RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 24/02/2027.

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

UNIVERSIDADE PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional

Setor de Fisiologia

ESTUDO DA AÇÃO DO CITRAL NA PERMEABILIDADE INTESTINAL E ENDOTOXEMIA METABÓLICA EM CAMUNDONGOS OBESOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Maycon Tavares Emílio Silva

BOTUCATU – SP
2025

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO DA AÇÃO DO CITRAL NA PERMEABILIDADE INTESTINAL E ENDOTOXEMIA METABÓLICA EM CAMUNDONGOS OBESOS ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

MAYCON TAVARES EMÍLIO SILVA

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

Profa Titular Clélia Akiko Hiruma Lima

BOTUCATU – SP
2025

S586e

Silva, Maycon Tavares Emilio
Estudo da ação do citral na permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica / Maycon Tavares Emilio Silva. -- Botucatu, 2025
138 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Clelia Akiko Hiruma Lima
Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

1. Dieta hiperlipídica. 2. Permeabilidade intestinal. 3. Dislipidemia. 4. Endotoxemia metabólica. 5. Monoterpeno. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MAYCON TAVARES EMÍLIO SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 14h, no(a) Sala de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de MAYCON TAVARES EMÍLIO SILVA, intitulada **Estudo da ação do citral na permeabilidade intestinal e endotoxemia metabólica em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional – Setor Fisiologia / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Prof. Dr. LUIZ GUILHERME DE SIQUEIRA BRANCO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Básica e Oral / Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidae de São Paulo, Profa. Dra. MARCIANE MILANSKI FERREIRA (Participação Presencial) do(a) Laboratório de Distúrbios do Metabolismo / Faculdade de Ciências Aplicadas/Limeira - Unicamp, Profa. Dra. MAELI DAL PAI (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional – Setor Anatomia / Instituto de Biociências - UNESP Botucatu. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A presente tese de doutoramento oferece para a sociedade um maior aprofundamento sobre um composto que apresenta ampla atuação farmacológica, fundamentada desde a hipótese de sua atuação terapêutica baseada no conhecimento popular até a comprovação pré-clínica de suas ações farmacológicas. O citral, é uma mistura de monoterpenos (geral e neral), presente como composto majoritário em diferentes espécies de plantas, como o capim-limão e gengibre. Diante do potencial impacto benéfico desse composto para a saúde humana, e associado a Agenda para o Desenvolvimento Sustentável da Organização Mundial da Saúde, que tem como uma de suas áreas cruciais assegurar uma vida saudável e garantir o bem-estar de todos, o objetivo deste trabalho foi elucidar o efeito do citral no combate aos danos atribuídos a ingestão de dietas desbalanceadas. Nossos estudos, através de ensaios pré-clínicos *in vivo* e *in vitro* que mimetizam as alterações metabólicas e inflamatórias associadas a obesidade, demonstram o papel benéfico do citral, através do tratamento crônico por via oral, contra o dano causado por uma dieta rica em lipídeos em camundongos. Os resultados demonstram que o citral protege contra alterações prejudiciais ao trato gastrointestinal, metabolismo e respostas inflamatórias. Nossos resultados são essenciais para os avanços de uma futura aplicação clínica do citral e criação de estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças metabólicas como a obesidade.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This thesis provides society with the knowledge of a compound with a wide range of pharmacological effects and supports the hypothesis of its therapeutic action based on popular knowledge. Citral, is a mixture of monoterpenes, is the main compound present in different plant species. Given the potential beneficial effects of this molecule on human health, and in the context of the World Health Organisation's Agenda for Sustainable Development, one of the key areas is to ensure a healthy life and guarantee the well-being of all. The aim of this work was to elucidate the effect of citral against the damage caused by an unbalanced diet. Our studies, through in vivo and in vitro preclinical studies that mimic the metabolic and inflammatory changes associated with obesity. We demonstrate the beneficial role of citral, through chronic oral treatment, against the damage caused by a high-fat diet in mice. The results show that citral protects against harmful changes in the gastrointestinal tract, metabolism and inflammatory responses. Our results are essential for advancing in the future clinical application of citral and the development of therapeutic strategies for the treatment of metabolic diseases such as obesity.

