

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO CITRAL NA INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARIDEO EM
CAMUNDONGOS OBESOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA



MAYCON TAVARES EMÍLIO SILVA
PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA



unesp

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO CITRAL NA INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARIDEO EM
CAMUNDONGOS OBESOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

MAYCON TAVARES EMÍLIO SILVA

PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

PROF. DRA. LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA

PROF. TITULAR LUIZ GUILHERME DE SIQUEIRA BRANCO

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

Prof. Adj. Clélia Akiko Hiruma-Lima

**BOTUCATU – SP
2020**

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

Silva, Maycon Tavares Emílio.

Avaliação da ação do citral na inflamação sistêmica induzida por lipopolissacarídeo em camundongos obesos com dieta hiperlipídica / Maycon Tavares Emílio Silva. - Botucatu, 2020

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

Coorientador: Luiz Guilherme de Siqueira Branco

Capes: 21006008

1. Obesidade. 2. Inflamação sistêmica. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Camundongos.

Palavras-chave: Citral; Inflamação sistêmica; LPS; Obesidade.

AUXÍLIO FINANCEIRO:

O presente trabalho foi realizado com os apoios da

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/SP, nº processo 18/09873-0 e 18/10935-0).



AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, a Deus que me guia e fornece momentos bons e outros nem tanto, para que pudesse chegar até os dias de hoje.

À meus pais, Silvana e Claudio, que são exemplos de pessoas de coragem e dedicação. São eles que me apoiam em cada decisão e me incentivam a não desistir independente do desafio que encontre.

À Clélia que é exemplo de orientadora, professora, pesquisadora e de pessoa. Por ser conselheira e ter um coração enorme e justo. Obrigado por acreditar na pessoa que eu poderia me tornar, mesmo eu ainda não sabendo o que gostaria de trilhar profissionalmente.

À Lúcia pelos conselhos e por fornecer possibilidade de sempre me tornar melhor, como profissional e, principalmente, como pessoa.

Ao profº Branco pelo incentivo e colaboração para que pudesse realizar o projeto de mestrado.

À Silvinha pelo seu carinho e paixão contagiantes em ensinar.

Garboso, independente do momento é companheiro para experimento e de desafios. Um verdadeiro irmão que ganhei nesse retorno a Botucatu.

Ximboca, com o seu coração enorme e jeito único é difícil de não conseguir querer estar aos seus lados todos os dias. Obrigado pelos seus sorrisos, conversas e abraços.

Doku, Melão, Marcela, Pri, Felipe, Renata e Sorriso que sem eles não seria possível realizar esse trabalho.

Obrigado a todas as pessoas que fazem parte da família “Reprodução de A à Z”, projeto que sou eternamente grato e que me orgulho em dizer que faço parte. Com certeza, sem esta iniciativa o caminho trilhado até hoje seria muito mais turbulento e menos gratificante.

Obrigado a CAPES e FAPESP ao apoio financeiro.

Por fim, mas não com menos importância, agradeço aos meus amigos de vida, graduação, departamento e claro, a Giovana que com o seu “cafezinho” e sua dedicação deixavam os dias mais leves no departamento.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo.”

Paulo Freire

PRÓLOGO

A realização do presente projeto de mestrado disponibilizou a elucidação da ação farmacológica de um composto natural presente em diferentes espécies de plantas para a utilização em indivíduos magros e obesos. Ao decorrer da execução do projeto, foram realizadas atividades complementares de difusão e popularização do conhecimento, a fim de enriquecer a formação científica e pessoal do aluno.

Trabalho publicação em periódicos

- Perico, L. L. ; **Emílio-Silva, Maycon T.** ; Ohara, R. ; Bueno, G. ; Rodrigues, V. P. ; Rocha, L. R. M. ; Barbosa Filho, J. M. ; Batista, L. M. ; Hiruma-Lima, C. A. Systemic Analysis of Monoterpenes Advances in the Management of Peptic Ulcer and *Helicobacter pylori*. Biomolecules, DOI: 10.3390/biom10020265, (Fator de impacto: 4.694), MDPI.

Trabalhos apresentados em forma de painel em eventos científicos

- Borges, G. S. ; **Emílio-Silva, Maycon T.** ; Branco, L. G. S. Efeito do citral sobre a hipotensão induzida pela endotoxemia. XXII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, Ribeirão Preto, SP, 2018.
- **Emílio-Silva, Maycon T.** ; Rodrigues, V. P. ; Ohara, R. ; Bueno, G. ; Branco, Luiz G. S. ; Rocha, L. R. M. ; Hiruma-Lima, C. A. The cryogenic role of citral in systemic inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) in high fat-fed obese mice. Fifth International Symposium on Inflammatory Diseases 2019 - INFLAMMA V, Ribeirão Preto, SP, 2019.
- Bueno, G. ; Perico L, L. ; Rodrigues, V. P. ; Ohara, R. ; **Emílio-Silva, Maycon T.** ; Rocha, L. R. M. ; Basten, M. A. ; Nunes, D. The role of essential oil *Baccharis trimera* in experimental ulcer disease: characterization of anti-inflammatory and healing mechanisms of action. 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.
- Hiruma-Lima, C. A. ; Perico, L. L. ; **Emílio-Silva, Maycon T.** ; Ohara, R. ; Bueno, G. ; Rodrigues, V. P. ; Rocha, L. R. M. ; Barbosa Filho, J. M. ; Batista, L. M. . Monoterpenes: systemic review about the advances in the management of peptic ulcer and *Helicobacter pylori*. 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

- **Emílio-Silva, Maycon T.;** Santos, R. C. ; Rodrigues, V. P. ; Perico L, L. ; Rocha, L. R. M. ; Hiruma-Lima, C. A. . Antidiarrheal activity of Limonene and *Citrus aurantium L.* on an experimental model of castor oil-induced in mice. 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.
- **Emílio-Silva, Maycon T.;** Rodrigues, V. P. ; Bueno, G. ; Ohara, R. ; Rocha, L. R. M. ; Branco, L. G. S. ; Hiruma-Lima, C. A. Citral reduced levels of plasmatic TNF-alpha in mice fed with standard diet (SD) and high-fat diet (HFD) following LPS-induced systemic inflammation. 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

Participação em eventos científicos

- XXII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, Ribeirão Preto, SP, 2018.
- Simpósio Anual da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, SP, 2018.
- Workshop "Redação de Patentes, Além dos Guias + Oficinas Práticas". Botucatu, SP, 2019.
- Simpósio Anual da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Botucatu, SP, 2019.
- Fifth International Symposium on Inflammatory Diseases 2019 - INFLAMMA V, Ribeirão Preto, SP, 2019.
- 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

Cursos realizados

- Minicurso: “Domine sua pipeta por dentro e por fora.” Botucatu, SP, 2019. Duração de 2 horas.
- Minicurso: “Empreendedorismo em produtos naturais” durante 7th Brazilian Conference on Natural Product/XXXIII RESEM, Rio de Janeiro, RJ, 2019. Duração de 4 horas.

Extensão universitária

- Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, Botucatu, SP, 2018. Duração de 48 horas.
- Emílio-Silva, M.T.; Rodrigues, V. P.; Perico, L. L.; Ohara, R.; Hiruma-Lima, C. A. Ministrou curso de curta duração no projeto de extensão “II Curso de Inverno de Farmacologia e Biotecnologia”, realizado pelo Programa de Pós-graduação de Farmacologia e Biotecnologia, no Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, Botucatu, SP. Duração de 4 horas.
- Monitor do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, Botucatu, SP, 2019. Duração de 48 horas.

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

Disciplinas cursadas

- Cultura celular animal – conceito A (3 créditos)
- Tópicos especiais em biologia geral e aplicada – conceito A (2 créditos)
- Programação fetal: do ambiente uterino ao envelhecimento da prole – conceito A (1 crédito)
- Interação entre pós-graduação e o ensino básico de ciências e biologia – conceito A (6 créditos)
- Bioestatística usando ambiente estatístico R – conceito A (4 créditos)
- O cientista e o professor universitário – conceito A (2 créditos)

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácido graxos insaturados livres
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
AP	Área postrema
AST	Aspartato aminotransferase
AVPO	Área Pré-óptica do hipotálamo
COX	Ciclooxigenase
DP	Dieta padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
HFD	<i>High fat diet</i> – Dieta hiperlipídica
i.p.	Intraperitoneal
IBU	Ibuprofeno
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NTS	Núcleo do trato solitário
OVLT	Órgão vascular da lâmina terminal
PGE₂	Prostaglandina E ₂

SFO	Órgão subfornical
SNC	Sistema nervoso central
Tc	Temperatura corporal
Tci	Temperatura corporal inicial
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
γ-GT	Gama-glutamil transferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho Experimental do protocolo 1: indução de inflamação sistêmica pela administração i.p. de LPS (100 µg/kg) e observação durante 360 minutos.	29
Figura 2. Desenho Experimental do protocolo 2: indução de inflamação sistêmica pela administração i.p. de LPS (100 µg/kg) e observação durante 90 minutos.	30
Figura 3. Efeito do Citral na ΔTc de animais alimentados com DP e HFD no desafio imune com LPS.	33
Figura 4. Efeito do citral na concentração sérica de IL-1β (A), TNF-α (B), IL-6 (C) e leptina (D) após 90 minutos da injeção de LPS (100 µg/kg) em camundongos <i>Swiss</i> machos alimentados com dieta padrão (DP).	36
Figura 5. Efeito do citral na concentração sérica de IL-1β (A), TNF-α (B), IL-6 (C) e leptina (D) após 90 minutos da injeção de LPS (100 µg/kg) em camundongos <i>Swiss</i> machos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD).	38
Figura 6. Efeito do Citral na concentração hipotalâmica de mediadores pró-inflamatórios IL-1β (A), IL-6 (B) e TNF-α (C) de animais alimentados com dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (HFD) após injeção de LPS.	40
Figura 7. Avaliação macroscópica da mucosa gástricas de camundongos magros (DP) e obesos (HFD) após 360 min da injeção de LPS ou Salina.	44
Figura 8. Avaliação do efeito do citral em parâmetros do estresse oxidativo e inflamação local na mucosa gástrica de animais magros (DP) e obesos (HFD) após 360 minutos de injeção de LPS (100 µg/kg).	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise antropométrica de camundongos Swiss machos após 12 semanas de dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (HFD).	32
Tabela 2. Tci de animais alimentados com DP e HFD antes do tratamento com Tween 80 a 1%, Citral (25, 100 ou 300 mg/kg) ou IBU (100 mg/kg)..	33
Tabela 3. Interferência da dieta no índice térmico de animais tratados com Tween 80 a 1%, Citral (25, 100 ou 300 mg/kg) ou IBU (100 mg/kg) e observados no período de 60 a 120 minutos após a injeção de LPS..	35
Tabela 4. Efeito do Citral na concentração sérica de mediadores pró-inflamatórios (IL-1β, IL-6 e TNF-α) e leptina de animais alimentados com dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (HFD) após 90 minutos da injeção de LPS.	38
Tabela 5. Efeito do citral em parâmetros bioquímicos para determinação função metabólica de glicose e função renal em animais alimentados com dieta padrão (DP) e hiperlipídica (HFD).	41
Tabela 6. Efeito do citral em parâmetros bioquímicos para determinação de função hepática em animais alimentados com dieta padrão (DP) e hiperlipídica (HFD).	42

RESUMO

A obesidade é considerada um problema de saúde pública, que tem crescido em diversos países pelo mundo. A ingestão de uma dieta rica em gordura leva a um progressivo aumento de tecido adiposo e desencadeia alterações na modulação do sistema imunológico, elevando a concentração de fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-6 e leptina, considerados biomarcadores inflamatórios sistêmicos. O processo inflamatório crônico associado ao quadro de obesidade aumenta a suscetibilidade a infecções, e resulta em alterações na homeostasia do hospedeiro capaz de promover respostas efetoras a fim de protegê-lo do patógeno. Uma das principais respostas desencadeadas pelo processo inflamatório é variação da temperatura corporal (Tc), devido a produção de mediadores inflamatórios periféricos e centrais, tais como interleucina (IL)-1 β , IL-6, TNF- α . Visando minimizar os efeitos danosos da inflamação sistêmica, medicamentos como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são empregados na terapêutica atual, porém o uso indiscriminado e crônico pode causar danos significativos aos usuários, como a formação de úlceras gástricas. O presente projeto avalia a ação do citral, um monoterpene encontrado na composição de diferentes óleos essenciais de plantas medicinais. A literatura já relata a ação anti-inflamatória, antipirética e anti-hiperlipidêmica do citral. Porém, não são descritos a ação do citral na inflamação sistêmica induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos eutróficos e obesos. Para isso, utilizados camundongos *Swiss* machos, alimentados durante 12 semanas com dieta padrão (DP) e hiperlipídica (HFD) e posteriormente, avaliamos a ação do citral (25, 100 e 300 mg/kg) na inflamação sistêmica induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de LPS. Após a administração de LPS, obtivemos os dados da Tc e dosagens de marcadores bioquímicos no soro, no hipotálamo e na mucosa gástrica. Nossos resultados comprovam a indução da obesidade pela HFD durante 12 semanas, com o significativo aumento do peso corporal e do tecido adiposo (epididimal, retroperitoneal e visceral) e alguns órgãos (fígado, baço e rins), quando comparado com os animais DP. O tratamento dos animais com citral promoveu ação dose dependente no perfil da Tc, tanto em animais DP quanto HFD. O índice térmico dos animais tratados com citral (300 mg/kg) foi significativamente menor nos animais obesos tratados com a HFD quando comparado aos animais DP, indicando uma efetiva ação criogênico desse monoterpene no grupo obeso. O tratamento dos camundongos com citral causou redução na sinalização inflamatória periférica de TNF- α em animais DP e HFD, além de reduzir a concentração sérica de leptina em animais HFD após o desafio com LPS no período de 90 minutos. No sistema nervoso central (SNC), o citral atua reduzindo a concentração de IL-6 no hipotálamo de animais HFD. Também caracterizamos parâmetros bioquímicos renais (uréia e creatinina) e hepáticos (AST, ALT, fosfatase alcalina e γ -GT) de animais expostos ao LPS e tratados com citral ou ibuprofeno (IBU), um AINEs clássico. Os parâmetros bioquímicos indicam que a dieta HFD reduziu os níveis de fosfatase alcalina dos animais obesos em comparação aos animais DP. O citral (100 mg/kg) também reduziu os níveis de fosfatase alcalina dos animais DP e elevou os níveis de ALT nos animais HFD em comparação com seus respectivos animais controle (tratados com Tween 80 + Salina). Na mucosa gástrica dos animais DP e HFD tratados com citral ou IBU não houve alterações dos níveis de marcadores para estresse oxidativo (malondialdeído - MDA e glutathiona reduzida - GSH), assim como de inflamação local (mieloperoxidase - MPO). O citral atua de forma efetiva durante a inflamação sistêmica, com ação diferenciada em animais HFD quando comparado com DP.

Palavras-chave: Obesidade, inflamação sistêmica, LPS, citral.

