, gerada pela presença da formalina, um agente químico irritante. Já o segundo estágio é definido pela dor inflamatória, gerada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios. Este teste foi utilizado neste estudo com a finalidade de comparar a resposta nociceptiva entre os grupos eutrófico e obeso de animais, assim como avaliar o efeito do citral sobre esta resposta. Os animais tratados com apenas veículo, o controle negativo, não apresentaram diferenças significativas entre si quanto a resposta nociceptiva em qualquer fase do teste, independentemente do tipo de dieta ofertada. Considerando a natureza inflamatória crônica e sistêmica da obesidade, era esperado observar uma resposta de comportamento doloroso mais exacerbada no grupo HFD. A literatura reporta sensibilidade à dor aumentada em modelos de dor crônica e alodinia (2011; Guillemot-Legrís et al., 2018; Tierney et al., 2022) (resposta nociceptiva a estímulo não-nocivo), mas os resultados tendem a ser inconsistentes quando se trata de dor aguda (Miranda; Campos; Leite-Almeida, 2021). Outros estudos considerando outras variáveis como idade, sexo, comorbidades, são necessários para avaliar mais detalhadamente a relação entre dor aguda e obesidade. Uma alternativa seria a utilização de solução de formalina mais diluída para encontrar um limiar que pode ser detectado entre os animais SD e HFD, de forma que o estímulo seja suficiente para que apenas os animais HFD apresentassem aumento de comportamentos estereotipados.

Os animais que receberam morfina, o controle positivo, apresentaram reduzido tempo de resposta nociceptiva em ambas as fases do teste e em ambos os grupos de dieta, confirmando a validade deste teste experimental. O tratamento com citral na dose 100 mg/kg não apresentou eficácia quanto a redução do tempo da resposta nociceptiva, visto que não foram observadas reduções significativas entre os animais tratados com esta dose e os animais tratados com veículo. Já na dose de 300 mg/kg, o tratamento com citral se mostrou eficaz, reduzindo o tempo de resposta, tanto na fase de dor neurogênica, quanto na fase de dor inflamatória em ambas as dietas. Destaca-se o efeito do tratamento com citral 300 mg/kg na resposta nociceptiva dos animais HFD, cuja redução foi mais pronunciada em comparação com os animais SD. Até o momento da elaboração deste texto, este é o primeiro estudo a avaliar a resposta antinociceptiva do citral frente à nocicepção induzida por formalina em camundongos C57BL/6J obesos. Outros estudos abordaram a metodologia utilizando diferentes linhagens ou idades como parâmetro de comparação, excluído o fator obesidade (Nishijima et al., 2014; Scuteri et al.,

2020; Ulker et al., 2020). Sugere-se que este resultado se deu por conta da propriedade lipofílica do citral como monoterpene (Dai et al., 2023), consequentemente a proporção maior de tecido adiposo presente nos animais HFD altera a biodisponibilidade do composto na corrente sanguínea e portanto, promove efeito mais pronunciado nestes animais.

O teste da placa quente é também um teste amplamente utilizado para avaliação de resposta nociceptiva, mas neste caso, por estímulo térmico agudo. Consiste em um teste baseado na ativação de nociceptores térmicos e reflexos supraspinal, ou seja, é utilizado para avaliar a atuação central de um composto analgésico (Dzoyem et al., 2017). Foi utilizado neste trabalho com o fim de comparar a resposta nociceptiva a estímulo térmico entre os grupos eutrófico e obeso, assim como determinar a influência do citral sobre esse tipo de resposta de dor. Foi observado que os animais alimentados com HFD apresentaram redução no tempo de latência em comparação com os animais alimentados com SD, sugerindo que a HFD induz aumento na sensibilidade térmica ao calor dos animais. A literatura abordando resposta nociceptiva por estímulo térmico em camundongos C57BL/6J obesos apresenta inconsistências, o que pode ser explicado pela variabilidade em relação ao modelo e tempo de indução da obesidade, sublinhagem dos camundongos, método utilizado como estímulo térmico, resposta estereotipada como indicativo de nocicepção, entre outros fatores. Um estudo utilizou outro método de estímulo térmico, o método de Hargreaves, que consiste em um teste de sensibilidade térmica onde o camundongo é colocado em uma placa de vidro temperado que permite a aplicação de um feixe de calor focalizado na região plantar do animal e o tempo de latência é registrado como o tempo decorrido até o animal retirar a pata da placa. Nesse estudo, Lian e colaboradores (2022) utilizaram camundongos machos C57BL/6J jovens e apresentaram evidências de sensibilidade térmica aumentada, consistentes com este trabalho. Porém, alternativo às observações deste trabalho, outro estudo utilizando diferentes sublinhagens de camundongos C57BL/6 adultos demonstrou sensibilidade sem alterações após 7 semanas de HFD, complementada por alterações metabólicas características da obesidade (Cooper et al., 2018).