DEDICATÓRIA

A Silvana, Claudinei, Antônia e Sidney

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pelos dias vividos e conquistas.

Agradeço aos meus pais, Claudio e Silvana, pelas conversas, torcidas, investimento e apoio que me proporcionaram a estrutura necessária para chegar até onde cheguei. Obrigado e amo vocês.

À Clelia, pelo exemplo de orientadora, professora e pessoa que tenho desde 2011. O incentivo e investimento que foram oferecidos me incentivou e motivou para chegar até aqui. É um exemplo e espelho de docente que busco me tornar, exatamente por ser essa pessoa carinhosa e profissional excepcional.

À Lúcia e Silvinha que são pessoas que exibem a paixão pelo ensinar.

Aos professores Júlio, Alba e Maria Elena, que me receberam e apoiaram em experimentos durante o meu estágio no exterior em Granada/Espanha. Sou eternamente grato por abrirem as portas do laboratório e do grupo para que eu pudesse crescer e construir um vínculo nesse processo que foi morar fora.

Ao Vinicius, Garboso ou Garbs que foi o companheiro de bancada e amigo para todas as horas, sem dúvidas que grande parte desse trabalho foi porque pude contar com sua parceria.

A Mariana que foi um presente conhecê-la e participar um pouquinho da sua trajetória. É uma pessoa carinhosa e dedicada que tem um futuro lindo na academia, obrigado por ser esse pedacinho de luz. Por favor, se alimente melhor.

A Rie, Gabi, Renata, Felipinho, Felipe, Maria Luiza, Isabela, Laura, Priscila e todos que fizeram parte do Laboratório de Ensaios Biológicos de Produtos Naturais. Vocês foram base para o desenvolvimento desse trabalho, não somente por ajudarem nos métodos e no desenvolvimento, mas principalmente pela companhia, amizade e conversas que foram essenciais para minha vida. Sou eternamente grato.

Aos meus amigos de departamento, os momentos do café e do compartilhamento de informações foram motivadores para continuar os dias e as semanas de trabalho.

Aos coordenadores do projeto de extensão universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP” responsável pelo desenvolvimento dos cursos de férias “Reprodução de A à Z” e “Uma aventura cientifica pelo Corpo Humano”. Minha formação é baseada na extensão universitária, vim de escola pública e fiz o primeiro curso de férias, o meu carinho e respeito por esse projeto me fazem acreditar o quanto essa ferramenta de popularização da ciência é necessária para que outros estudantes cheguem até aqui. Muito obrigado.

Agradeço ao departamento, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, ao Instituto de Biociências e a UNESP por proporcionarem espaço e estrutura acadêmica para minha formação.

Obrigado a CAPES, FAPESP e CNPq ao apoio financeiro.

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, nº processo 311957/2020-0) e

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, nº processo 2020/15225-1 e 2021/11110-8).



PRÓLOGO

A realização da presente tese disponibilizou a elucidação da ação farmacológica de um composto natural presente em diferentes espécies de plantas para a futura aplicação clínica em doenças metabólicas. Ao decorrer da execução do projeto, foram realizadas atividades complementares de difusão e popularização do conhecimento, a fim de enriquecer a formação cientifica, acadêmica e pessoal do aluno.

Artigos completos publicados

2025:

Ohara, R., Dario, F. L., **Emílio-Silva, M. T.**, Assunção, R., Rodrigues, V. P., Bueno, G., Raimundo, P. R., Justulin, L. A., da Rocha, L. R. M., Hiruma-Lima, C. A. A high-fat diet changes the interaction of the extracellular matrix, cytokines, and growth factors in gastric ulcer repair. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 755, 151565, 2025.