ABSTRACT

Obesity is considered a public health problem, which has growing in many countries around the world. Ingestion of a rich fat diet leads to a progressive increase in adipose tissue and triggers changes in immune system modulation, increasing the concentration of systemic biomarkers such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and leptin. The low-grade chronic inflammation associated with obesity increases the susceptibility to infections, which results in changes in host homeostasis capable of promoting effector responses in order to protect it from the pathogen. One of the main responses triggered during the systemic inflammation is the body temperature variation, defined as a controlled increase in T_c due to the production of peripheral and central inflammatory mediators such as systemically produced IL-1 β , IL-6, TNF- α . In order to minimize the harmful effects of systemic inflammation, drugs such as non-steroidal anti-inflammatories drugs (NSAIDs) are used in current therapy, but the indiscriminate and chronic use can cause significant harm to users, such as the formation of gastric ulcers. This project presents data on the action of citral, a monoterpene found in different essential oils of medicinal plants with anti-inflammatory action, antipyretic and antihyperlipidemic reported in the literature. For this, we used male Swiss mice, fed for 12 weeks with standard diet (SD) and high-fat diet (HFD). We evaluated the action of citral (25, 100 and 300 mg/kg) on LPS-induced systemic inflammation. After LPS-injection intraperitoneal i.p., we obtained T_c data and collected samples of serum and gastric mucosa for biochemical and molecular dosages. Our results confirm the induction of obesity with HFD, with the significant increase in body weight and adipose tissue (epididymal, retroperitoneal and visceral) and organs (liver, spleen and kidneys) when compared with SD mice. Citral showed dose dependent action on body temperature profile in animals SD and HFD. The thermal index of citral-treated animals (300 mg/kg) was significantly lower in HFD-treated obese animals when compared to SD animals, indicating an effective cryogenic action of this essential oil in the obese group. Citral treatment reduced the peripheral inflammatory signaling of TNF- α in SD and HFD animals and reduced the plasma leptin concentration in HFD animals after LPS challenge by 90 minutes. Also, the citral reduced the concentration of IL-6 levels in the hypothalamus of obese mice. We also characterize renal (urea and creatinine) and hepatic (AST, ALT, alkaline phosphatase and γ -GT) biochemical parameters of animals exposed to LPS and treated with citral and ibuprofen (IBU), a classic NSAIDs. Biochemical parameters indicate that the HFD diet reduced the alkaline phosphatase levels of obese animals compared to SD animals. Citral (100 mg/kg) also reduced the alkaline phosphatase levels of the SD animals and raised the ALT levels in the HFD animals compared to their respective control animals (Tween 80 + Saline). In the evaluation of gastric mucosa of SD and HFD animals treated with citral or IBU it was possible to characterize that there was no change in the levels of markers for oxidative stress (malondialdehyde - MDA and reduced glutathione - GSH) and local inflammation (myeloperoxidase - MPO). The results obtained so far demonstrate that the citral acts to effectively reduce body temperature during systemic inflammation, with a different action profile in HFD animals when compared to SD.

Keywords: Obesity, systemic inflammation, LPS, citral.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
OBJETIVOS	23
Objetivo geral.....	23
Objetivos específicos.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS	24
Animais.	24
Dieta hiperlipídica para indução de obesidade.....	24
Drogas.	25
Cirurgia.....	25
Registro da Tc.	25
Obtenção dos tecidos para análises antropométrica e moleculares.	26
Processamento dos encéfalos.	26
Dosagem de citocinas séricas e hipotalâmicas.	26
Dosagem de leptina sérica.	27
Dosagem de PGE ₂ na AVPO.....	27
Análises bioquímicas.....	27
Análise do estômago.	27
Protocolos experimentais.	28
Análise dos resultados.	30
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO 1: PROTOCOLO N° 1080-CEUA	63
ANEXO 2: Tabela da composição da dieta padrão e hiperlipídica.	64
ANEXO 3: Tabela com valores de leitura de PGE ₂ na AVPO após 90 min de indução de inflamação sistêmica com LPS em animais dieta padrão (DP) e hiperlipídica (HFD).....	65

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, casos de sobrepeso e obesidade tem crescido em todo o mundo. Em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 1,9 bilhões de adultos se encontravam com sobrepeso e destes, 650 milhões são obesos (WHO, 2018). A obesidade é uma condição complexa e multifatorial advinda de fatores genéticos e/ou ambientais, que afeta todas as faixas etárias e grupos socioeconômicos (WHO, 2018). O sobrepeso e a obesidade são marcados pelo significativo aumento do efeito anabólico que leva a um progressivo aumento de tecido adiposo (visceral, perivascular e/ou subcutâneo) e desencadeia alterações na modulação do sistema imunológico (GUZIK et al., 2017). Uma dieta desbalanceada com alto teor de gordura acarreta no acúmulo excessivo de gordura corporal causando um desequilíbrio energético crônico, que resulta em um quadro de obesidade (MORTON et al., 2006). Além disso, indivíduos obesos apresentam alto risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas, como a diabetes *mellitus* tipo 2, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares (DE HEREDIA; GÓMEZ-MARTÍNEZ; MARCOS, 2012; SCULLY, 2014).

A progressiva ingestão de ácidos graxos e carboidratos proporciona o aumento na quantidade e tamanho de adipócitos (GENUTH, 1976), fator que aumenta a quantidade de ácidos graxos livres (AGL), que induz a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios (FAIN et al., 2004) que atuam na circulação periférica e alcançam regiões centrais, proporcionando danos em regiões hipotalâmicas (ARAUJO et al., 2016). O processo inflamatório é desencadeado pela ativação do receptor do tipo *Toll* (TLR)-4 ou pelo estresse reticular endoplasmático que desencadeia a produção de citocinas e adipocinas (MILANSKI et al., 2009) principalmente, o TNF- α e a IL-6 que podem ser detectados e sistematicamente utilizados como biomarcadores da inflamação metabólica resultante da obesidade (TILG; MOSCHEN, 2006). Os altos níveis de AGL ativam células micróglia, que desempenham importante papel na manutenção de condições favoráveis para neurônios no sistema nervoso (MALDONADO-RUIZ et al., 2017). As células da glia, como os macrófagos residentes (micróglia) e astrócitos, quando ativados, expressam mediadores inflamatórios através da

translocação nuclear e fosforilação da subunidade p65 do fator nuclear kappa B (NF- κ B), induzindo a morte neuronal e também inflamação de regiões hipotalâmicas (THALER et al., 2012; MALDONADO-RUIZ et al., 2017).

Ao longo do tempo, o processo inflamatório hipotalâmico advindo da obesidade, induz menor responsividade dos neurônios moduladores do controle da ingestão alimentar e gasto energético (controle da massa corporal) (MAFFEI et al., 1995), o que torna ineficaz a ação do hormônio leptina que é expresso por adipócitos do tecido adiposo branco e é responsável por tal mecanismo de regulação (CAVADAS et al., 2016). Em indivíduos obesos é comum encontrar altas concentrações séricas de leptina devido a sua menor responsividade e ao quadro de resistência (MAFFEI et al., 1995). A leptina também apresenta um importante papel imunomodulatório, sendo demonstrado o seu envolvimento na patogênese de diversas doenças autoimunes, como por exemplo, na artrite reumatóide e colite (LAM; LU, 2007). Outra função desse peptídeo é sua contribuição para resposta de febre mais duradoura e de maior magnitude em ratos obesos após administração de LPS (POHL; WOODSIDE; LUHESHI, 2014). Além disso, quando administrada de forma exógena, a leptina é capaz de aumentar a temperatura corporal de ratos eutérmicos durante a fase de hipotermia e atenuar a hipotensão durante o choque endotoxêmico induzido por LPS ao reduzir a concentração de TNF- α (FLATOW et al., 2017).

Diante da inflamação crônica de baixo grau associada ao quadro de obesidade (HOTAMISLIGIL, 2006; MINIHANE et al., 2015), estudos tem demonstrado que pessoas obesas apresentam maior vulnerabilidade pós-operatória à infecções. Modelos experimentais pré-clínicos tem reproduzido tal suscetibilidade utilizando animais obesos por HFD (SMITH et al., 2007). Pohl e colaboradores (2009) descreveram que ratos obesos por HFD apresentam febre induzida por LPS de maior magnitude e mais prolongada, além do aumento nas concentrações séricas de mediadores inflamatórios periféricos tais como IL-6 e TNF- α e também uma maior produção de leptina (POHL;

WOODSIDE; LUHESHI, 2009). As endotoxinas, como o LPS, desempenham papel crucial na indução das diversas alterações endócrinas, autonômicas e comportamentais o qual resulta em resposta de febre, hipotermia, perda de apetite e sonolência (ROMANOVSKY et al., 1996). Por convenção, as alterações causadas pela infecção de um agente patogênico que desencadeiam respostas fisiológicas a fim de protegê-los dos efeitos danosos desse invasor são intituladas como *sickness syndrome* (KOZAK; CONN; KLUGER, 1994; ROMANOVSKY et al., 1996; ELMQUIST; SCAMMELL; SAPER, 1997), quadro esse mais exacerbado e prolongado em camundongos obesos (LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012). Essas respostas podem ser temporalmente divididas em “fase aguda” e “fase tardia”, a primeira é conhecida como restritiva ao dano e a segunda como promotora de reparo tecidual (BLATTEIS; SEHIC; LI, 2000). Dentre as diferentes respostas da fase aguda, a mais predominante e conservada evolutivamente é a variação da Tc, a hipertermia (febre) ou hipotermia (BLATTEIS; SEHIC; LI, 2000; BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014), que são utilizados como marcadores (“Hallmark”) na atividade clínica, tanto em humanos como também em animais experimentais.

A febre é definida como um aumento controlado na temperatura corporal (Tc) e Kluger (1991) demonstrou a importância da resposta febril como benéfica, baseando-se em experimentos com lagartos em um gradiente de temperatura. Já a hipotermia é descrita como uma resposta adaptativa quando a febre deixa de atuar como benéfica para a sobrevivência do indivíduo (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018). O modelo mais usado e aceito para reproduzir experimentalmente uma resposta termorregulatória (febre ou hipotermia) em camundongos e demais roedores é a injeção intraperitoneal (i.p.) de LPS, que é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas (KLUGER, 1991). Uma resposta termorregulatória provocada pelo LPS é associada diretamente a dose que é administrada nos animais experimentais, sendo uma dose baixa (0.5-100 µg/kg) capaz de induzir o aumento da Tc (febre) e uma dose mais elevada (1-10 mg/kg)

induz uma resposta de hipotermia seguida de febre (ROMANOVSKY et al., 2005; RUDAYA et al., 2005). A composição do LPS pode estar diretamente associada a estes efeitos, devido a presença de moléculas de polissacarídeos, lipídeos e proteínas em sua constituição. Sua porção lipídica, denominada Lipídeo A, capaz de estimular os macrófagos a produzirem mediadores inflamatórios protéicos, lipídicos e radicais livres (PŁÓCIENNIKOWSKA et al., 2015). Dentre os mediadores inflamatórios destacam-se as citocinas: TNF- α , IL-1 β e IL-6 (BLATTEIS; SEHIC, 1997; NETEA; KULLBERG; VAN DER MEER, 2000). A PGE₂, PGD₂, tromboxana A₂ e o fator de ativação plaquetária são considerados os principais mediadores inflamatórios lipídicos (STEINER; BRANCO, 2002; ROMANOVSKY et al., 2005; BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014).

A produção de citocinas periféricas suscita a sinalização em regiões superiores no sistema nervoso central (SNC) que estão envolvidas com a resposta de termorregulação, o que gera o estado de aumento controlado da Tc para otimizar a ação do sistema imunológico e inviabilizar a ação do agente invasor (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014). São quatro as vias conhecidas e delineadas para comunicação com o SNC, não necessariamente excludentes entre si: 1) fibras aferentes que trafegam pelo nervo vago e fazem suas primeiras sinapses no núcleo do trato solitário (NTS) (BLATTEIS; SEHIC; LI, 2000); 2) Órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), órgão subfornical (SFO) e área postrema (AP), que apresentam região de maior permeabilidade na barreira hematoencefálica e promove comunicação entre sistema imunológico e SNC (HARE; CLARKE; TOLCHARD, 1995; TAKAHASHI et al., 1997); 3) interação das citocinas com células localizadas na interface hematoencefálica, p.ex., células endoteliais (TILDERS et al., 1994) e perivasculares (ELMQUIST; SCAMMELL; SAPER, 1997); e/ou 4) transporte ativo das citocinas pela barreira hematoencefálica (BANKS; KASTIN; BROADWELL, 1995). Essas vias aferentes transportam os sinais pirogênicos para a AVPO, no qual a informação aferente é integrada e uma resposta efetora apropriada é elaborada (BOULANT, 1998). A PGE₂ age nos neurônios termossensíveis da AVPO,

alterando suas sensibilidades, e, assim, desencadeando a resposta febril (BLATTEIS; SEHIC, 1998). Entretanto, uma resposta exacerbada e prolongada pode causar diversas consequências, como alterações hemodinâmicas, danos teciduais graves e também disfunção de órgãos, que se perpetuadas e se não tratadas podem levar o paciente ao óbito (SGANGA, 2015).

A terapêutica atual utilizada para combater a resposta de febre, devido a inflamação sistêmica, é administração de AINEs, como por exemplo o ibuprofeno (IBU), que atua inibindo a ação das enzimas ciclooxigenase (COX)-1 e COX-2, responsáveis pela conversão do ácido araquidônico e biossíntese de prostaglandinas (PG) (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007). A isoforma COX-1 é constitutivamente expressa em diversos tecidos, como no estômago exercendo papel protetor e estimula a síntese e secreção de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo elevado, promovendo a proliferação epitelial, fatores responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica. A enzima COX-2 tem sua atividade regulada de forma induzida por estímulos inflamatórios, e desempenha um importante papel na cicatrização de úlceras gástricas (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008; SOSTRES et al., 2010; GOMES SILVA; DE SOUS, 2011).

No entanto, nos últimos anos devido ao uso indiscriminado e cada vez mais frequente de AINEs não específicos tem elevado a incidência de úlceras gástricas devido à redução na produção de PGE₂, angiogênese, conseqüentemente diminuindo fatores protetores e antioxidantes, além de aumentar o estresse oxidativo no tecido gástrico (ULEYMAN; AY; ALTINKAYNAK, 2002). Importantes indicadores do estresse oxidativo em modelos de úlcera gástrica são os níveis de glutathiona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA) e mieloperoxidase (MPO). O estresse causado pela formação de úlceras leva a diminuição nos níveis de GSH, aumento dos níveis MDA na mucosa gástrica, resultado da oxidação tecidual após a administração de AINEs (FORNAI et al., 2005; MEI et al., 2013). Os níveis elevados da enzima MPO ocorre devido a maior infiltração de neutrófilos durante o processo inflamatório causado pela lesão ulcerogênica, que são responsáveis pela oxidação

de íon cloreto por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para formação de ácido hipocloroso (HClO), uma espécie reativa de oxigênio potente (EROs) (LI et al., 2011). Portanto, é de grande relevância a busca de novos fármacos que combatam a resposta inflamatória sistêmica oriunda da obesidade bem como minimizem os efeitos adversos decorrentes de seu tratamento.

Os produtos naturais apresentam grande importância como fonte de biomoléculas com ação farmacológica, principalmente os de origem vegetal que também servem como modelo para síntese de novas alternativas terapêuticas (GURIB-FAKIM, 2006; RISHTON, 2008). Os óleos essenciais existentes em plantas são ricos em substâncias com grande atuação farmacológica sendo investigados por diversos grupos de pesquisas. Dentre as diferentes substâncias destaca-se o citral, que é uma mistura racêmica de monoterpenóides (neral e geranial) presente na composição do óleos essenciais de diversas espécies de plantas como *Zingiber officinale* (gengibre) (MANGPRAYOOL; KUPITTAYANANT; CHUDAPONGSE, 2013) e *Cymbopogon citratus* (Capim limão) (NISHIJIMA et al., 2014). Suas ações antifúngica, antibacteriana, antitumoral, analgésica e anti-inflamatória já foram descritas em diversos modelos experimentais (LEE et al., 2008; SHEN; SUN; GUO, 2015; KAPUR et al., 2016).