Mediante teste experimental com os tratamentos orais, os animais tratados com veículo apresentaram resposta similar ao observado no teste de triagem, com animais HFD apresentando tempo de latência menor em comparação com animais SD na primeira medição (60 minutos após tratamento). Este resultado não se repetiu nos demais tempos de medição. O tratamento com morfina aumentou significativamente o tempo de latência nos animais HFD em comparação aos que receberam veículo em todos os tempos de medição, porém tal efeito não

foi observado nos animais SD. Isso pode estar relacionado à maior biodisponibilidade da morfina em camundongos obesos, evidenciado pelo estudo comparativo realizado por Dalesio e colaboradores (2016), mas mais estudos são necessários para validar esta hipótese.

Em relação ao tratamento com as doses de citral, não foram observadas diferenças significativas em resposta ao tratamento em quaisquer doses, grupos de dieta ou tempos de medição. O citral já foi reportado como redutor de resposta nociceptiva por estímulo térmico não-nocivo, em estudo utilizando um modelo de alodinia induzida por injeção intraplantar de carragenina e posterior estímulo com imersão em água quente (Gonçalves et al., 2020). Foi sugerido que o citral agiu inibindo os canais TRPV1–3 e TRPM8, envolvidos na nocicepção térmica, bem como reduzindo os níveis séricos de TNF- α e IL-6, resultando na inibição da resposta inflamatória e consequentemente no desenvolvimento da dor. Os resultados alternativos apresentados no presente estudo sugerem que o tratamento com citral não influencia na redução da dor sem que haja um processo inflamatório precedente, ou seja, uma injúria anterior ao estímulo térmico, porém é imperativo que o teste seja reproduzido a fim de assegurar seus resultados. A repetição do experimento utilizando um agente inflamatório, como o LPS, será interessante para corroborar com essa hipótese, ainda verificando o comportamento nociceptivo dos camundongo com obesidade.

O teste de edema de pata induzido por injeção intraplantar de λ -carragenina é um teste utilizado para avaliar a resposta inflamatória gerada por estímulo nocivo. A λ -carragenina age como um agente edematogênico, gerando acúmulo de líquido na pata do animal. Neste estudo, foi utilizado com a finalidade de comparar a resposta inflamatória representada pelo edema, assim como avaliar o efeito do tratamento do citral sobre esta resposta. Contudo, as medições feitas ao longo do processo edematogênico não apresentaram diferença significativa quanto aos tratamentos, momento da medida ou dieta. Este resultado inconclusivo pode estar relacionado a imprecisão do equipamento utilizado, o pletismômetro digital, para o animal experimental deste trabalho. A literatura tem como maioria ensaios experimentais de alteração de volume de pata com pletismômetro digital em ratos (Karim et al., 2019; Mansouri et al., 2015; Silva et al., 2022), que são roedores maiores comparados aos camundongos e consequentemente a variação de volume é maior após indução de edema. O pletismômetro mede variações até 0,01 mL, o que o torna mais impreciso considerando o intervalo de variação (0,01-0,05 mL, vide Figura 5A e B) observado neste trabalho. Para contornar tal imprecisão, as patas foram pesadas logo após a eutanásia dos animais, realizada imediatamente após a medição final do experimento. Foi observado através do peso final das patas uma diferença significativa de edema do grupo