Dos Santos, I. B. L., Fioretto, M. N., Jorge, M. S., Barata, L. A., Ribeiro, I. T., Franzolin, A. M. L., Stoppa, E. G., Mattos, R., Portela, L. M. F., **Emílio Silva, M. T**., Dos Santos, S. A. A., de Arruda Miranda, J. R., Hiruma Lima, C. A., Justulin, L. A. Maternal protein restriction impairs intestinal morphophysiology and antioxidant system in young male offspring rats. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 446(1), 114464, 2025.

2023:

Ohara, Rie; Dario, Felipe Lima; **Emílio-Silva, Maycon Tavares**; Assunção, Renata; Rodrigues, Vinícius Peixoto; Bueno, Gabriela; Raimundo, Priscila Romano; Da Rocha, Lúcia Regina Machado; Hiruma-Lima, Clelia Akiko. Citral Modulates MMP-2 and MMP-9 Activities on Healing of Gastric Ulcers Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, v. 24, p. 4888, 2023.

Santos, Bruna M.; Santos, Wanderson S.; Solon, Isabelly G.; Garcia, Felipe S.; **Emilio-Silva, Maycon T.**; Jesus, Aline A.; Hiruma-Lima, Clélia A.; Nascimento, Glauce C; Cárnio, Evelin C.; Branco, Luiz G.S. Orofacial Anti-hypernociceptive Effect of Citral in Acute and Persistent Inflammatory Models in Rats. ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY, v. 152, p. 105734, 2023.

Cucielo, Maira Smaniotto; Freire, Paula Paccielli; **Emílio-Silva, Maycon Tavares**; Romagnoli, Graziela Gorete; Carvalho, Robson Francisco; Kaneno, Ramon; Hiruma-Lima, Clélia Akiko; Delella, Flávia Karina; Reiter, Russel J.; Chuffa, Luiz Gustavo De Almeida. Melatonin enhances cell death and suppresses the metastatic capacity of ovarian cancer cells by attenuating the signaling of multiple kinases. PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE, v. 248, p. 154637, 2023.

2021:

Bueno, G.; Rico, S. L. C.; Perico L, L.; Ohara, Rie; Rodrigues, Vinicius P.; **Emílio-Silva, M.T.**; Assuncao, R.; Rocha, L. R. M.; Nunes, D. S.; Besten, M. A.; Heiden, G.; Camargo, A. C. L.; Justulin, L. A.; Hiruma-Lima, C. A.. The essential oil from Baccharis trimera (Less.) DC improves gastric ulcer healing in rats through modulation of VEGF and MMP-2 activity. JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, v. 271, p. 113832, 2021.

2020:

Emílio-Silva, Maycon T.; Rodrigues, Vinicius P.; Bueno, Gabriela; Ohara, Rie ; Martins, Marina G.; Horta-Júnior, José A. C.; Branco, Luiz G. S.; Rocha, Lúcia R. M.; Hiruma-Lima, Clélia A.. Hypothermic Effect of Acute Citral Treatment during LPS-induced Systemic Inflammation in Obese Mice: Reduction of Serum TNF-α and Leptin Levels. BIOMOLECULES, v. 10, p. 1454, 2020.

Trabalhos apresentados em eventos científicos

Apresentação Oral

EMILIO-SILVA, M. T.; RODRIGUES, V. P. ; RUIZ-MALAGON, A. J. ; FIORAVANTI, M. M. ; FIORETTO, M. N. ; OHARA, R. ; BUENO, G. ; DARIO, F. L. ; JUSTULIN JR, L. A. ; RODRIGUEZ-NOGALES, A. ; GALVEZ, J. ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA, C.A. . CITRAL, a monoterpene that protects against the intestinal and systemic damage caused by high-fat diet and lipopolysaccharide in mice. 14th Latin American and Caribbean Congress of Immunology, Buenos Aires, Argentina, 2024.