Estudos tem demonstrado que a administração crônica de citral em camundongos obesos induzidos por HFD reduz o acúmulo abdominal de lipídeos, com significativa redução no peso corporal por um possível aumento na produção energética oriundo do metabolismo, devido a uma ação anti-hiperlipidêmica do citral que reduziu os níveis séricos de AGLs, triglicerídeos e colesterol total (MODAK; MUKHOPADHAYA, 2011). Além disso, Lai e colaboradores (LAI et al., 2016), investigaram o efeito hepatoprotetor do citral, que exibiu atividade protetora contra o dano causado por HFD em um modelo de doença hepática não-alcoólica (doença associada a obesidade), mediada por redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório. Outros trabalhos descrevem o papel imunomodulatório do citral na supressão da expressão de COX-2 *in vitro* (KATSUKAWA et al.,

2010) e também em modelo de peritonite induzida por LPS em ratos, no qual o citral foi capaz de reduzir a expressão de NF- κ B, moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) e reduzir a concentração das citocinas TNF- α e IL-8 (SONG et al., 2016). Em um trabalho publicado por nosso grupo, demonstramos que o citral foi capaz de diminuir a liberação de mediadores inflamatórios endógenos, como o glutamato, prostanóides, óxido nítrico (NO) e citocinas, moléculas cruciais na sinalização nociceptiva em um modelo de dor crônica em camundongos (NISHIJIMA et al., 2014). O citral ainda atua na inibição da liberação de NO por meio da redução da produção e expressão de iNOS (enzima responsável por sua síntese) diante de injúria e ativação do sistema imune como resposta inflamatória a diversos patógenos (LEE et al., 2008). Nosso grupo demonstrou também que o citral apresenta ação antipirética, em ratos eutróficos, sendo capaz de reduzir a Tc na febre induzida por injeção i.p. de LPS devido à redução da concentração de citocinas plasmáticas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e PGE₂ (plasmático e na AVPO) (EMÍLIO-SILVA et al., 2017). Entretanto, apesar dos importantes achados do papel do citral como efeito anti-hiperlipidêmico, anti-inflamatório e antipirético, a nossa hipótese de estudo é caracterizar a ação do citral tanto em animais alimentados com uma dieta padrão (eutróficos, controle) quanto a uma dieta hiperlipídica e ambos submetidos a indução da inflamação sistêmica (por LPS).

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a ação do citral durante a inflamação sistêmica induzida por dose baixa de LPS (100 μ g/kg) em camundongos alimentados com DP e HFD.

Objetivos específicos:

- (1) Analisar e comparar a temperatura corporal de camundongos magros (DP) e obesos (HFD) tratados com citral frente a inflamação sistêmica induzida por LPS;
- (2) Elucidar os mecanismos envolvidos na modulação da sinalização durante uma resposta termorregulatória induzida por LPS envolvendo mediadores inflamatórios periféricos como citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e leptina;
- (3) Analisar a concentração de mediadores inflamatórios hipotalâmicos (IL-1 β , IL-6, TNF- α) em animais eutróficos ou obesos que receberam LPS ou Salina;
- (4) Avaliar a produção de PGE₂ na AVPO após a indução com LPS em animais DP e HFD;
- (5) Avaliar parâmetros relacionados a inflamação e estresse oxidativo na mucosa gástrica de camundongos expostos a dose baixa de LPS e tratados com citral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, livre de patógenos (com idade de cinco a seis semanas, para início de ingestão das diferentes dietas), adquiridos do CPPA - Centro de Pesquisa e Produção de Animais (Botucatu, SP). Estes animais foram mantidos em caixas com 6-7 animais, sob temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12/12 horas e com livre acesso à água filtrada e ração. Todos os protocolos experimentais realizados por este projeto foram aprovados pelo CEUA (Comitê de Ética Uso de Animal) do Instituto de Biociências, UNESP, sob nº 1080-CEUA (ANEXO 1).

Dieta hiperlipídica para indução de obesidade. Após a chegada dos animais ao biotério setorial, separamos em dois grupos para oferta de dieta padrão (DP; Presence Alimentos, Paulínia, SP, Brasil) ou da dieta com alto teor de lipídeos (*High-fat diet*; HFD). Ambos foram alimentados a

vontade durante 12 semanas. A dieta hiperlipídica empregada apresenta sua fonte calórica advinda de 60% de lipídios (diferente da dieta padrão que apresenta 15%) (LIMA, 2018), e os insumos foram adquiridos da empresa PragSoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil (ANEXO 2).

Drogas. O citral (adquirido por Sigma, St.Louis, MO, EUA) foi diluído em solução de Tween 80 a 1% e a administração realizada em dose única pela via oral (p.o.) por gavagem, na dose de 25, 100 e 300 mg/kg de peso corporal (NISHIJIMA et al., 2014). Como AINEs, foi utilizado o IBU na dose de 100 mg/kg (SAPER; ROMANOVSKY; SCAMMELL, 2012; OSMAN et al., 2017). O lipopolissacarídeo (LPS) (obtido a partir de *E. coli*, sorotipo 0111:B4, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi dissolvido em salina estéril livre de pirógenos. A administração foi realizada na dose de 100 µg/kg (1 mL/kg) via intraperitoneal (STEINER; BRANCO, 2002; LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012).

Cirurgia. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados 84 dias após o início da oferta de DP e HFD. As cirurgias foram realizadas sob anestesia profunda com uma mistura de ketamina (87,5 mg/kg) e xilazina (12,5 mg/kg), administrados intraperitonealmente com volume final de 1 mL/kg, sempre que necessário os animais receberam suplementação de anestésico. Para a implantação do sensor (*'datalogger'*) de temperatura na cavidade peritoneal (SubCue, Calgary, AB, Canadá) foi feita uma laparotomia mediana. Após a cirurgia, foram administrados doses de antibiótico (160.000 U/kg de benzilpenicilina, 33,3 mg/kg de estreptomicina e 33,3 mg/kg de dihidroestreptomicina; 1 mL/kg, intramuscular) e analgésico (Flunixin meglumina; 2,5 mg/kg, 1 mL/kg, subcutâneo) e os animais foram remanejados para caixas individuais. O protocolo experimental, com a realização dos tratamentos e registro da Tc foi realizado 3 dias depois das cirurgias.

Registro da Tc. A Tc dos animais foi registrada durante todo o experimento pelo sensor de temperatura (*'datalogger'*; SubCue™, Calgary, AB, Canadá) inserido por incisão na cavidade

peritoneal antes do protocolo experimental. A Tc foi adquirida em intervalos de 5 minutos durante todo o experimento (1 h antes e 6 h depois da administração de LPS). A média dos valores de Tc inicial de cada grupo experimental foram obtidos desde 30 minutos que antecedem a manipulação experimental dos animais, servindo para a determinação da variação da temperatura corporal (ΔTc), durante 390 minutos.

Obtenção dos tecidos para análises antropométrica e moleculares. Finalizado os experimentos de registro de Tc, os animais foram eutanasiados para remoção dos encéfalos, coleta do sangue, tecidos adiposos, fígado, baço, rim e coração. Os encéfalos foram congelados por imersão em isopentano resfriado em gelo seco e armazenado à -80°C para a posterior dosagem de mediadores inflamatórios hipotalâmicos e PGE_2 . O sangue foi coletado utilizando tubos contendo gel separador para que pudesse obter o soro. O material foi devidamente armazenado à temperatura de -80°C até a caracterização bioquímica. Os demais tecidos, como tecidos adiposos, fígado, baço, rim e coração foram pesados para análise antropométrica e igualmente armazenados para posterior análises moleculares.

Processamento dos encéfalos. Para a dosagem de citocinas hipotalâmicas e PGE_2 na AVPO, os encéfalos ainda congelados foram cortados utilizando a matriz para encéfalo, respeitando a anatomia de regiões encefálicas, posicionando o órgão com os corpos mamilares voltados para cima, cortando na espessura de $1000\ \mu\text{m}$. Após o corte, as amostras foram homogenizadas em PBS 0.01M, pH 7,4 e PIC a 1%, na proporção de 1(amostra):9(PBS + PIC), utilizando as instruções de uso dos fabricantes.

Dosagem de citocinas séricas e hipotalâmicas. Para determinar os níveis de citocinas IL- 1β , TNF- α e IL-6 se utilizou kits para ensaio de Multiplex (*Magnetic Luminex Assay, mouse premixed*

Multi-Analyte Kit, N° CAT LXSAMSM-03, LOT L128468; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções de uso do fabricante.

Dosagem de leptina sérica. Para determinar os níveis séricos de leptina se utilizou kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Elabscience Biotechnology Inc., Houston, TX, EUA), seguindo as instruções de uso do fabricante.

Dosagem de PGE₂ na AVPO. Para determinar os níveis de PGE₂ na AVPO se utilizou kit de ensaio imunoenzimático (ELISA) (Elabscience Biotechnology Inc., Houston, TX, EUA), seguindo as instruções de uso do fabricante.

Análises bioquímicas. As funções bioquímicas séricas de glicose, ureia, creatinina, AST, ALT, fosfatase alcalina, GGT, colesterol, HDL, LDL, triglicerídeos, proteínas totais e albumina foram realizadas por química seca, através dos kits colorimétricos da BioClin (Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as instruções de uso do fabricante.

Análise do estômago. O tecido gástrico obtido após 360 minutos da injeção de LPS, foi analisado macroscopicamente. Posteriormente, o tecido foi processado e realizado a determinação bioquímica de MDA e GSH, marcadores do dano do estresse oxidativo e do mecanismo antioxidante, respectivamente. E a determinação de níveis de MPO foi realizada para caracterizar o processo inflamatório local, como descrito a seguir:

a. **Quantificação de MDA com modificações** (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). A peroxidação lipídica é determinada medindo a reação de substâncias do ácido tiobarbitúrico com amostras de estômago. Em tubos de ensaio foram adicionados 400 µL de água destilada, 200 µL de lauril 8.1%, 1500 µL de ácido acético 20% pH 3.5 e 1500 µL de ácido tiobarbitúrico (TCA) 0,8% diluído em ácido acético 20% e 400µL de amostra para a

reação colorimétrica. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi medida a 532 nm, e os resultados foram expressos em nmols de MDA/g de tecido.

b. Determinação de GSH. O conteúdo de glutathiona reduzida foi determinado utilizando a substância 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). A reação enzimática é constituída de 20 µl da amostra, 140 µl de NADPH, 5 µl de PBS e 20 µl DTNB. A absorbância foi determinada em 412 nm e os resultados expressos como nmol/g de tecido (ANDERSON, 1985).

c. Determinação da atividade da MPO. A determinação da atividade da MPO, um importante marcador da infiltração de neutrófilo, foi efetivado pelo método de Krawisz et al. (1984). As amostras foram solubilizadas com brometo hexadeciltrimetilamônio e sua atividade determinada através de um ensaio com O-dianisidina. A absorbância foi determinada em 450 nm na temperatura de 37°C, e os resultados foram expressos em unidade de MPO/g de tecido.

Protocolos experimentais.

A literatura reporta que a utilização de anestesia nos animais interfere nos resultados de termorregulação e recomenda que os estudos devem ser realizados, preferencialmente, sem a utilização de anestésicos (ADAMS et al., 2008). Outros aspectos importantes a serem considerados nesse tipo de estudo, durante a execução do modelo experimental, é o momento da realização do experimento e o estresse psicológico, fatores que exercem profundo impacto sobre o controle eutérmico da T_c (MORROW et al., 1993; JOHNSON et al., 2003; OKA, 2018). Por estas razões, durante a execução do procedimento não ocorreu a administração de anestésicos, os experimentos foram realizados sempre nos mesmos horários (entre as 8h e 16h) e os camundongos tiveram livre movimentação nas caixas de polipropileno durante todo o período experimental.

Protocolo 1. Os animais foram submetidos ao implante do *datalogger* e, três dias depois do procedimento cirúrgico, sofreram a indução da inflamação sistêmica por dose baixa de LPS. Para a realização do procedimento experimental os animais alimentados com DP ou HFD foram deixados em jejum de 8h e subdivididos em 5 grupos, que receberam respectivamente: o veículo - Tween 80 à 1% (10 mL/kg - controle negativo), Citral (25 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg) ou IBU (100 mg/kg - controle positivo). Decorridos 30 minutos após a administração do tratamento foi injetado i.p salina (1 mL/kg) ou LPS (100 µg/kg). Após 360 minutos os animais foram eutanasiados por decapitação, com o rompimento dos vasos cervicais para aquisição de dados do perfil da Tc e coleta de amostras teciduais para análises antropométrica e dosagens bioquímicas (Figura 1).

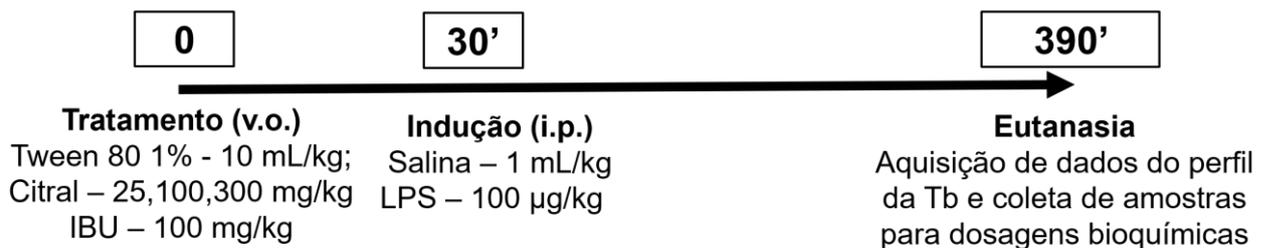


Figura 1. Desenho Experimental do protocolo 1: indução de inflamação sistêmica pela administração i.p. de LPS (100 µg/kg) e observação durante 360 minutos.

Protocolo 2. Foram utilizados animais alimentados com DP ou HFD durante 12 semanas. Como o protocolo 1, os animais foram submetidos a um jejum de 8h e subdivididos em 5 grupos, que receberam respectivamente: o veículo - Tween 80 a 1% (10 mL/kg - controle negativo), Citral (25 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg) ou IBU (100 mg/kg - controle positivo). Decorridos 30 minutos após a administração do tratamento foi injetado i.p salina (1 mL/kg) ou LPS (100 µg/kg) e passados 90 minutos da administração de LPS ou salina, os animais foram eutanasiados para coleta de soro e tecidos para análises moleculares (Figura 2).

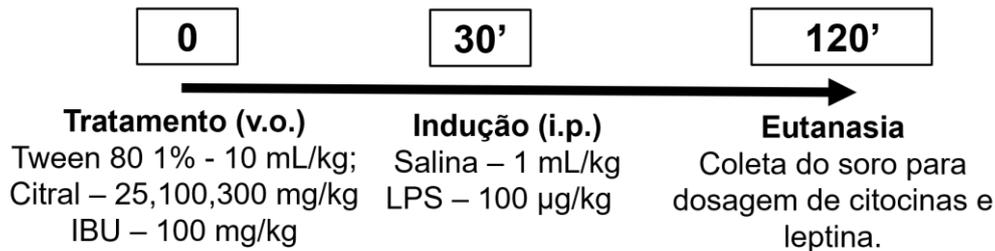


Figura 2. Desenho Experimental do protocolo 2: indução de inflamação sistêmica pela administração i.p. de LPS (100 µg/kg) e observação durante 90 minutos.

Nas 12hs que antecederam os protocolos experimentais, os animais foram aclimatados a uma temperatura ambiente de $30 \pm 1^\circ \text{C}$ e durante a realização de todo o protocolo de indução de inflamação sistêmica. A temperatura ambiente foi mantida nesse patamar por ser a temperatura caracterizada como a zona termoneutra de camundongos (RUDAYA et al., 2005).

Análise dos resultados.

Os resultados são apresentados em média \pm E.P.M. (erro padrão da média). Para determinação estatística de duas amostras com distribuição normal foi usado Teste t de *Student*. Foi utilizado a análise de variância (*one-way* ANOVA). As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de *post hoc* de Tukey. Utilizamos o teste de análise bidirecional de variância (*two-way* ANOVA), seguido do teste de *post hoc* de Bonferroni nas análises dos resultados no qual são apresentadas duas variáveis. Em todos os casos, as diferenças estatísticas foram consideradas em nível de significância mínima de $p < 0,05$ (5%).