salina em comparação com o grupo veículo, tanto nos animais SD quanto HFD, indicando a validade da indução do edema de pata por λ -carragenina. Além disso, foi observada redução significativa de edema do grupo tratado com Piroxicam nos animais SD, mas não nos HFD, sugerindo que este medicamento em sua dose ou via de administração selecionadas não foi capaz de promover a ação anti-edematogênica necessária neste grupo específico. O tratamento com citral na dose de 300 mg/kg não promoveu efeito anti-edematogênico neste modelo. A fim de obter resultados mais claros, é necessário utilizar outras metodologias para aferir o edema de pata ao longo do tempo, bem como a dose utilizada como controle positivo para os animais HFD. Uma alternativa seria a utilização de paquímetro digital para aferir a espessura da pata ou de ferramentas digitais que auxiliem na determinação da área superficial das patas, como o ImageJ.

No ensaio de TBARS realizado com as amostras provenientes do estudo antiedematogênico, foi observada diferença significativa entre os animais SD e HFD tratados com veículo, indicando que a dieta pode ter influenciado a peroxidação lipídica após estímulo. A quantidade relativa de TBARS foi mais elevada nos animais que receberam SD em relação aos que receberam HFD, contrariando as expectativas. Estudos indicam que a peroxidação lipídica em amostras de edema de pata é mais elevada após injeção de λ -carragenina comparado aos grupos controle de salina (Li et al., 2018; Zhang et al., 2020), bem como animais com obesidade induzida por dieta apresentam aumento nos marcadores inflamatórios após injúria em comparação com os grupos controle eutróficos (Da Silva et al., 2024; Wang et al., 2018). Este resultado não foi obtido em nossas condições experimentais. No ensaio de nitrito, foi observado aumento da quantidade relativa de nitrito nas patas dos animais HFD do grupo controle positivo em comparação aos do grupo veículo. Acredita-se que este resultado seja reflexo da falta de eficácia da dose administrada de Piroxicam ou devido às próprias características específicas presentes nos animais com obesidade induzida por HFD. É necessário que estes testes sejam replicados de forma que o controle positivo tenha capacidade anti-inflamatória a fim de validar os ensaios subsequentes. Além disso, outros estudos visando a elucidação de vias alternativas para o efeito anti-inflamatório e antiedematogênico do citral precisam ser verificadas, como o sistema endocanabinoide.

6 Conclusão

A resposta nociceptiva basal entre os grupos eutrófico e obeso de camundongos foi observada apenas na triagem e primeira medição do teste de placa quente, sendo assim, é possível estabelecer que há uma diferença de comportamento de resposta à estímulo térmico decorrente da HFD, porém são necessários estudos mais aprofundados para determinar as bases fisiopatológicas dessa relação, assim como para determinar a fonte da discrepância do resultado das demais triagens realizadas neste estudo com os resultados de estudos realizados anteriormente.

O tratamento com citral na dose de 300 mg/kg foi eficiente na redução da resposta nociceptiva dos camundongos de ambas as dietas em ambas as fases neurogênica e inflamatória do teste de formalina, porém apresentou efeito mais pronunciado nos animais ofertados HFD. É possível, então, determinar o citral como efetivo em animais submetidos a ambas as dietas. Além disso, é de suma importância investigar a diferença do tratamento com citral na resposta entre animais eutróficos e obesos a fim de avançar no conhecimento farmacológico do composto, assim como as bases fisiopatológicas da obesidade.

O tratamento com citral em quaisquer doses não apresentou efeito sobre a nocicepção induzida por estímulo térmico quente ou sobre o edema de pata, além de não influenciar nos marcadores de estresse oxidativo. Mais estudos são imperativos para compreensão dos mecanismos de ação específicos do citral sobre a inflamação e a que tipo de estímulo este composto responde.

Os dados apresentados neste trabalho representam um avanço na pesquisa na terapêutica de produtos naturais, contribuindo para melhor compreensão dos mecanismos de ação e limitações do citral, assim como representam uma oportunidade para a revisão das metodologias utilizadas e reflexão dos próximos passos a serem realizados para colocar em evidência o potencial farmacológico para tratamento de condições desafiadoras como a dor crônica no contexto da obesidade.