Apresentação de Painel

EMILIO-SILVA, M. T.; RODRIGUES, V. P. ; RUIZ-MALAGON, A. J. ; FIORAVANTI, M. M. ; OHARA, R. ; BUENO, G. ; DARIO, F. L. ; RODRIGUEZ-NOGALES, A. ; GALVEZ, J. ; ROCHA, L.

R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Anti-obesity effect of citral through metabolic and intestinal modulation in high-fat diet-induced obese mice. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Campinas, Brasil, 2024.

DARIO, F. L. ; AQUINO, M. L. A. ; FAGUNDES, F. L. ; **EMILIO-SILVA, M. T.** ; OLIVEIRA, L. V. F. ; GUIDOLIN, I. G. ; BUENO, G. ; FIORAVANTI, M. M. ; ASSUNCAO, R. ; RODRIGUES, V. P. ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Antinociceptive action of citral through the CB2 receptor is more pronounced in obese adult male C57BL/6J mice. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Campinas, Brasil, 2024.

AQUINO, M. L. A. ; DARIO, F. L. ; FAGUNDES, F. L. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; OLIVEIRA, L. V. F. ; GUIDOLIN, I. G. ; FIORAVANTI, M. M. ; ASSUNCAO, R. ; RODRIGUES, V. P. ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of citral on obese adult male C57BL/6J mice. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Campinas, Brasil, 2024.

ASSUNCAO, R. ; PINTO, T. S. ; ANDRADE, A. F. C. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; ZAMBUZZI, W. F. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Myrcene and limonene: comparison in cell differentiation through modulation of adipogenic factors in 3T3-L1 cells. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Campinas, Brasil, 2024.

GUIDOLIN, I. G. ; RODRIGUES, V. P. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; DARIO, F. L. ; BUENO, G. ; DUARTE, J. L. ; OLIVEIRA, L. V. F. ; FIORAVANTI, M. M. ; FAGUNDES, F. L. ; CHORILLI, M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Activity of free and nanoemulsified myrcene in modulating ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate in adult C57BL/6J male mice: the involvement of antioxidant mechanism. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Campinas, Brasil, 2024.

FIORAVANTI, M. M. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; DARIO, F. L. ; RODRIGUES, V. P. ; BUENO, G. ; OLIVEIRA, L. V. F. ; GUIDOLIN, I. G. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Hepatoprotective effect of citral against injury caused by metabolic endotoxemia in adult male C57BL/6J mice fed with a high-fat diet. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Campinas, Brasil, 2024.

SANTOS, R. C. ; BAGGIO, C. H. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; HIRUMA-LIMA, C. A. ; MACNAUGHTON, W. K. . Investigating the role of the flavonoid cyanidin in intestinal inflammatory damaged. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Campinas, Brasil, 2024.

BUENO, G. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; FAGUNDES, F. L. ; RODRIGUES, V. P. ; DARIO, F. L. ; OLIVEIRA, L. V. F. ; GUIDOLIN, I. G. ; AQUINO, M. L. A. ; FIORAVANTI, M. M. ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . The role of myrcene in obesity associated with colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) in C57BL/J6 male mice. XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Campinas, Brasil, 2024.

GUIDOLIN, I. G. ; RODRIGUES, V. P. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; DARIO, FELIPE LIMA ; FAGUNDES, F. L. ; BUENO, GABRIELA ; HIRUMA-LIMA, CLÉLIA A. . Efeito do mirceno livre e nanoemulsionado na retocolite ulcerativa induzida por dextran sulfato de sódio em camundongos machos C57BL/6J. 23º JONUB, Unesp-IB, Botucatu, 2024.

OLIVEIRA, L. V. F. ; BUENO, G. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; DARIO, F. L. ; FAGUNDES, F. L. ; HIRUMA-LIMA, CLÉLIA A. O mirceno pode melhorar o quadro de retrocolite ulcerativa agravada por dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6J machos? 23º JONUB, Unesp-IB, Botucatu, 2024.