RESULTADOS

Após a chegada dos camundongos *Swiss* machos provenientes do CPPA, ao nosso biotério setorial, os mesmos foram separados aleatoriamente em dois grupos. O peso corporal inicial de cada grupo (DP ou HFD) foi determinado e não houve diferença significativa ($p > 0.05$) entre os grupos

com relação ao peso corporal médio (DP = 30.00 ± 0.38 g vs HFD = 29.93 ± 0.26 g; Tabela 1). Ao final do período de 12 semanas, foi possível observar que os animais que receberam HFD apresentaram um aumento significativo no peso corporal final ($p < 0.05$) quando comparados aos animais que receberam a DP (DP = 40.49 ± 0.48 g vs HFD = 50.04 ± 0.52 g, Tabela 1). Após a eutanásia dos animais, houve um aumento significativo no peso absoluto do fígado (DP = 1.70 ± 0.03 g vs HFD = 2.19 ± 0.06 g), baço (DP = 0.12 ± 0.00 g vs HFD = 0.14 ± 0.01 g), rins (DP = 0.33 ± 0.01 g vs HFD = 0.29 ± 0.01 g), tecidos adiposos epididimal (DP = 0.85 ± 0.07 g vs HFD = 1.40 ± 0.04 g), retroperitoneal (DP = 0.32 ± 0.03 g vs HFD = 0.96 ± 0.05 g) e visceral (DP = 0.53 ± 0.04 g vs HFD = 1.32 ± 0.05 g) dos animais que receberam HFD. Entretanto, não foi observado diferença significativa no peso bruto do coração dos animais HFD em relação ao DP ($p > 0.05$). Quando avaliamos o peso relativo de cada órgão entre os dois grupos (DP e HFD) é possível observar as diferenças significativas entre os grupos com relação ao peso relativo dos rins (DP = 0.79 ± 0.02 % vs HFD = 0.55 ± 0.01 %), coração (DP = 0.56 ± 0.01 % vs HFD = 0.39 ± 0.01 %) e os tecidos adiposos epididimal (DP = 2.06 ± 0.15 % vs HFD = 2.75 ± 0.10 %), retroperitoneal (DP = 0.76 ± 0.06 % vs HFD = 1.89 ± 0.09 %), assim como, visceral (DP = 1.30 ± 0.08 % vs HFD = 2.57 ± 0.09 %). Porém, não foram observadas diferenças significativas nos valores do peso relativo do fígado e baço ($p > 0.05$). A indução de obesidade foi comprovada pela análise do índice de adiposidade corporal, observando que os animais HFD apresentaram um aumento significativo quando comparado com os animais que receberam DP (DP = 0.42 ± 0.03 % vs HFD = 0.72 ± 0.02 %). Adicionalmente, também foi observado aumento do peso corporal, dos órgãos e tecidos, que comprovam que a dieta hiperlipídica durante o período de 12 semanas foi eficaz na indução da obesidade.

Tabela 1. Análise antropométrica de camundongos Swiss machos após 12 semanas de dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (HFD). Todos os valores foram expressos com a Média \pm E.P.M com o número de animais indicados na tabela. A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. a = $p < 0.05$ e ns = Não significativo.

	DP (n=58)		HFD (n=72)	
Peso Corporal Inicial	30.00 \pm 0.38 g		29.93 \pm 0.26 g ^{ns}	
Peso Corporal Final	40.49 \pm 0.48 g		51.04 \pm 0.52 g ^a	
Índice de Adiposidade	0.42 \pm 0.03 %		0.72 \pm 0.02 % ^a	
	Peso Bruto (g)	Peso Relativo (%)	Peso Bruto (g)	Peso Relativo (%)
Fígado	1.70 \pm 0.03	4.18 \pm 0.06	2.19 \pm 0.06 ^a	4.28 \pm 0.10 ^{ns}
Baço	0.12 \pm 0.00	0.30 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01 ^a	0.28 \pm 0.01 ^{ns}
Rim	0.33 \pm 0.01	0.79 \pm 0.02	0.29 \pm 0.01 ^a	0.55 \pm 0.01 ^a
Coração	0.22 \pm 0.00	0.56 \pm 0.01	0.20 \pm 0.00 ^{ns}	0.39 \pm 0.01 ^a
Tec. Adip. Epididimal	0.85 \pm 0.07	2.06 \pm 0.15	1.40 \pm 0.04 ^a	2.75 \pm 0.10 ^a
Tec. Adip. Retroperitoneal	0.32 \pm 0.03	0.76 \pm 0.06	0.96 \pm 0.05 ^a	1.89 \pm 0.09 ^a
Tec. Adip. Visceral	0.53 \pm 0.04	1.30 \pm 0.08	1.32 \pm 0.05 ^a	2.57 \pm 0.09 ^a

No início da aquisição dos dados de Tc, durante o desafio imune com LPS, os animais experimentais não apresentaram diferença significativa na temperatura corporal inicial (Tci) que fosse observado entre os grupos e entre animais eutróficos e obesos (Tabela 2). Durante o desafio imune com LPS, os camundongos alimentados com DP e HFD tiveram suas Tc monitoradas durante todo o procedimento experimental (Figuras 3). Todos os animais que receberam DP apresentaram variação na Tc após o tratamento com citral. Observamos que os animais que receberam Citral (25, 100 e 300 mg/kg) obtiveram uma variação negativa durante o decurso temporal, principalmente após a administração do LPS (Figura 3A).

Tabela 2. Tci de animais alimentados com DP e HFD antes do tratamento com Tween 80 a 1%, Citral (25, 100 ou 300 mg/kg) ou IBU (100 mg/kg). Todos os valores são expressos com a Média \pm E.P.M. A significância estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey.

Temperatura Corporal Inicial (Tci, °C)							
	Tween 80 + Salina	Tween 80 + LPS	IBU + LPS	Citral 300 + Salina	Citral 25 + LPS	Citral 100 + LPS	Citral 300 + LPS
DP	35.66 \pm 0.25	36.06 \pm 0.30	35.84 \pm 0.56	36.06 \pm 0.22	35.98 \pm 0.15	36.58 \pm 0.29	36.26 \pm 0.26
HFD	35.73 \pm 0.23	36.36 \pm 0.31	36.01 \pm 0.25	36.08 \pm 0.25	36.21 \pm 0.26	36.42 \pm 0.31	36.56 \pm 0.16

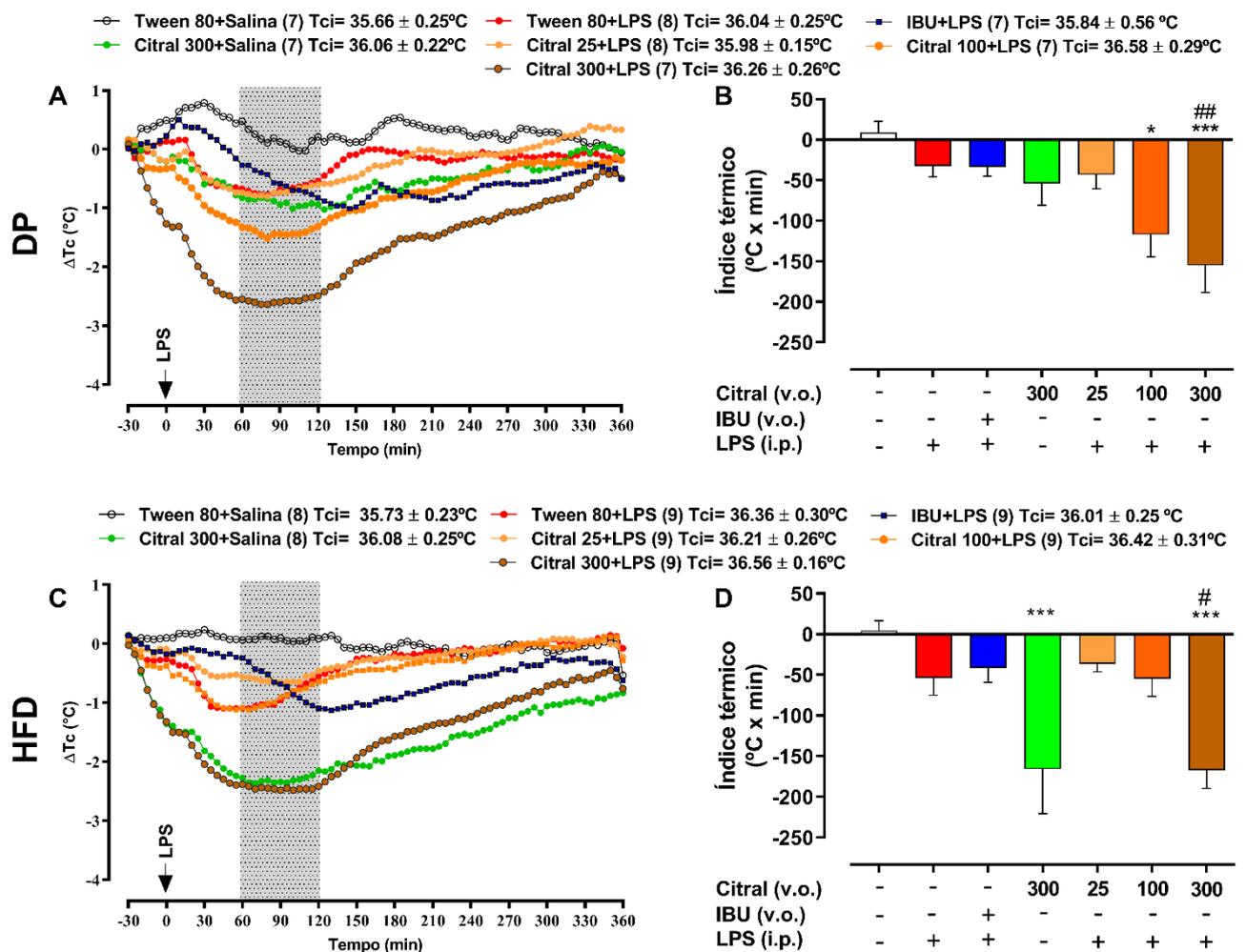


Figura 3. Efeito do Citral na ΔTc de animais alimentados com DP e HFD no desafio imune com LPS. Decurso temporal do efeito do Citral (25, 100 e 300 mg/kg), IBU (100 mg/kg) ou veículo (Tween 80 a 1%) seguido da administração de LPS (100 μ g/kg, i.p.) ou salina na Tc de animais alimentados com DP (A) e HFD (C). A área hachurada

representa o período selecionado para o cálculo do índice térmico. Índice térmico foi calculado a partir da área sob a curva durante período de 60 a 120 minutos em todos os grupos experimentais, em animais alimentados com DP (B) e HFD (D). O número de animais é apresentado entre parênteses acima na figura. Os dados são apresentados em média \pm E.P.M. A significância estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ vs Tween 80 + Salina; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs Tween 80 + LPS.

Para quantificar a magnitude da variação da Tc, foi calculado o índice térmico (Figura 3B) no período de 60 a 120 minutos (área hachurada na Figura 3A). Nesse gráfico, é possível observar que animais DP apresentaram uma redução significativa da temperatura corporal no grupo tratado com Citral 300 + LPS (-117.00 ± 27.45 °C x min) quando comparado com os animais DP que receberam Tween 80 + LPS (-32.70 ± 13.10 °C x min). Na indução da inflamação sistêmica em camundongos obesos (HFD) observamos que houve uma redução na Tc nos grupos Tween 80 + LPS, IBU + LPS, Citral 300 + Salina, Citral 25 + LPS, Citral 100 + LPS e Citral 300 + LPS em relação ao grupo Tween 80 + Salina, após a administração do tratamento (Figura 3C). Após o tempo de 60 minutos nota-se a diminuição da Tc de forma mais acentuada no grupo IBU+LPS, enquanto os demais grupos antes citados, iniciam a queda na temperatura a partir de 30 minutos (Figura 3C). Os grupos Citral 300 + Salina (-165.60 ± 55.07 °C x min) e Citral 300 + LPS (-167.10 ± 22.44 °C x min) apresentaram redução significativa no índice térmico (Figura 3D) durante o período de 60 à 120 minutos (área hachurada na Figura 3C) quando comparado com o grupo Tween 80 + Salina (4.66 ± 11.74 °C x min) e Tween 80 + LPS (-53.93 ± 20.96 °C x min), respectivamente. No grupo Citral 300 + Salina é significativamente menor o índice térmico de animais alimentados com dieta HFD quando comparado com os animais que receberam DP (DP = -54.31 ± 26.75 vs HFD = -165.60 ± 55.07 °C x min; Tabela 3). Esses resultados demonstram o efeito criogênico do Citral na dose de 300 mg/kg em camundongos alimentados com HFD, resultado não observado em animais alimentados com DP durante o período de 60 a 120 minutos.

Tabela 3. Interferência da dieta no índice térmico de animais tratados com Tween 80 a 1%, Citral (25, 100 ou 300 mg/kg) ou IBU (100 mg/kg) e observados no período de 60 a 120 minutos após a injeção de LPS. Os dados são apresentados em média \pm E.P.M. Para cada grupo foi usado n= 7-9 de animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental; sendo a = $p < 0.05$ e ns = Não significativo.

Grupos	Índice térmico ($^{\circ}\text{C} \times \text{min}$)	
	DP	HFD
Tween 80 + Salina	8.65 \pm 14.03	4.66 \pm 11.74 ^{ns}
Tween 80 + LPS	-32.70 \pm 13.10	-53.93 \pm 20.96 ^{ns}
IBU 100 + LPS	-33.42 \pm 11.80	-41.44 \pm 17.94 ^{ns}
Citral 300 + Salina	-54.31 \pm 26.75	-165.60 \pm 55.07^a
Citral 25 + LPS	-43.21 \pm 17.59	-36.40 \pm 9.84 ^{ns}
Citral 100 + LPS	-117.00 \pm 27.45	-54.70 \pm 21.68 ^{ns}
Citral 300 + LPS	-154.90 \pm 33.42	-167.10 \pm 22.44 ^{ns}

Para caracterizar o perfil da sinalização de mediadores inflamatórios durante a inflamação sistêmica induzida por dose baixa de LPS, foi determinada a concentração sérica de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e leptina, no tempo de 90 minutos de animais DP e HFD (Figuras 5 e 6, respectivamente). Em camundongos alimentados com DP (Figura 4), o grupo que recebeu o Tween 80 + LPS apresentou um aumento significativo na concentração sérica de TNF- α (284.8 \pm 69.9 pg/mL) e IL-6 (54468.0 \pm 4401.0 pg/mL) quando comparados com o grupo Tween 80 + Salina (TNF- α = 1.1 \pm 0.1 pg/mL e IL-6 = 82.6 \pm 14.89 pg/mL). Nos animais tratados com Citral 300 e administrado LPS, foi observado uma redução significativa na concentração sérica de TNF- α (Figura 4C) no grupo Citral 300 + LPS (99.8 \pm 9.2 pg/mL) quando comparado com o Tween 80 + LPS (284.8 \pm 69.9 pg/mL). Em animais DP, não foi observado diferença estatística significativa nos níveis séricos de leptina entre os diferentes tratamentos (Figura 4D).