7 Referências bibliográficas

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ARAUJO, Daniel Souza Monteiro *et al.* TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 24, n. 10, p. 997–1008, 2 out. 2020.
- BARAZZONI, Rocco *et al.* Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. **Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, v. 23, n. 2, p. 149–157, 1 abr. 2018.
- BARBOSA, Luiz Cláudio Almeida *et al.* Evaluation of the Chemical Composition of Brazilian Commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1864–1874, ago. 2008.
- BUETTNER, Roland; SCHÖLMERICH, Jürgen; BOLLHEIMER, L. Cornelius. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798–808, 2007.
- CARLINI, E. L. de A.; MENDES, F. R. **Protocolos em psicofarmacologia comportamental: Um guia para pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais**. [S.l.]: Editora Unifesp., 2011.
- CASHMAN, J. N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. **Drugs**, v. 52 Suppl 5, p. 13–23, 1996.
- CHIN, Shao-Hua *et al.* Obesity and pain: a systematic review. **International Journal of Obesity**, v. 44, n. 5, p. 969–979, maio 2020.
- COLLINS, Sheila *et al.* Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiology & Behavior**, Reviews on Ingestive Science. v. 81, n. 2, p. 243–248, 1 abr. 2004.
- COOPER, Michael A. *et al.* Intrinsic Activity of C57BL/6 Substrains Associates with High-Fat Diet-Induced Mechanical Sensitivity in Mice. **The Journal of Pain**, v. 19, n. 11, p. 1285–1295, 1 nov. 2018.
- DA CRUZ FERNANDES, Isabela Maia *et al.* Low back pain, obesity, and inflammatory markers: exercise as potential treatment. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 14, n. 2, p. 168–174, 26 abr. 2018.
- DA SILVA, Igor Oliveira *et al.* Obesity aggravates acute kidney injury resulting from ischemia and reperfusion in mice. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 9820, 29 abr. 2024.
- DAI, Jinming *et al.* Antibacterial properties of citral against *Staphylococcus aureus*: From membrane damage to metabolic inhibition. **Food Bioscience**, v. 53, p. 102770, 1 jun. 2023.
- DALESIO, Nicholas M. *et al.* Effects of Obesity and Leptin Deficiency on Morphine Pharmacokinetics in a Mouse Model. **Anesthesia and Analgesia**, v. 123, n. 6, p. 1611–1617, dez. 2016.
- DOWELL, Deborah. CDC Clinical Practice Guideline for Prescribing Opioids for Pain — United States, 2022. **MMWR. Recommendations and Reports**, v. 71, 2022.
- DZOYEM, J. P. *et al.* Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In: **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**. 1. ed. [S.l.]: Victor Kuete, 2017.

- EMÍLIO-SILVA, Maycon T. *et al.* Hypothermic Effect of Acute Citral Treatment during LPS-induced Systemic Inflammation in Obese Mice: Reduction of Serum TNF- α and Leptin Levels. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1454, out. 2020.
- FUCHS, Taíse *et al.* Animal models in metabolic syndrome. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 45, p. 1975, 29 out. 2018.
- GONÇALVES, Elaine C. D. *et al.* Citral Inhibits the Inflammatory Response and Hyperalgesia in Mice: The Role of TLR4, TLR2/Dectin-1, and CB2 Cannabinoid Receptor/ATP-Sensitive K⁺ Channel Pathways. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 1190–1200, 24 abr. 2020.
- GREGOR, Margaret F.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 2011.
- GUILFORD, B. L.; RYALS, J. M.; WRIGHT, D. E. Phenotypic Changes in Diabetic Neuropathy Induced by a High-Fat Diet in Diabetic C57Bl/6 Mice. **Journal of Diabetes Research**, v. 2011, n. 1, p. 848307, 2011.
- GUILLEMOT-LEGRIS, Owein *et al.* Post-operative pain in mice is prolonged by diet-induced obesity and rescued by dietary intervention. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 74, p. 96–105, 1 nov. 2018.
- GUTIÉRREZ-PACHECO, María Melissa *et al.* Mechanisms and Applications of Citral's Antimicrobial Properties in Food Preservation and Pharmaceuticals Formulations. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, p. 1608, nov. 2023.
- HODGENS, Alexander; SHARMAN, Tariq. Corticosteroids. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.
- HUNSKAAR, Steinar; HOLE, Kjell. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **PAIN**, v. 30, n. 1, p. 103, jul. 1987.
- KAPUGI, Michelle; CUNNINGHAM, Kathleen. Corticosteroids. **Orthopedic Nursing**, v. 38, n. 5, p. 336–339, 2019.
- KARIM, Nasiara *et al.* Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activities of Asparacosin A Involve Selective Cyclooxygenase 2 and Inflammatory Cytokines Inhibition: An in-vitro, in-vivo, and in-silico Approach. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 26 mar. 2019.
- KAWAHARA, Kohichi *et al.* Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Oxygenated metabolism of PUFA: analysis and biological relevance. v. 1851, n. 4, p. 414–421, 1 abr. 2015.
- KAWAI, Tatsuo; AUTIERI, Michael V.; SCALIA, Rosario. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, n. 3, p. C375–C391, mar. 2021.
- KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Robbins & Contran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 10. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2023.
- LANG, Philipp *et al.* Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19556, 20 dez. 2019.