AQUINO, M. L. A. ; DARIO, F. L. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; FAGUNDES, F. L. ; OLIVEIRA, L. V. F. ; GUIDOLIN, I. G. ; BUENO, G. ; FIORAVANTI, M. M. ; RODRIGUES, V. P. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . A ação antinociceptiva e antiedematogênica do citral é alterada na obesidade? Congresso de Biociências, Unesp-IB, Botucatu, 2024.

FIORAVANTI, M. M. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; RODRIGUES, V. P. ; DARIO, F. L. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Citral atenuated inflammatory and liver damage in obese mice with lipopolysaccharide-induced metabolic endotoxemia. Ninth International Symposium on Inflammatory Diseases INFLAMMA IX, Ribeirão Preto, Brasil, 2024.

EMILIO-SILVA, M. T.; RODRIGUES, V. P. ; RUIZ-MALAGON, A. J. ; OHARA, R. ; BUENO, G. ; DARIO, F. L. ; RODRIGUEZ-NOGALES, A. ; GALVEZ, J. ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. AKIKO . Citral ameliorates the intestinal and metabolic alterations in mice fed with a high-fat diet. 9th Brazilian Conference on Natural Product/ XXXV RESEM, Salvador, Bahia, 2023.

FIORAVANTI, M. M. ; **EMILIO-SILVA, M. T.** ; ROCHA, L. R. M. ; HIRUMA-LIMA, C. A. . Efeito antiobesogênico do citral em camundongos C57BL/6J obesos induzidos por dieta hiperlipídica. XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, Atibaia, 2023.

ASSUNCAO, R. ; PINTO, T. S. ; ANDRADE, A. F. C. ; **EMILIO-SILVA, M. T.**; ZAMBUZZI, W. F. ; HIRUMA-LIMA, CLÉLIA A. . Limonene acts on cell differentiation through modulation of adipogenic factors in 3T3-L1 cells. 54th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2022.

MATTOS, R. ; JUSTULIN JR, L. A. ; FIORETTO, M. N. ; PORTELA, L. M. F. ; BARATA, L. A. ; SANTOS, S. A. A. ; **EMILIO-SILVA, M. T.** ; HIRUMA-LIMA, CLÉLIA A. . Restrição Proteica Materna modula parâmetros inflamatórios e estresse celular na próstata dorsolateral de ratos senis. XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-IB, Botucatu, 2022.

Premiações e Menção Honrosa

2024:

Menção Honrosa pelo trabalho "Anti-Obesity Effect of Citral Through Metabolic and Intestinal Modulation in High-Fat Diet-Induced Obese Mice", XXXVIII Reunião Anual da FeSBE.

2024:

Menção Honrosa pelo trabalho "Antinociceptive action of citral through the CB2 receptor is more pronounced in obese adult male C57BL/6J mice", XXXVIII Reunião Anual da FeSBE.

2023:

Prêmio pelo poster "Citral Has Antiobesogenic Activity Improving Adipose Tissue Endocrine Function of High-Fat Diet-Induced Obesity Mice", 9th Brazilian Conference on Natural Product/ XXXV RESEM.

Coorientação em projeto de iniciação cientifica

2023-2024:

Coorientação da aluna de graduação em Ciências Biológicas Mariana Moraes Fioravanti. Projeto PIBIC-CNPq “Ação do citral sobre os parâmetros do estresse oxidativo e dano hepático em fígados de camundongos C57BL/6J machos no modelo de doença hepática gordurosa não alcoólica agravada por obesidade.”

Participação em eventos científicos

14th Latin American and Caribbean Congress of Immunology, ALACI, Buenos Aires, Argentina, 2024.

Workshop on Environmental Toxicology, UNESP-IB, Botucatu, São Paulo, 2024.

XXXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE). UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2024.

3D Cell Culture: innovation, tools, and application, USP, São Paulo, 2024.

9th Brazilian Conference on Natural Products (BCNP), Salvador, Bahia, 2023.

Tópicos em Biossegurança e Organismos Geneticamente Modificados (OGMs e AnGMs). UNESP-IB, Botucatu, São Paulo, 2023.