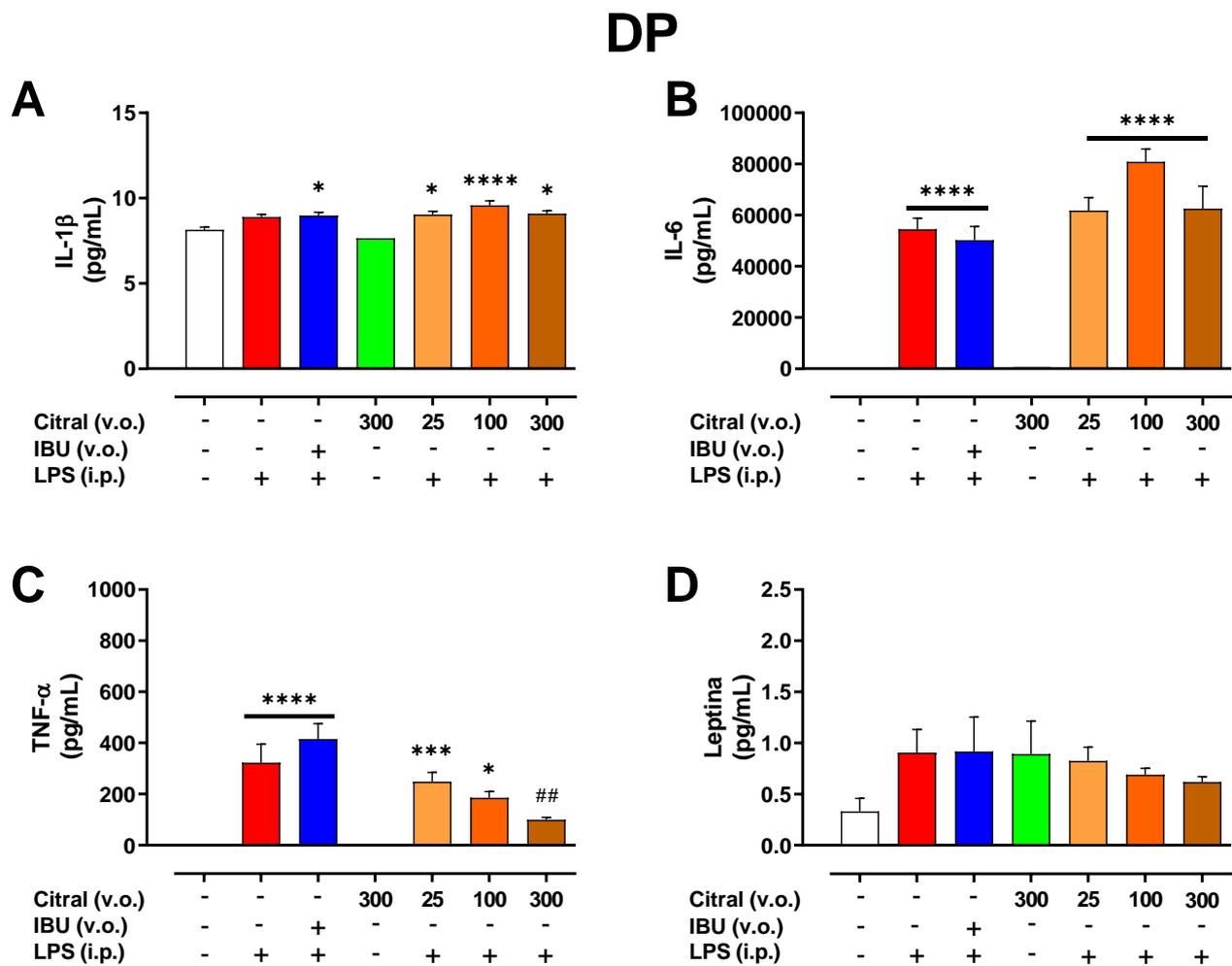


Figura 4. Efeito do citral na concentração sérica de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e leptina (D) após 90 minutos da injeção de LPS (100 μ g/kg) em camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta padrão (DP). Os dados são apresentados em média \pm E.P.M. Para cada grupo foi usado n= 6-7 de animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, sendo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001 vs Tween 80 + Salina; ## < 0.01 vs Tween 80 + LPS.

Em animais alimentados com HFD (Figura 5), foi observado um aumento significativo nas concentrações séricas de TNF- α e IL-6 nos grupos Tween 80 + LPS (TNF- α = 355.7 \pm 42.0 pg/mL e IL-6 = 71621.0 \pm 8588.0 pg/mL) quando comparados com os seus respectivos grupos controle (TNF- α = 1.1 \pm 0.0 pg/mL e IL-6 = 132 \pm 15.01 pg/mL), perfil semelhante ao encontrado em animais DP. No entanto, encontramos um aumento significativo nos níveis séricos de IL-1 β em animais tratados

com Tween 80 + LPS (9.61 ± 0.20 pg/mL) quando comparados ao grupo Tween 80 + Salina (7.64 ± 0.00 pg/mL), perfil não observado em animais DP. O grupo alimentado com HFD, também foi possível observar a redução significativa na concentração sérica de TNF- α quando administrados Citral 300 + LPS (164.7 ± 30.1 pg/mL) e comparado com o grupo Tween 80 + LPS (355.7 ± 42.0 pg/mL). O tratamento agudo com Citral nas doses de 25 e 300 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente os níveis séricos de leptina, observado na Figura 5D, no qual os grupos Citral 25 + LPS (0.96 ± 0.10 pg/mL) e Citral 300 + LPS (0.65 ± 0.10 pg/mL) tiveram uma redução na concentração sérica de leptina quando comparados com ao grupo Tween 80 + LPS (1.74 ± 0.19 pg/mL).

HFD

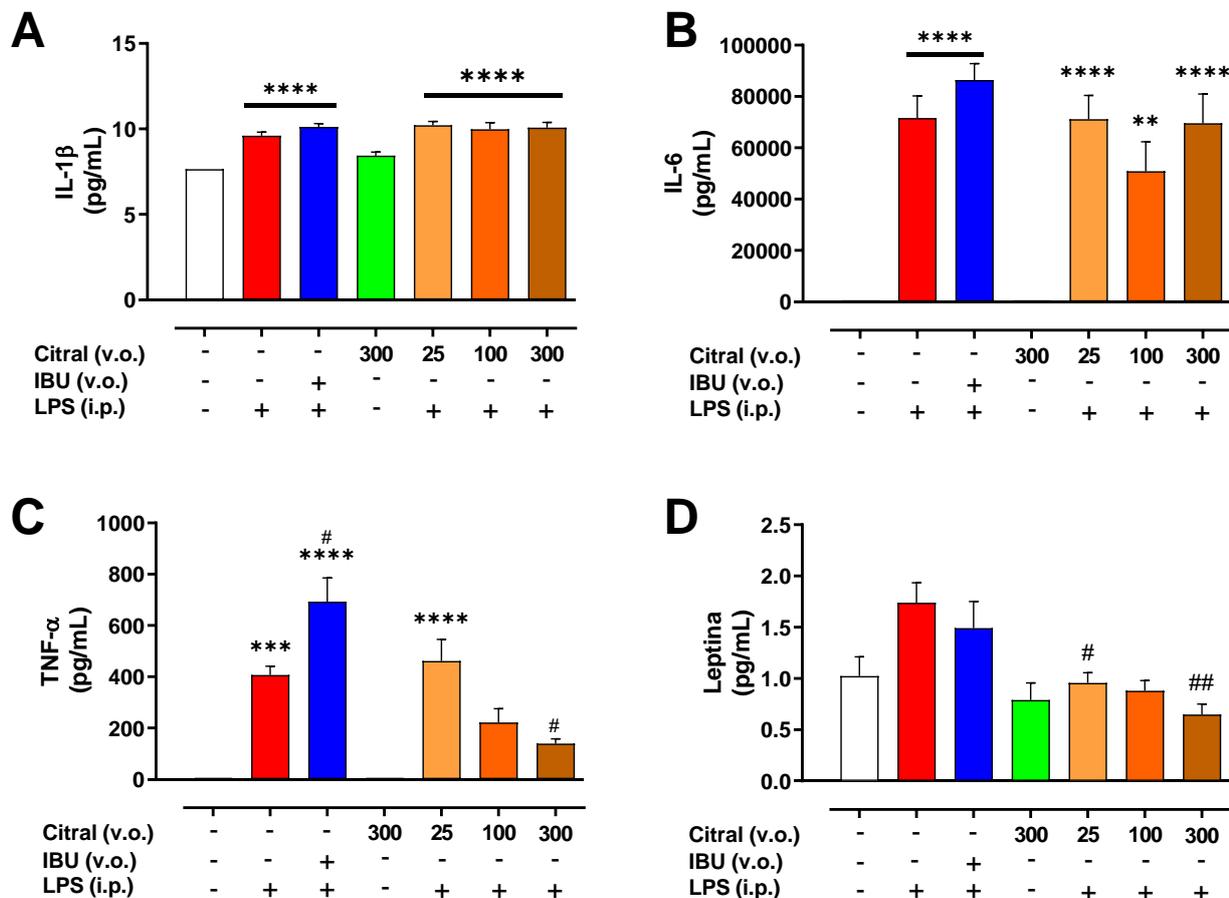


Figura 5. Efeito do citral na concentração sérica de IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e leptina (D) após 90 minutos da injeção de LPS (100 μ g/kg) em camundongos *Swiss* machos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD). Os dados são apresentados em média \pm E.P.M. Para cada grupo foi usado n= 6-7 de animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, sendo * p < 0.05, ** p < 0.01, * p < 0.001 e **** p < 0.0001 vs Tween 80 + Salina; # p < 0.05, ## < 0.01 vs Tween 80 + LPS.**

Também foi analisado a interferência atribuída a oferta de dieta hiperlipídica na sinalização inflamatória e hormonal dentro de cada grupo experimental (tratamento + agente indutor) no tempo de 90 minutos, após a indução da inflamação sistêmica com LPS (Tabela 4). Com relação aos níveis séricos de IL-1 β , observamos um aumento significativo em sua concentração em animais HFD quando comparado com DP nos grupos IBU + LPS (DP = 8.98 \pm 0.20 vs HFD = 10.12 \pm 0.19 pg/mL), Citral 25 + LPS (DP = 9.03 \pm 0.20 vs HFD = 10.22 \pm 0.22 pg/mL) e Citral 300 + LPS (DP = 9.09 \pm 0.17 vs HFD = 10.08 \pm 0.31 pg/mL). Na concentração sérica de TNF- α houve um aumento significativo em animais HFD nos grupos IBU + LPS (DP = 415.70 \pm 59.61 vs HFD = 693.10 \pm 92.64 pg/mL) e Citral 25 + LPS (DP = 248.90 \pm 35.80 vs HFD = 462.00 \pm 83.82 pg/mL) em relação a animais DP. E nos níveis séricos de IL-6 (DP = 54468.00 \pm 4401.00 vs HFD = 71621.00 \pm 8588.00 pg/mL) e leptina (DP = 0.91 \pm 0.23 vs HFD = 1.74 \pm 0.19 pg/mL), animais pertencentes ao grupo Tween 80 + LPS tiveram aumento significativo quando alimentados com HFD em relação a animais que receberam DP.

Tabela 4. Efeito do Citral na concentração sérica de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e leptina de animais alimentados com dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (HFD) após 90 minutos da injeção de LPS. Os dados são apresentados em média \pm E.P.M. Para cada grupo foi usado n= 6-7 de animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental; sendo a = p < 0.05 e ns = Não significativo.

Grupos	IL-1 β (pg/mL)		TNF- α (pg/mL)		IL-6 (pg/mL)		Leptina (pg/mL)	
	DP	HFD	DP	HFD	DP	HFD	DP	HFD
Tween 80 + Salina	8.14 \pm 0.16	7.64 \pm 0.00 ^{ns}	1.08 \pm 0.06	1.08 \pm 0.01 ^{ns}	68.21 \pm 4.71	139.00 \pm 15.33 ^{ns}	0.33 \pm 0.13	1.02 \pm 0.19 ^{ns}
Tween 80 + LPS	8.89 \pm 0.16	9.61 \pm 0.20 ^{ns}	322.20 \pm 72.29	407.00 \pm 34.51 ^{ns}	54468.00 \pm 4401.00	71621.00 \pm 8588.00 ^a	0.91 \pm 0.23	1.74 \pm 0.19 ^a
IBU 100 + LPS	8.98 \pm 0.20	10.12 \pm 0.19 ^a	415.70 \pm 59.61	693.10 \pm 92.64 ^a	50232.00 \pm 5352.00	86452.00 \pm 6368.00 ^{ns}	0.92 \pm 0.33	1.49 \pm 0.26 ^{ns}
Citral 300 + Salina	7.64 \pm 0.00	8.44 \pm 0.21 ^{ns}	1.10 \pm 0.07	1.40 \pm 0.07 ^{ns}	213.00 \pm 60.83	161.30 \pm 29.31 ^{ns}	0.89 \pm 0.32	0.79 \pm 0.17 ^{ns}
Citral 25 + LPS	9.03 \pm 0.20	10.22 \pm 0.22 ^a	248.90 \pm 35.80	462.00 \pm 83.82 ^a	61831.00 \pm 5047.00	71133.00 \pm 9311.00 ^{ns}	0.82 \pm 0.14	0.96 \pm 0.10 ^{ns}
Citral 100 + LPS	9.57 \pm 0.26	9.98 \pm 0.39 ^{ns}	185.70 \pm 23.92	221.90 \pm 53.59 ^{ns}	80850.00 \pm 5015.00	50871.00 \pm 11452.00 ^{ns}	0.69 \pm 0.06	0.88 \pm 0.10 ^{ns}
Citral 300 + LPS	9.09 \pm 0.17	10.08 \pm 0.31 ^a	99.84 \pm 9.23	139.40 \pm 18.85 ^{ns}	62521.00 \pm 8848.00	69538.00 \pm 11459.00 ^{ns}	0.62 \pm 0.05	0.65 \pm 0.10 ^{ns}

Avaliamos a concentração de mediadores inflamatórios hipotalâmicos (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em animais DP e HFD tratados com citral ou IBU (Figura 6). Observamos que a administração de LPS é capaz de aumentar significativamente os níveis de IL-6 (Figura 6B) no hipotálamo de animais obesos Tween 80 + LPS (118.00 \pm 13.90 pg/g de tecido) quando comparado com seu respectivo controle (54.09 \pm 1.06 pg/g de tecido). E o tratamento com citral, é capaz de reduzir a sinalização inflamatório através da redução de IL-6 nas doses 25 mg/kg (75.98 \pm 1.92 pg/g de tecido) e 100 mg/kg (72.45 \pm 6.55 pg/g de tecido) de citral quando comparado com o grupo Tween 80 + LPS. Os resultados evidenciam que a dieta (DP ou HFD) pode interferir na concentração de mediadores inflamatórios hipotalâmicos após indução da inflamação sistêmica, quando animais obesos que receberam citral 100 + LPS apresentaram uma redução significativa nos níveis IL-6 quando comparado com o controle (DP = 113.10 \pm 12.58 vs HFD = 72.45 \pm 6.55 pg/g de tecido, Figura 6B). No entanto, é observado que animais obesos apresentam maior concentração de TNF- α em regiões hipotalâmicas quando realizado a administração de IBU + LPS (DP = 14.47 \pm 0.95 vs HFD = 17.43 \pm 1.52 pg/g de tecido) quando comparado com animais eutróficos (Figura 6C). Após a indução da inflamação sistêmica com injeção de LPS, avaliamos os níveis de PGE₂ na AVPO, como sendo o mediador proximal de uma resposta de elevação da Tc, porém as amostras apresentaram concentração abaixo do nível de

detecção do ensaio (< 25.383 pg/g de tecido) (ANEXO 3), dado condizente com a Tc de animais eutróficos e obesos (Figura 3).

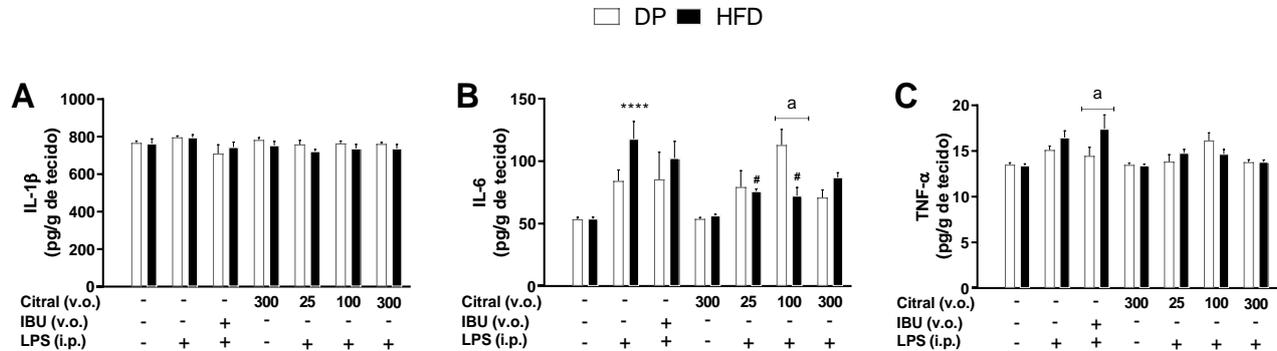


Figura 6. Efeito do Citral na concentração hipotalâmica de mediadores pró-inflamatórios IL-1 β (A), IL-6 (B) e TNF- α (C) de animais alimentados com dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (HFD) após injeção de LPS. Os dados estão representados com Média \pm E.P.M. Para cada grupo foi usado $n = 5-7$ de animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA seguido do teste de Tukey para comparar a diferença entre os tratamentos dentro de cada dieta; sendo **** $p < 0.0001$ vs Tween 80 + Salina; # $p < 0.05$ vs Tween 80 + LPS. Para determinar a diferença entre as dietas (DP vs HFD) foi usado ANOVA de duas vias seguido do teste Bonferroni, sendo $a = p < 0.05$.