LEE, Mi Rim *et al.* Anti-obesity effect in high-fat-diet-induced obese C57BL/6 mice: Study of a novel extract from mulberry (*Morus alba*) leaves fermented with *Cordyceps militaris*. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, n. 3, p. 2185–2193, 1 mar. 2019.

LI, Kai Kai *et al.* Dihydrofisetin exerts its anti-inflammatory effects associated with suppressing ERK/p38 MAPK and Heme Oxygenase-1 activation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and carrageenan-induced mice paw edema. **International Immunopharmacology**, v. 54, p. 366–374, 1 jan. 2018.

LIAN, Nan *et al.* Obesity by High-Fat Diet Increases Pain Sensitivity by Reprogramming Branched-Chain Amino Acid Catabolism in Dorsal Root Ganglia. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 12 maio 2022.

LIN, Chien-Tsong *et al.* Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8783–8787, 1 dez. 2008.

MANSOURI, Mohammad Taghi *et al.* A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 292–298, 2015.

MILANI, Daniel A. Queremel; DAVIS, Donald D. Pain Management Medications. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

MIRANDA, Carolina Marques; CAMPOS, Mariana de Lima; LEITE-ALMEIDA, Hugo. Diet, body weight and pain susceptibility – A systematic review of preclinical studies. **Neurobiology of Pain**, v. 10, p. 100066, 15 jun. 2021.

MUNIR, Muhammad A.; ENANY, Nasr; ZHANG, Jun-Ming. Nonopioid Analgesics. **Medical Clinics of North America**, Pain Management, Part I. v. 91, n. 1, p. 97–111, 1 jan. 2007.

NISHIJIMA, Catarine M. *et al.* Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 736, p. 16–25, 5 ago. 2014.

OHARA, Rie *et al.* Citral Modulates MMP-2 and MMP-9 Activities on Healing of Gastric Ulcers Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4888, jan. 2023.

OHKAWA, Hiroshi; OHISHI, Nobuko; YAGI, Kunio. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1 jun. 1979.

OKIFUJI, Akiko; HARE, Bradford D. The association between chronic pain and obesity. **Journal of Pain Research**, v. 8, p. 399–408, 14 jul. 2015.

OPAS. **Uma em cada oito pessoas, no mundo, vive com obesidade**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/1-3-2024-uma-em-cada-oito-pessoas-no-mundo-vive-com-obesidade>>. Acesso em: 5 dez. 2024.

PAREKH, Priti I. *et al.* Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. **Metabolism**, v. 47, n. 9, p. 1089–1096, 1 set. 1998.

PUBCHEM. **Compound Summary for CID 638011, Citral**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638011>>. Acesso em: 14 abr. 2024.

RISHTON, Gilbert M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D-49D, 22 maio 2008.

SCUTERI, Damiana *et al.* Effects of Aging on Formalin-Induced Pain Behavior and Analgesic Activity of Gabapentin in C57BL/6 Mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 8 maio 2020.

SHOELSON, Steven E.; LEE, Jongsoon; GOLDFINE, Allison B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793–1801, 3 jul. 2006.

SILVA, Marília Garcez Corrêa da *et al.* Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of the Microalga *Pediastrum boryanum* in Carrageenan-Induced Rat Paw Edema. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, p. e21200748, 5 jan. 2022.