Contribuições Das Medicinas Tradicionais, Complementares E Integrativas (MTCI) No Contexto Do Covid-19 / Simpósio Internacional Sobre Las Contribuciones De Las Medicinas Tradicionales, Complementarias E Integrativas (MTCI) En El Contexto De Covid-19. Online, 2020.

VI Simpósio OCRC. UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2020.

XVIII Encontro da Rede Nacional Leopoldo de Meis de Educação e Ciência - Novos Talentos da Rede Pública. UNESP-IB, Botucatu, São Paulo, 2020.

Participação em bancas avaliadoras

2024:

Avaliador do XIII Congresso de Biociências.

Avaliador dos trabalhos apresentados na 1ª fase XXXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP- IB/Botucatu.

2023:

Avaliador dos trabalhos apresentados na 1ª fase do XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp - IB/Botucatu.

2021:

Avaliador dos trabalhos apresentados na 1ª fase do XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - IB/Botucatu.

2020:

Avaliador dos trabalhos apresentados na 1ª fase do XXXII Congresso de Iniciação Cientifica da Unesp.

Cursos realizados

2024:

Aspectos operacionais I: organização de documentos e dados de pesquisa. Fundação Oswaldo Cruz, FioCruz-Brasilia (10h)

Curso prático de microscopia no 12º Workshop Teórico-Prático do INFABiC Explorando a Microscópio. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (20h)

2023:

Curso de Letramento Científico. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. (30h).

Estágio no exterior

2022-2023:

Estágio no exterior sob orientação do Prof Julio Gálvez no laboratório de Produtos Naturais, na Universidade de Granada, Espanha. Linha de fomento para bolsa de estágio no exterior BEPE-FAPESP (proc. nº 2021/11110-8) “Investigação do efeito do citral na microbiota fecal de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica”.

Representação em colegiados

2020-2021:

Suplente da representação discente junto a Congregação do Instituto de Biociências, Botucatu, UNESP.

2021-2022:

Representação discente junto a Comissão Permanente de Pesquisa do Instituto de Biociências, Botucatu, UNESP.

Organização de Eventos

2025:

Comissão Organizadora do Curso de Férias "Uma Aventura Científica pelo Corpo Humano" como parte das atividades da Rede Nacional Leopoldo de Meis de Educação e Ciência – RNEC. (90h)

Atividades de extensão

2021 e 2024:

Monitor no curso de férias em Reprodução de A a Z no projeto de extensão universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP”. (88h)

2024:

Monitor no projeto de extensão "Jovens e futuro: desenvolvendo potências de ação a partir do conhecimento" para alunos da rede básica do ensino público. (20h)

Apresentação da palestra “Alterações intestinais na obesidade”, para a Liga Acadêmica de Gastroenterologia de Bauru, Universidade Nove de Julho, Bauru, São Paulo, 2024.

2023:

Monitor no I Curso de Inverno do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada para Graduação. 2023.

Atividades de ensino

2024:

Professor bolsista junto ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, setor de Fisiologia, do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP. Ministrou nas disciplinas:

Fisiologia Humana – Ciências Biológicas (16h)

Fisiologia Geral Humana I – Ciências Biomédicas (34h)

Fisiologia Humana II – Física Médica (30h)

Fisiologia Humana – Nutrição (46h)

2023:

Estágio docência pelo Programa de Atividades e Aperfeiçoamento em Docência no Ensino Superior - PAADES na Disciplina de Fisiologia Geral e Comparada: Regulação (8h) sob responsabilidade do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, setor de Fisiologia, do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP.