Ao final do tratamento agudo com as 3 doses de Citral ou IBU realizamos uma avaliação sérica de alguns parâmetros bioquímicos indicativos de eventuais toxicidades renais (Tabela 5) e foi possível observar que tanto os animais DP quanto os HFD não apresentaram diferenças significativas nos níveis séricos de uréia e creatinina ($p > 0.05$) quando comparado aos animais tratados com veículo Tween 80 + salina ou quando comparados entre si (DP vs HFD). Foi observada significativa elevação nos níveis de glicose séricos em animais alimentados com HFD quando comparados com DP pertencente ao grupo Citral 100 + LPS (DP = 65.33 ± 10.51 mg/dL vs HFD = 86.71 ± 6.18 mg/dL). Também foram avaliados parâmetros bioquímicos para função hepática (Tabela 6), como níveis séricos de AST, ALT, Fosfatase Alcalina e γ -GT. Em animais DP, não foi observado diferença significativa nos níveis séricos de AST entre os animais tratados nas três doses de Citral quando

comparado com o controle ($p > 0.05$). Os animais HFD apresentaram níveis séricos de AST menores que a sensibilidade do aparelho (< 2.0), por esse motivo não foi possível aferir estatisticamente a diferença entre as dietas (DP e HFD). Nos níveis séricos de ALT foi observada uma elevação significativa ao analisar os animais HFD tratados com Citral 100 + LPS (227.3 ± 60.96 UI/L) quando comparados com os animais tratados com Tween 80 + Salina (57.17 ± 4.01 UI/L), mas não encontramos diferença significativa que fosse atribuída a ingestão de diferentes dietas ($p > 0.05$).

Tabela 5. Efeito do citral em parâmetros bioquímicos para determinação função metabólica de glicose e função renal em animais alimentados com dieta padrão (DP) e hiperlipídica (HFD).

Os dados são apresentados em média \pm E.P.M. Para cada grupo foi usado $n= 6-8$ de animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparar a diferença entre os tratamentos dentro de cada dieta. Para determinar a significância estatística entre as DP e HFD dentro de cada grupo, foi usado ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni; sendo $a = p < 0.05$.

Grupos	Glicose (mg/dL)		Ureia (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)	
	DP	HFD	DP	HFD	DP	HFD
Tween 80 + Salina	75.43 \pm 14.21	88.60 \pm 7.38	97.89 \pm 31.38	82.23 \pm 37.82	0.48 \pm 0.14	0.49 \pm 0.15
Tween 80 + LPS	69.43 \pm 5.371	98.00 \pm 18.91	72.33 \pm 27.59	38.21 \pm 5.45	0.37 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02
IBU 100 + LPS	77.50 \pm 6.682	84.14 \pm 4.91	92.58 \pm 38.95	69.79 \pm 12.38	0.34 \pm 0.05	0.45 \pm 0.06
Citral 300 + Salina	89.86 \pm 10.84	100.8 \pm 15.94	89.91 \pm 32.08	35.80 \pm 2.34	0.43 \pm 0.11	0.34 \pm 0.01
Citral 25 + LPS	65.67 \pm 3.313	75.14 \pm 4.29	55.22 \pm 23.61	40.19 \pm 5.09	0.35 \pm 0.05	0.34 \pm 0.02
Citral 100 + LPS	65.33 \pm 10.51	86.71 \pm 6.18^a	42.90 \pm 8.70	48.36 \pm 8.33	0.33 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01
Citral 300 + LPS	80.86 \pm 12.11	77.20 \pm 4.72	105.90 \pm 32.29	60.53 \pm 16.78	0.50 \pm 0.15	0.34 \pm 0.03

Outro parâmetro analisado é o nível sérico de fosfatase alcalina, que em animais DP apresentaram uma redução significativa nos grupos Tween 80 + LPS (17.00 ± 3.01 UI/L) e Citral 100 + LPS (16.33 ± 2.09 UI/L) quando comparados com o controle Tween 80 + Salina (37.57 ± 5.21 UI/L). A redução dos níveis de fosfatase alcalina também foi detectada nos animais alimentados com HFD do grupo controle Tween 80 + Salina (12.75 ± 0.48 UI/L) quando comparado com os animais controle Tween 80 + Salina alimentados com DP (37.57 ± 5.21 UI/L). Animais DP e HFD não tiveram alterações nos níveis de séricos de γ -GT que fossem detectáveis ao aparelho ($<1,0$), no entanto, esse resultado condiz com a rotina laboratorial, assegurando que método é indicado para dosagens de até 1,0 UI/L.

Tabela 6. Efeito do citral em parâmetros bioquímicos para determinação de função hepática em animais alimentados com dieta padrão (DP) e hiperlipídica (HFD). Os dados são apresentados em média \pm E.P.M. Para cada grupo foi usado n= 6-8 de animais. A significância estatística foi determinada por ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparar a diferença entre os tratamentos dentro de cada dieta; sendo * $p < 0.05$ vs Tween 80+Salina. Para determinar a significância estatística entre as DP e HFD dentro de cada grupo, foi usado ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni; sendo $a = p < 0.05$.

Grupos	AST (UI/L)		ALT (UI/L)		Fosfatase Alcalina (UI/L)		GGT (UI/L)	
	DP	HFD	DP	HFD	DP	HFD	DP	HFD
Tween 80 + Salina	113.60 ± 42.60	< 2.0	63.29 ± 9.31	57.17 ± 4.01	37.57 ± 5.21	12.75 ± 0.48 ^a	<1,0	<1,0
Tween 80 + LPS	110.70 ± 39.61	< 2.0	51.71 ± 14.91	96.14 ± 16.21	17.00 ± 3.01 *	11.57 ± 9.64	<1,0	<1,0
IBU 100 + LPS	<2.0	< 2.0	72.83 ± 11.73	124.6 ± 29.08	21.40 ± 5.79	23.00 ± 0.01	<1,0	<1,0
Citral 300 + Salina	107.40 ± 44.79	< 2.0	54.29 ± 11.26	92.25 ± 16.23	21.00 ± 1.86	10.67 ± 1.02	<1,0	<1,0
Citral 25 + LPS	111.20 ± 59.58	< 2.0	81.83 ± 18.31	74.40 ± 6.56	22.00 ± 2.77	13.86 ± 0.86	<1,0	<1,0
Citral 100 + LPS	133.30 ± 61.01	< 2.0	85.17 ± 26.22	227.3 ± 60.96 *	16.33 ± 2.09 *	17.43 ± 3.12	<1,0	<1,0
Citral 300 + LPS	114.10 ± 49.78	< 2.0	59.71 ± 4.59	95.86 ± 20.26	26.14 ± 3.73	13.67 ± 2.22	<1,0	<1,0

Os tratamentos via oral com citral e IBU antecedente ao desafio imunológico não causaram lesão na mucosa gástrica visíveis por análise macroscópica através da quantificação da área de lesão (mm²) (Figura 7). Em uma análise mais aprofundada do tecido gástrico, foram realizadas análises bioquímicas do estresse oxidativo e mecanismo antioxidante (MDA e GSH), e dosagem de marcador de processo inflamatório local (MPO). Ao avaliar a integridade da mucosa gástrica, o tratamento agudo com doses de Citral ou IBU não foram suficientes para causar alterações nos níveis de MDA (Figura 8A), GSH (Figura 8B) e MPO (Figura 8C) após suas administrações por via oral quando comparados com os seus respectivos grupos controle Tween 80 + Salina. A oferta de dieta DP e HFD durante 12 semanas não interferiu de forma significativa na integridade da mucosa gástrica frente aos diferentes tratamentos ($p > 0.05$).

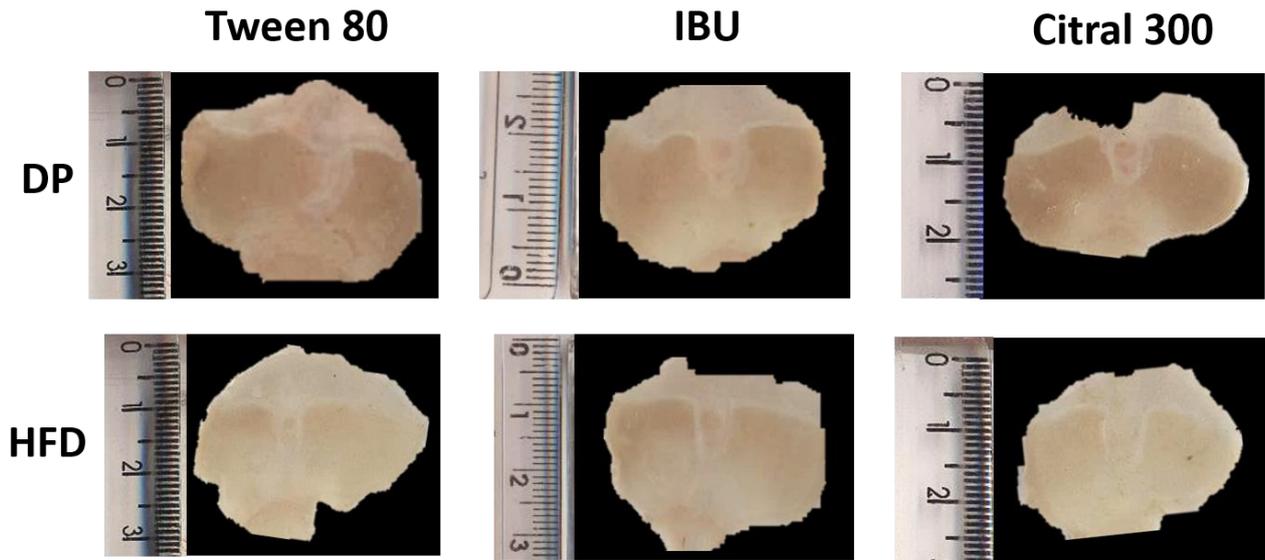


Figura 7. Avaliação macroscópica da mucosa gástricas de camundongos magros (DP) e obesos (HFD) após 360 min da injeção de LPS ou Salina. Análise da mucosa gástrica de animais tratados oralmente com citral ou ibuprofeno (IBU).

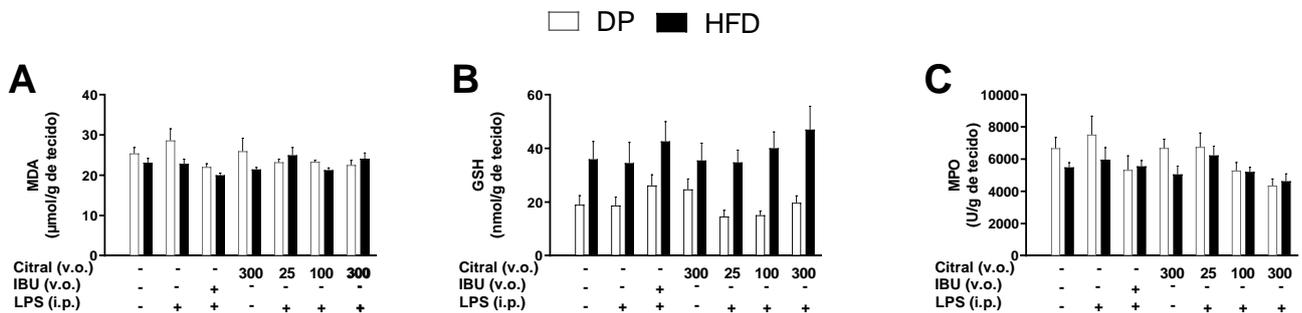


Figura 8. Avaliação do efeito do citral em parâmetros do estresse oxidativo e inflamação local na mucosa gástrica de animais magros (DP) e obesos (HFD) após 360 minutos de injeção de LPS (100 µg/kg). A) Níveis de MDA na mucosa gástrica. B) Níveis de GSH na mucosa gástrica. C) Níveis de MPO como marcador de inflamação local na mucosa gástrica. Os dados estão representados com Média ± E.P.M. Para cada grupo foi usado n = 6-8. A significância estatística foi determinada por ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparar a diferença entre os tratamentos dentro de cada dieta. Para determinar a diferença entre as dietas foi usado ANOVA de duas vias seguido do teste Bonferroni.

DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença crônica causada pelo desbalanço na ingestão alimentar promovendo uma expansão da massa de tecido adiposo em todo o corpo, provocando uma desregulação metabólica que leva a alterações na sinalização de mediadores inflamatórios, atribuindo um quadro de inflamação crônica de baixo grau (CALDER et al., 2011). Sendo assim, um modelo muito empregado para estudar obesidade é a oferta de uma dieta com alto teor de lipídios para animais experimentais (DE MELLO et al., 2019). O modelo utilizado nesse projeto empregou uma dieta com 60% de lipídios como fonte energética em sua composição, quando comparado com a dieta padrão que apresenta apenas 15%, ao final de 12 semanas. Os animais que receberam HFD tiveram um ganho de peso final de quase 36% maior quando comparado com os animais alimentados com DP (Tabela 1), resultado semelhante ao obtido por Arçari e colaboradores (2013). O percentual de ganho de peso é descrito como um importante critério para determinação e classificação do quadro de obesidade em animais experimentais, indicando que nossos animais apresentaram um quadro de obesidade moderada (10-15%) para severa (superior a 40%) (HARIRI; THIBAUT, 2010). Nossos resultados também apresentam um aumento de peso relativo do tecido adiposo em animais HFD quando comparado com animais DP. Esses dados foram corroborados com o índice de adiposidade obtido ao final do período de tratamento. Esses indicadores de obesidade em animais experimentais, é atribuído ao consumo de uma dieta que fornece diferentes tipos de lipídios saturados, como a banha de porco, que induz um grande aumento do peso corporal e acúmulo de gordura (BUETTNER; SCHÖLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; HARIRI; THIBAUT, 2010; KAKIMOTO; KOWALTOWSKI, 2016). Um estudo de Samuels e colaboradores (1948), demonstrou que a obesidade poderia ser reproduzida em ratos alimentados com uma dieta com 70% de lipídios, condição semelhante a alta ingestão calórica em humanos. É predominante a ocorrência de obesidade causada por um desbalanço energético devido ao aumento na ingestão de alimentos (FAROOQI;

O'RAHILLY, 2005). Em menor proporção são descritos casos de obesidade por mutações no gene da leptina, hormônio envolvido na homeostase energética, ou em seu receptor (KOCH et al., 2014). Para nosso estudo, utilizamos uma linhagem de camundongos heterogênica e ofertamos uma dieta com alto teor de lipídios para induzir obesidade mimetizando a condição clínica que mais afeta os humanos no mundo.

Sabe-se que indivíduos obesos apresentam maior concentração sérica de citocinas do tipo pró-inflamatória (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), o que induz uma dessensibilização das células do sistema imunológico durante a infecção de um patógeno (MILNER; BECK, 2012a). Essa condição de inflamação crônica de baixo grau da obesidade promove uma resposta imunológica alterada e maior susceptibilidade a infecções (MILNER; BECK, 2012a; RAMÍREZ-OROZCO et al., 2018). Afim de estudar essas respostas promovidas pela ativação do sistema imunológico, um modelo muito empregado é a indução da inflamação sistêmica por injeção de LPS (BRANCO; SORIANO; STEINER, 2014). A inflamação sistêmica induzida por LPS é um modelo que ativa células do sistema imunológico e promove a produção de mediadores inflamatórios periféricos e centrais. No SNC, pode ocorrer a produção de citocinas e PGs em regiões hipotalâmicas, que provoca uma resposta efetora de variação da Tc (febre ou hipotermia), afim de proteger o organismo de um processo inflamatório ou infecção (BLATTEIS; SEHIC, 1998; BLATTEIS; SEHIC; LI, 2000; GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018). Em indivíduos obesos, a presença de altos níveis séricos de LPS pode agravar esta resposta de inflamação sistêmica, podendo desencadear um quadro semelhante a um choque endotoxêmico (MORANDI et al., 2017). Diante disso, a indução de inflamação sistêmica por LPS é um modelo que melhor reproduz informações clínicas que elucidam a comunicação entre regiões encefálicas com a periferia do organismo (como tecido adiposo, sistema imunológico e até mesmo o trato gastrointestinal) (RUMMEL et al., 2016) .