SIMON, Lee S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **The American Journal of Medicine**, v. 106, n. 5, p. 37S-42S, 31 maio 1999.

SISVAN. **Relatórios do Estado nutricional dos indivíduos**. Disponível em: <<https://sisaps.saude.gov.br/sisvan/relatoriopublico/estadonutricional>>. Acesso em: 28 fev. 2024.

STOKES, Andrew C. *et al.* Increases in BMI and chronic pain for US adults in midlife, 1992 to 2016. **SSM - Population Health**, v. 12, p. 100644, 1 dez. 2020.

SUN, Jie *et al.* Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p. 276–284, ago. 2003.

SURWIT, R. S. *et al.* Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and AJ mice. **Metabolism**, v. 44, n. 5, p. 645–651, 1 maio 1995.

SVSA/MS. **Painel de Monitoramento da Mortalidade CID-10 - SVSA/MS**. Disponível em: <<https://svs.aims.gov.br/daent/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/mortalidade/cid10/>>. Acesso em: 21 jun. 2025.

SWANSON, Karen V.; DENG, Meng; TING, Jenny P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 8, p. 477–489, ago. 2019.

TAMBORENA MALHEIROS, Rafael *et al.* Obesity and its chronic inflammation as pain potentiation factor in rats with osteoarthritis. **Cytokine**, v. 169, p. 156284, 1 set. 2023.

TIAN, Dan *et al.* High fat diet sensitizes fibromyalgia-like pain behaviors in mice via tumor necrosis factor alpha. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0190861, 14 fev. 2018.

TIERNEY, Jessica A. *et al.* High-fat diet causes mechanical allodynia in the absence of injury or diabetic pathology. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 14840, 1 set. 2022.

TRESCOT, Andrea M. *et al.* Opioid pharmacology. **Pain Physician**, v. 11, n. 2 Suppl, p. S133-153, mar. 2008.

TRESCOT, Andrea M. Opioid Pharmacology and Pharmacokinetics. *In*: STAATS, Peter S.; SILVERMAN, Sanford M. (Orgs.). **Controlled Substance Management in Chronic Pain: A Balanced Approach**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 45–62.

ULKER, Esad *et al.* C57BL/6 Substrain Differences in Formalin-Induced Pain-Like Behavioral Responses. **Behavioural brain research**, v. 390, p. 112698, 15 jul. 2020.

WANG, Chao-Yung; LIAO, James K. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *In*: WEICHHART, Thomas (Org.). **mTOR: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p. 421–433.

WANG, Fengyuan *et al.* Histopathological Changes Caused by Inflammation and Oxidative Stress in Diet-Induced-Obese Mouse following Experimental Lung Injury. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14250, 24 set. 2018.

WHO. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 21 jun. 2025.

WINTER, Charles A.; RISLEY, Edwin A.; NUSS, George W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 3, p. 544–547, 1 dez. 1962.

WOOLF, Clifford J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742–3744, 1 nov. 2010.

YAM, Mun Fei *et al.* General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2164, 24 jul. 2018.

ZHANG, Hongxing *et al.* Diallyl Disulfide Suppresses Inflammatory and Oxidative Machineries following Carrageenan Injection-Induced Paw Edema in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, p. 8508906, 15 abr. 2020.

ZHANG, Jun-Ming; AN, Jianxiong. Cytokines, Inflammation and Pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

Anexo 1

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O citral é capaz de modular a nocicepção em camundongos com obesidade?", protocolada sob o CEUA nº 6856030723 (ID 000591), sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima e equipe; Felipe Lima Dario** - 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 21/08/2023.

We certify that the proposal "Is citral capable of modulate nociception in obese mice?", utilizing 448 Isogenics mice (448 males), protocol number CEUA 6856030723 (ID 000591), under the responsibility of **Clélia Akiko Hiruma-Lima and team; Felipe Lima Dario** - 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 08/21/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2023 a 03/2025** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **CEMIB - UNICAMP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **5 a 6 semanas**

Quantidade: **448**

Linhagem: **C57BL/6J**

Peso: **20 a 35 g**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Botucatu, 22 de agosto de 2023



Prof. 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-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