A indução de inflamação sistêmica com LPS depende de duas variáveis para que seja observada respostas termorreguladoras. A primeira é a dose do agente indutor, a endotoxina, que em dose baixa promove uma resposta de febre e em dose alta causa uma resposta de hipotermia seguida de febre (ROMANOVSKY et al., 2005; RUDAYA et al., 2005). A segunda variável é a temperatura ambiente, que para o modelo é indicado que o animal fique em sua zona termoneutra (por volta de 30 °C para camundongos) (RUDAYA et al., 2005). No procedimento experimental empregado nesse trabalho, foi injetado LPS via i.p. na dose de 100 µg/kg, descrito como uma dose baixa, em camundongos aclimatados em sua zona termoneutra. Dados da literatura demonstram que tais condições promoveriam uma resposta de elevação da Tc após a administração de LPS (LOMBA et al., 2017). Mesmo seguindo rigidamente estes critérios, nossos resultados não mostraram diferença significativa na Tc entre o grupo Tween 80 + LPS quando comparado com o controle Tween 80 + Salina (Figuras 3). No entanto, é descrito que camundongos podem apresentar diferente resposta termorreguladora frente a injeção de LPS, inclusive com a incapacidade de desenvolver hipertermia e/ou desencadear uma diminuição na Tc (BLANQUÉ et al., 1996; FRAIFELD; KAPLANSKI, 1998). A hipotermia é um efeito agudo da administração do LPS, entretanto para melhor elucidar uma resposta causada pelo desafio imune avaliamos a concentração sérica dos mediadores inflamatórios, IL-1 β , IL-6, TNF- α e do hormônio leptina. A administração i.p. de LPS causou um aumento significativo nos níveis séricos de TNF- α e IL-6, tanto em animais DP quanto HFD, mediadores produzidos sistemicamente por macrófagos e mastócitos periféricos sensibilizados pela endotoxina (BLATTEIS; SEHIC, 1998). Esse aumento significativo nos níveis sistêmicos de TNF- α é relacionado a um efeito criogênico dessa citocina, podendo relacionar com nossos resultados de Tc (GARAMI; STEINER; ROMANOVSKY, 2018). No entanto, o aumento na concentração sérica de IL-1 β , juntamente com os demais mediadores, em animais alimentados com uma dieta rica em lipídios, pode estar relacionado ao quadro de inflamação crônica de baixo grau, atribuída a obesidade, que proporciona uma resposta a inflamação sistêmica sub-pirogênica, devido a uma resposta

adaptativa (LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012; MINIHANE et al., 2015). Durante o desafio imunológico com LPS, animais obesos Tween 80 + LPS apresentam um aumento significativo na concentração sérica de IL-6 e leptina, quando comparados com animais DP, essa elevação na sinalização inflamatória está relacionada com a ativação da via IL-1 β /NF κ B e JAK/STAT3 em regiões hipotalâmicas de animais obesos (BLATTEIS; SEHIC, 1997; ROMANOVSKY et al., 2005; POHL; WOODSIDE; LUHESHI, 2014). Em regiões superiores no SNC, mais precisamente no hipotálamo, também foi observado aumento na concentração de IL-6 em camundongos obesos que receberam LPS, quando comparados ao seu grupo controle. Fato este que não se reproduziu em animais eutróficos. Essa sinalização pode estar associada a inflamação hipotalâmica característica em indivíduos obesos, sendo que uma dieta rica em gorduras é capaz de promover a expressão gênica de *il-6* e *NF- κ B* em regiões hipotalâmicas, e conseqüentemente, causar a morte neuronal que favorece a instalação da obesidade (THALER et al., 2012). Mesmo com esse aumento dos níveis desses mediadores inflamatórios (periféricos e centrais), não observamos alteração nos níveis de PGE₂ na AVPO, justificando ausência da febre, e uma redução na Tc como resposta a inflamação sistêmica induzida por LPS.

É importante buscar uma alternativa farmacológica segura e efetiva para a variação da temperatura corporal causada pela inflamação sistêmica em diferentes perfis de organismos (indivíduos magros e obesos). Na terapêutica atual, é indicado a utilização de AINEs, como por exemplo o IBU, mas em altas doses desse fármaco pode acarretar efeitos adversos significativos, como dor epigástrica e até mesmo ulcerações no trato gastrointestinal (IRVINE; AFROSE; ISLAM, 2018). Além disso, é descrito que alguns fármacos não agem de forma significativa em indivíduos obesos, como antibióticos e vacinas (MILNER; BECK, 2012b). Diante disso, o citral é uma mistura racêmica de monoterpenos que pode ser isolado de diferentes espécies de óleos essenciais de plantas

medicinais, sendo descrito como um importante bioativo contra processos inflamatórios locais e sistêmicos (DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ; ANDRADE; DE SOUSA, 2013).

O presente trabalho mostra o efeito de redução da Tc do citral na dose de 300 mg/kg em camundongos magros e obesos durante a inflamação sistêmica induzida por LPS. Pesquisadores de nosso grupo já demonstraram que o citral na dose de 100 mg/kg apresenta ação antipirética frente a febre induzida por dose baixa de LPS (100 µg/kg) (EMÍLIO-SILVA et al., 2017), contudo ainda não foi descrito sua possível ação dose dependente (25, 100 e 300 mg/kg) e sua ação em camundongos obesos durante o desafio com LPS. Nosso trabalho demonstrou o efeito hipotérmico do citral em camundongos magros, diminuindo a Tc de forma significativa na dose de 300 mg/kg diante a administração de LPS por volta de 60 a 120 minutos após a indução (Figura 3). A dose de 100 mg/kg de citral havia demonstrado efeito antipirético em ratos (EMÍLIO-SILVA et al., 2017), no entanto em camundongos é necessário aumentar em 3x a dose para que ocorra a redução significativa na Tc durante a inflamação sistêmica em animais magros. Já em animais obesos, o citral é capaz de reduzir a temperatura corporal de forma significativa com e sem a indução de inflamação sistêmica com LPS no tempo de 60 a 120 minutos, indicando que o citral é capaz de causar uma redução da Tc sem a presença de um agente ativador do sistema imunológico, ou seja, caracterizando um efeito criogênico (KRALL et al., 2010). Tal efeito é observado na dose de 300 mg/kg, mas não é notado a mesma resposta na dose de 100 mg/kg, dose descrita na literatura como antipirética em animais magros. O IBU não causou variação na Tc quando comparado com o grupo controle em animais DP e HFD, assegurando sua ação de não variação da Tc durante a inflamação sistêmica (Tabela 3). É descrito que o citral causa diminuição na sinalização de mediadores inflamatórios plasmáticos (IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂) (EMÍLIO-SILVA et al., 2017), além de diminuir o processo inflamatório local causado por edema de pata e reduzir a migração de leucócitos para cavidade peritoneal induzido por carragenina em camundongos (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011). Em nosso estudo o tratamento

agudo com Citral na dose de 300 mg/kg foi capaz de reduzir a concentração sérica de TNF- α , tanto em animais DP (Figura 4C) quanto HFD (Figura 5C), 90 minutos após a administração com LPS, intervalo em que ocorreu variação da Tc de animais DP e HFD. Vale destacar que esse intervalo é o momento em que os níveis séricos TNF- α se encontram elevados (fase inicial), juntamente com a concentração sérica de IL-1 β que começam a aumentar nesse período, atuando na sinalização de regiões superiores do SNC (via região OVLT), para estimular a síntese de PGE₂ durante a inflamação sistêmica por LPS (BLUTHÉ et al., 1994; BLATTEIS; SEHIC, 1998). O tratamento dos animais obesos com Citral (nas doses de 25 e 300 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de leptina durante a inflamação sistêmica induzida por LPS (Figura 6D). Esta sinalização pró-inflamatória mediada pelo hormônio leptina está relacionada com a elevação na temperatura corporal induzindo a expressão de IL-1 β em regiões hipotalâmicas (SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004). Além disso, a leptina está relacionado a menor ingestão alimentar e redução na movimentação atribuída ao exercício voluntário durante a inflamação sistêmica (SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004; HARDEN et al., 2006). Em animais obesos, a significativa redução na Tc de animais do grupo Citral 300 + LPS está atrelada a redução nos níveis séricos de TNF- α e leptina. Diferentemente do AINEs clássico (IBU), que somente atua como inibidor reversível não seletivo das isoenzimas COX-1 e COX-2 responsáveis pela biossíntese de PG (IRVINE; AFROSE; ISLAM, 2018), o citral atuou de forma efetiva reduzindo a concentração de mediadores inflamatórios periféricos (TNF- α e leptina). No hipotálamo, o tratamento com citral reduziu a sinalização inflamatória através da diminuição da concentração de IL-6, possivelmente associado ao mecanismo de hipotermia (evidenciado pelos valores de Tc). A resposta de redução nos níveis inflamatórios induzidas pelo citral é relevante ao promover uma proteção neuronal para animais obesos que apresentam um quadro de inflamação crônica de baixo grau (TONG et al., 2017). No futuro, com uma melhor elucidação das vias de sinalização do efeito hipotérmico do citral durante a inflamação sistêmica em indivíduos obesos, esse monoterpeno pode ter uma aplicação clínica, possivelmente associado a nanopartículas que

auxiliariam sua atuação e efetividade, como no desenvolvimento de fármacos com mecanismos de ação em hipotermia e neuroproteção (SOO HAN et al., 2012).

Independente das atribuições benéficas e farmacológicas do citral durante a inflamação sistêmica, é necessário fazer análises toxicológicas de seu tratamento (ALMANÇA et al., 2011) e avaliar biomarcadores que possam mostrar seguramente seus efeitos benéficos e não lesivos ao organismo alimentados com dieta padrão e hiperlipídica. O tratamento agudo com Citral 100 + LPS causou aumento da concentração de glicose sérica em animais HFD quando comparado com DP (Tabela 5). A hiperglicemia é atribuída a maior mobilização de glicose para circulação durante a inflamação sistêmica, fornecendo energia para uma resposta inflamatória e órgãos vitais (cérebro e coração) (XIU et al., 2014). A elevação nos níveis de glicose na circulação é causada por uma resposta adaptativa com produção hepática de glicose e liberação de hormônios contra reguladores (glucagon, cortisol, catecolaminas e hormônio do crescimento) induzindo um aumento na lipólise, quebra de proteínas o que prejudica a preferência pela glicose por tecidos periféricos (MARIK; BELLOMO, 2013; XIU et al., 2014; DING; MENG; MA, 2018). Na clínica, uma prolongada exposição a altos níveis de glicose é atribuída a infecções e sepse, causando falência múltipla de órgãos e até mesmo o óbito do paciente (XIU et al., 2014).

Não foram observadas alterações nos níveis séricos de ureia e creatinina, marcadores de função renal (Tabela 5). Para função hepática (Tabela 6), foi observado um aumento significativo nos níveis séricos de ALT no grupo Citral 100 + LPS em animais obesos quando comparados com animais magros (DP). Ao analisar a fosfatase alcalina é observado uma redução nos níveis séricos nos grupos Tween 80 + LPS e Citral 100 + LPS de animais DP quando comparado com o controle, da mesma forma é observado redução significativa nos níveis do grupo Tween 80 + Salina de animais HFD quando comparado com DP (Tabela 6). Nossos resultados de AST, ALT e fosfatase alcalina se contrapõem aos dados de Uchida e colaboradores (2017) que demonstraram que o pré-tratamento

com citral é capaz de prevenir a toxicidade aguda causada por overdose de acetaminofeno (paracetamol), diminuindo os níveis séricos enzimas hepáticas (AST, ALT, fosfatase alcalina e γ -GT) como também promovendo a redução do estresse oxidativo e indicativo de processo inflamatório no tecido hepático. Fato esse ocorre, pois o citral pode atuar diretamente no dano, e não na ausência de um agente indutor direto do tecido hepático (acetaminofeno).

Nesse trabalho também analisamos a integridade da mucosa gástrica após o tratamento com IBU ou citral, nas três diferentes doses, pois é descrito que a ingestão de anti-inflamatórios é capaz de promover ulcerações, hemorragias e até mesmo obstruções no trato gastrointestinal (WALLACE, 2008). Nossos resultados demonstram que, tanto em animais obesos quanto animais eutróficos, não ocorreram alterações nos níveis de MDA (Figura 8A), marcador de peroxidação lipídica principalmente em ácidos graxos de fosfolipídios de membrana causado pelo estresse oxidativo (PAROLA et al., 1999). Como também, não há alteração nos níveis GSH (Figura 8B), um mecanismo antioxidante advindo de células imunológicas e além de não encontrarmos diferença em níveis de MPO na mucosa gástrica (Figura 8C), importante indicador de infiltração de neutrófilos para inflamação local. Tais indicadores demonstram que a administração aguda de citral pela via oral, independentemente da dose (25, 100 ou 300 mg/kg), não apresenta ação lesiva para mucosa gástrica em camundongos alimentados com DP e HFD. Mas é importante salientar, que na grande maioria, os anti-inflamatórios não são utilizados em dose única (IWAMOTO et al., 2013), portanto é necessário um estudo com doses repetitivas dos tratamentos (Citral e IBU) para melhor elucidar e reproduzir o que acontece em humanos.

CONCLUSÃO

O citral apresenta ação hipotérmica durante a inflamação sistêmica induzida com LPS, em animais eutróficos e obesos. Esse efeito é atribuído a uma redução nos níveis de mediadores

inflamatórios periféricos e centrais. O tratamento agudo com citral não foi lesivo para mucosa gástrica, e sua administração pela via oral, se mostrou segura em relação ao parâmetro de toxicidade, mas em sua dose intermediária alterou parâmetros hepáticos. Assim, exibimos os efeitos do citral em um modelo experimental que reproduz o quadro de obesidade, fornecendo uma possível alternativa terapêutica para o tratamento de doenças associadas, como infecções e processos inflamatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. D. et al. Effects of Anesthesia on Lipopolysaccharide-Induced Changes in Serum Cytokines. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 65, n. 1, p. 170–174, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18580536>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

ALMANÇA, C. C. J. et al. Toxicological evaluation of acute and sub-chronic ingestion of hydroalcoholic extract of *Solanum cernuum* Vell. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 508–512, 18 nov. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111007161?via%3Dihub#bib0105>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in enzymology**, v. 113, p. 548–55, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4088074>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

ARAÚJO, E. P. et al. Mechanisms in endocrinology: Hypothalamic inflammation and nutrition. **European Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 3, p. R97–R105, 1 set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27006108>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

ARÇARI, D. P. et al. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809–815, 2013.

BANKS, W. A.; KASTIN, A. J.; BROADWELL, R. D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, n. 4, p. 241–8, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8963753>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BLANQUÉ, R. et al. Hypothermia as an indicator of the acute effects of lipopolysaccharides: comparison with serum levels of IL1 beta, IL6 and TNF alpha. **General pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 973–7, set. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8909977>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Circulating pyrogen signaling of the brain. A new working hypothesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 813, p. 445–7, 15 mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100919>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Cytokines and fever. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 608–18, 1 maio 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629288>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E.; LI, S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31 Suppl 5, n. Supplement_5, p. S168-77, 1 out. 2000. Disponível em: <http://academic.oup.com/cid/article/31/Supplement_5/S168/333034/Pyrogen-Sensing-and-Signaling-Old-Views-and-New>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BLUTHÉ, R. M. et al. Synergy between tumor necrosis factor α and interleukin-1 in the induction of sickness behavior in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 2, p. 197–207, jan. 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306453094900094>>. Acesso em: 22 set. 2019.

BOULANT, J. A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, p. 108–15, 29 set. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917871>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

BRANCO, L. G. S.; SORIANO, R. N.; STEINER, A. A. Gaseous Mediators in Temperature Regulation. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. 4p. 1301–1338.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents*. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798–808, 1 abr. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2007.608>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

CALDER, P. C. et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity Commissioned by the ILSI Europe Metabolic Syndrome and Diabetes Task Force. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. Supplement S3, p. S1–S78, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0007114511005460>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

CAVADAS, C. et al. The pathophysiology of defective proteostasis in the hypothalamus - From obesity to ageing. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 12, p. 723–733, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.107>>.

DE CÁSSIA DA SILVEIRA E SÁ, R.; ANDRADE, L.; DE SOUSA, D. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Monoterpenes. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 1227–1254, 18 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/18/1/1227>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Chronic and degenerative diseases: Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 332–338, 2012.

DE MELLO, A. H. et al. Omega-3 Fatty Acids Attenuate Brain Alterations in High-Fat Diet-Induced Obesity Model. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 513–524, 2019.

DING, R.; MENG, Y.; MA, X. The Central Role of the Inflammatory Response in Understanding the Heterogeneity of Sepsis-3. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–10, 7

jun. 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/5086516/>>. Acesso em: 14 jul. 2019.

ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T. E.; SAPER, C. B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. **Trends in neurosciences**, v. 20, n. 12, p. 565–70, dez. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9416669>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

EMÍLIO-SILVA, M. T. et al. Antipyretic Effects of Citral and Possible Mechanisms of Action. **Inflammation**, v. 40, n. 5, p. 1735–1741, 2017.

FAIN, J. N. et al. Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273–2282, 1 maio 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2003-1336>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Monogenic Obesity in Humans. **Annual Review of Medicine**, v. 56, n. 1, p. 443–458, 19 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.med.56.062904.144924>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

FLATOW, E. A. et al. Elucidating the role of leptin in systemic inflammation: a study targeting physiological leptin levels in rats and their macrophages. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, p. ajpregu.00171.2017, 2017. Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00171.2017>>.

FORNAI, M. et al. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 372, n. 1, p. 79–87, 4 jul. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00210-005-1075-1>>. Acesso em: 30 maio. 2018.

FRAIFELD, V.; KAPLANSKI, J. Brain eicosanoids and LPS fever: species and age differences. **Progress in brain research**, v. 115, p. 141–57, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632934>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

GARAMI, A.; STEINER, A. A.; ROMANOVSKY, A. A. Fever and hypothermia in systemic inflammation. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. 157p. 565–597.

GENUTH, S. M. Diabetologia Effect of High Fat vs. High Carbohydrate Feeding on the Development of Obesity in Weanling oh~oh Mice. **Diabetologia**, v. 12, p. 155–159, 1976. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-540-12898-2_10>. Acesso em: 29 mar. 2018.

GOMES SILVA, M. I.; DE SOUS, F. C. F. Gastric Ulcer Etiology. In: **Peptic Ulcer Disease**. [s.l.] InTech, 2011.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, 2006.

GUZIK, T. J. et al. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 9, p. 1009–1023, 2017.

HARDEN, L. M. et al. Interleukin-6 and leptin mediate lipopolysaccharide-induced fever and sickness behavior. **Physiology & Behavior**, v. 89, n. 2, p. 146–155, 30 set. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938406002241?via%3Dihub#bib36>>. Acesso em: 22 set. 2019.

HARE, A. S.; CLARKE, G.; TOLCHARD, S. Bacterial lipopolysaccharide-induced changes in fos protein expression in the rat brain: correlation with thermoregulatory changes and plasma corticosterone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 7, p. 791–799, 1995.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 270–299, 2010. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/AAF3A295061BF9FA5A2347A65D01BBCE/S0954422410000168a.pdf/highfat_dietinduced_obesity_in_animal_models.pdf>. Acesso em: 12 set. 2019.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 14 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17167474>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

IRVINE, J.; AFROSE, A.; ISLAM, N. Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 2, p. 173–183, fev. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639045.2017.1391838>>. Acesso em: 2 out. 2019.

IWAMOTO, J. et al. Clinical features of gastroduodenal injury associated with long-term low-dose aspirin therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 11, p. 1673, 21 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555156>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

JOHNSON, J. D. et al. Effects of prior stress on LPS-induced cytokine and sickness responses. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 2, p. R422–R432, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00230.2002>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

KAKIMOTO, P. A.; KOWALTOWSKI, A. J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. **Redox Biology**, v. 8, p. 216–225, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221323171630009X?via%3Dihub#t0005>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

KAPUR, A. et al. Modulation of oxidative stress and subsequent induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress allows citral to decrease cancer cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep27530>>.

KATSUKAWA, M. et al. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1801, n. 11, p. 1214–20, nov. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198110001642>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

KLUGER, M. J. Fever: Role of Pyrogens and Cryogens. **Physiological Reviews**, v. 71, n. 1, p. 93–127, jan. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986393>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

KOCH, C. E. et al. High-fat diet induces leptin resistance in leptin-deficient mice. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 2, p. 58–67, 2014.

KOZAK, W.; CONN, C. A.; KLUGER, M. J. Lipopolysaccharide induces fever and depresses locomotor activity in unrestrained mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 1, p. R125–R135, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304533>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

KRALL, C. M. et al. Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D₂. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 6, p. R1512–R1521, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00158.2010>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative Assay for Acute Intestinal Inflammation Based on Myeloperoxidase Activity Assessment of Inflammation in Rat and Hamster Models. **Gastroenterology**, v. 87, p. 1344–50, 1984. Disponível em: <[http://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(84\)90202-6/pdf](http://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(84)90202-6/pdf)>. Acesso em: 25 abr. 2018.

LAI, Y.-S. et al. Ginger essential oil ameliorates hepatic injury and lipid accumulation in high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 10, p. 2062–2071, 16 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26900108>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41–60, 2008.

LAM, Q. L. K.; LU, L. Role of leptin in immunity. **Cellular & molecular immunology**, v. 4, n. 1, p. 1–13, fev. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349207>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

LAWRENCE, C. B.; BROUGH, D.; KNIGHT, E. M. Obese mice exhibit an altered behavioural and inflammatory response to lipopolysaccharide. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 649–659, set. 2012. Disponível em: <<http://dmm.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dmm.009068>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

LEE, H. J. et al. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF- κ B activation in RAW264.7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 3, p. 342–349, 2008.

LI, N.-S. et al. Phloroglucinol protects gastric mucosa against ethanol-induced injury through regulating myeloperoxidase and catalase activities. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 25, n. 4, p. 462–8, ago. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-8206.2010.00877.x>>. Acesso em: 30 maio. 2018.

LIMA, S. Guarana (*Paullinia cupana*) Stimulates Mitochondrial Biogenesis in Mice Fed High-Fat Diet. 2018.

LOMBA, L. A. et al. A Naphthoquinone from *Sinningia canescens* Inhibits Inflammation and Fever in Mice. v. 40, n. 3, 2017.

MAFFEI, M. et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature medicine**, v. 1, n. 11, p. 1155–61, nov. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584987>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MALDONADO-RUIZ, R. et al. Microglia activation due to obesity programs metabolic failure leading to type two diabetes. **Nutrition & Diabetes**, v. 7, n. 3, p. e254, 20 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nutd.2017.10>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

MANGPRAYOOL, T.; KUPITTAYANANT, S.; CHUDAPONGSE, N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. **Fitoterapia**, v. 89, n. 1, p. 68–73, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2013.05.012>>.

MARIK, P. E.; BELLOMO, R. Stress hyperglycemia: an essential survival response! **Critical Care**, v. 17, n. 2, p. 305, 6 mar. 2013. Disponível em: <<http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc12514>>. Acesso em: 14 jul. 2019.

MEI, X.-T. et al. Zinc(II)–curcumin accelerates the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by decreasing oxidative stress and downregulation of matrix metalloproteinase-9. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 448–454, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933360>>. Acesso em: 30 maio. 2018.

MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 359–70, 14 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144836>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

MILNER, J. J.; BECK, M. A. 5th International Immunonutrition Workshop Micronutrients, immunology and inflammation The impact of obesity on the immune response to infection. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, p. 298–306, 2012a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0029665112000158>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

MILNER, J. J.; BECK, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 298–306, 14 maio 2012b. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665112000158/type/journal_article>. Acesso em: 30 jun. 2019.

MINIHANE, A. M. et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 7, p. 999–1012, 14 out. 2015. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114515002093>. Acesso em: 30 jan. 2018.

MODAK, T.; MUKHOPADHAYA, A. Effects of citral, a naturally occurring antiadipogenic

molecule, on an energy-intense diet model of obesity. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 3, p. 300, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713095>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

MORANDI, A. et al. High-fat meal, systemic inflammation and glucose homeostasis in obese children and adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 6, p. 986–989, 20 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ijo201748>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

MORROW, L. E. et al. Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 5, p. R1010–R1016, maio 1993. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1993.264.5.R1010>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289–295, 21 set. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature05026>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. M. Circulating Cytokines as Mediators of Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. Supplement_5, p. S178–S184, 1 out. 2000. Disponível em: <http://academic.oup.com/cid/article/31/Supplement_5/S178/333323/Circulating-Cytokines-as-Mediators-of-Fever>. Acesso em: 17 maio. 2018.

NISHIJIMA, C. M. et al. Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 736, p. 16–25, 5 ago. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.04.029>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1 jun. 1979. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269779907383>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

OKA, T. Stress-induced hyperthermia and hypothermia. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l.] Elsevier, 2018. 157p. 599–621.

OSMAN, W. A. et al. Synergistic analgesic, anti-pyretic and anti-inflammatory effects of extra virgin olive oil and ibuprofen in different experimental models of albino mice. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1326–1336, 1 out. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1756-185X.13105>>. Acesso em: 2 out. 2019.

PAROLA, M. et al. 4-Hydroxynonenal As a Biological Signal: Molecular Basis and Pathophysiological Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 1, n. 3, p. 255–284, 19 set. 1999. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.1999.1.3-255>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

PLÓCIENNIKOWSKA, A. et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 3, p. 557–581, 22 fev. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-014-1762-5>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

POHL, J.; WOODSIDE, B.; LUHESHI, G. N. Changes in Hypothalamically Mediated Acute-Phase Inflammatory Responses to Lipopolysaccharide in Diet-Induced Obese Rats. **Endocrinology**, v. 150, n. 11, p. 4901–4910, 1 nov. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2009-0526>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

POHL, J.; WOODSIDE, B.; LUHESHI, G. N. Leptin modulates the late fever response to LPS in diet-induced obese animals. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 42, p. 41–47, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.07.017>>.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 497–502, jun. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000300023&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 1 jul. 2019.

RAMÍREZ-OROZCO, R. E. et al. Diet-induced obese mice exhibit altered immune responses to early Salmonella Typhimurium oral infection. **Journal of Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 673–682, 23 set. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30141160>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10 SUPPL., 2008.

ROMANOVSKY, A. A. et al. First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? **The American journal of physiology**, v. 271, n. 1 Pt 2, p. R244-53, jul. 1996. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1996.271.1.R244>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 10, p. 2193–216, 1 set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970487>>. Acesso em: 1 abr. 2018.

RUDAYA, A. Y. et al. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 5, p. R1244–R1252, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00370.2005>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

RUMMEL, C. et al. Obesity Impacts Fever and Sickness Behavior During Acute Systemic Inflammation. **Physiology**, v. 31, n. 2, p. 117–130, mar. 2016. Disponível em: <<http://physiologyonline.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physiol.00049.2015>>. Acesso em: 29 jun. 2019.

SACHOT, C.; POOLE, S.; LUHESHI, G. N. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. **The Journal of Physiology**, v. 561, n. 1, p. 263–272, 15 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388782>>. Acesso em: 22 set. 2019.

SAMUELS, L. T.; GILMORE, R. C.; REINECKE, R. M. The Effect of Previous Diet on the Ability of Animals to do Work During Subsequent Fasting. **The Journal of Nutrition**, v. 36, n. 5, p. 639–651, 1 nov. 1948. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/36/5/639/4725869>>.

Acesso em: 12 jul. 2019.

SAPER, C. B.; ROMANOVSKY, A. A.; SCAMMELL, T. E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1088–1095, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn.3159>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

SCULLY, T. Public health: Society at large. v. 508, n. 7496, p. S50–S51, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24740125>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

SGANGA, G. Surgical sepsis. **Rivista Urologia**, v. 82, n. 2, p. 75–83, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25754409>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

SHEN, Y.; SUN, Z.; GUO, X. Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR- γ . **European Journal of Pharmacology**, v. 747, p. 45–51, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.040>>.

SMITH, A. G. et al. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 5, p. 1236–43, 1 maio 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/137/5/1236/4664595>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

SONG, Y. et al. Effects of Citral on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 663–671, 2016.

SOO HAN, H. et al. Molecular and Cellular Pathways as a Target of Therapeutic Hypothermia: Pharmacological Aspect. **Current Neuropharmacology**, v. 10, n. 1, p. 80–87, 17 fev. 2012.

SOSTRES, C. et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121–132, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227026>>. Acesso em: 17 maio. 2018.

STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Role of the preoptic carbon monoxide pathway in endotoxin fever in rats. **Brain research**, v. 927, n. 1, p. 27–34, 8 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11814429>>. Acesso em: 8 fev. 2018.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacological reports : PR**, v. 59, n. 3, p. 247–58, 2007. Disponível em: <http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2007/3_247.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2018.

TAKAHASHI, Y. et al. Circumventricular organs and fever. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 5 Pt 2, p. R1690-5, nov. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374811>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

THALER, J. P. et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 153–162, 3 jan. 2012.

TILDERS, F. J. H. et al. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial

endotoxins: Routes and intermediate signals. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 2, p. 209–232, jan. 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306453094900108>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772–783, 22 out. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nri1937>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

TONG, G. et al. Deep hypothermia therapy attenuates LPS-induced microglia neuroinflammation via the STAT3 pathway. **Neuroscience**, v. 358, p. 201–210, 1 set. 2017.

UCHIDA, N. S. et al. Hepatoprotective Effect of Citral on Acetaminophen-Induced Liver Toxicity in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–9, 22 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/1796209/>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

ULEYMAN, H.; AY, F. A.; ALTINKAYNAK, K. The effect of nimesulide on the indomethacin- and ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Pharmacological Research**, v. 45, n. 2, 2002. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1547–1565, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923189>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

WHO. **WHO | World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 12 set. 2019.

XIU, F. et al. Stress hyperglycemia, insulin treatment, and innate immune cells. **International journal of endocrinology**, v. 2014, p. 486403, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899891>>. Acesso em: 14 jul. 2019.

ANEXO 1: PROTOCOLO Nº 1080-CEUA



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



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do efeito antipirético do citral no desafio imune em camundongos obesos com dieta hiperlipídica", Protocolo nº **1080-CEUA**, sob a responsabilidade de **Clelia Akiko Hiruma-Lima**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 19/5/2018	Término: 28/2/2020
Espécie/linhagem:	<i>Camundongo swiss</i>	
Nº de animais:	240	
Peso:	30g	Idade: 4-6 semanas
Sexo:	<i>Macho</i>	
Origem	<i>CPPA – Centro de Pesquisa e Produção de Animais – Botucatu/SP</i>	

Botucatu, 4 de maio de 2018.

Prof. Dr. Bruno Cesar Schimming
Presidente da CEUA



ANEXO 2: Tabela da composição da dieta padrão e 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

ANEXO 3: Tabela com valores de leitura de PGE₂ na AVPO após 90 min de indução de inflamação sistêmica com LPS em animais dieta padrão (DP) e hiperlipídica (HFD).

		PGE ₂ AVPO (pg/g de tecido)						
Tween 80	DP	<25.383	<25.383	<25.383	<25.383	<25.383	255.726	
	+ Salina	HFD	<25.383	229.212	<25.383	<25.383	<25.383	247.1895
Tween 80	DP	<25.383	<25.383	<25.383	256.086	305.708	299.276	
	+ LPS	HFD	<25.383	<25.383	<25.383	<25.383	<25.383	<25.383
IBU	DP	<25.383	<25.383	249.557	<25.383	234.801	<25.383	
	+ LPS	HFD	<25.383	<25.383	<25.383	241.272	<25.383	<25.383
Citral 300	DP	<25.383	<25.383	<25.383	267.485	244.881	<25.383	228.744
	+Salina	HFD	<25.383	229.104	<25.383	<25.383	<25.383	<25.383
Citral 25	DP	<25.383	<25.383	<25.383	254.133	249.381		
	+ LPS	HFD	<25.383	<25.383	238.356	<25.383	<25.383	<25.383
Citral 100	DP	<25.383	<25.383	<25.383	<25.383	236.106	271.345	264.294
	+ LPS	HFD	<25.383	<25.383	240.048	233.658	<25.383	<25.383
Citral 300	DP	232.353	228.717	244.305	<25.383	<25.383	259.542	
	+ LPS	HFD	231.642	241.785	229.662	<25.383	269.082	<25.383