Disciplinas cursadas

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada (2 créditos) – Conceito A

DOHaD: Do conceito à prática clínica (4 créditos) – Conceito A

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

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: "Signaling pathways that control skeletal muscle phenotype". (2 créditos) – Conceito A

Imunomodulação por produtos naturais (6 créditos) – Conceito A

TE: Nanomedicamentos, Biomateriais e sistemas de liberação de fármacos (3 créditos) – Conceito A

RESUMO

A obesidade está diretamente associada ao desequilíbrio do microambiente intestinal e ao acúmulo de gordura no tecido adiposo, causado pela ingestão de uma dieta desbalanceada. O acúmulo de gordura também é influenciado pelo aumento dos níveis sistêmicos de lipopolissacarídeo (LPS), um quadro conhecido como endotoxemia metabólica. No entanto, os mecanismos envolvidos nas alterações no epitélio intestinal em decorrência da obesidade são pouco compreendidos, bem como fatores para revertê-los. Diante disso, a busca por moléculas que restabeleça as alterações decorrentes do processo inflamatório e reduza o aumento da permeabilidade intestinal, pode ser uma alternativa para o tratamento da doença. O citral (CT) possui comprovada ação anti-inflamatória, antihiperlipidêmica e gastroprotetora. Assim, o nosso objetivo foi investigar o impacto do CT contra os danos sistêmicos e teciduais associados ao LPS e à dieta hiperlipídica (HFD) em modelos *in vitro* e *in vivo* que mimetizam a obesidade. Para isso, utilizamos camundongos machos C57BL/6J (4-6 semanas, n=5-10/grupo) alimentados durante 17 semanas com dieta padrão (DP) e hiperlipidica (HFD), concomitante, com o tratamento oral diário com CT (25, 100 ou 300 mg/kg) e seu veículo (Tween 80 à 1%, 10 mL/kg). Para simular a endotoxemia metabólica, os animais foram submetidos com injeção intraperitoneal (i.p.) com LPS à 10 µg/kg uma vez por semana juntamente com a oferta de HFD durante 10 semanas e tratados oralmente com CT na dose de 300 mg/kg. O ganho de massa corporal e a ingestão calórica foram avaliados, assim como, o perfil metabólico, o índice de adiposidade e expressão gênica de parâmetros inflamatórios. Em estudos *in vitro*, utilizamos as linhagens celulares epitelial do cólon normal humano (NCM-356) e carcinoma retal murino CMT-93, estimuladas com LPS por 48h e 72h, respectivamente, a fim de avaliar a viabilidade celular, cicatrização de feridas (*wound-healing assay*) e expressão proteica de marcadores associados a permeabilidade e a inflamação. Para a análise estatística utilizamos ANOVA de uma e duas vias seguida do pós-teste de Tukey ($p<0,05$). O tratamento diário com CT preveniu o ganho de massa corporal quando comparado ao grupo de animais alimentados com HFD ($p<0,05$). No entanto, essa resposta foi abolida quando realizada a administração exógena de LPS por 10 semanas. Além disso, o monoterpeno (300 mg/kg), promoveu uma redução significativa no índice de adiposidade e nos níveis séricos de colesterol total e LDL, assim como, um efeito anti-hiperglicêmico em comparação com os camundongos obesos ($p<0,05$). O tratamento dos animais com CT preveniu o quadro de endotoxemia metabólica, consequentemente exibiu um efeito anti-inflamatório sistêmico e no cólon, prevenindo o aumento da expressão gênica do inflamassoma NLRP3 induzido pela HFD além de aumentar a excreção de colesterol pelas fezes. O CT (50 µg/mL) apresentou um efeito proliferativo em células NCM-356 quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$). Durante a endotoxemia metabólica induzida com LPS exógeno, o tratamento com CT promoveu a diminuição da atividade da MPO e dos níveis de MDA no fígado, quando comparado ao grupo HFD ($p<0,05$) demonstrando a presença de uma ação protetora e anti-inflamatória do monoterpeno. A capacidade antioxidante do CT foi demonstrada ao prevenir o aumento da atividade da SOD causado pela ingestão de HFD, quando comparado ao grupo DP ($p<0,05$). Também observamos que o CT reverteu o dano epitelial durante a cicatrização de ranhuras em 24h e 48h na presença de LPS, quando comparado com o grupo de 6h, efeito esse que elucida a ação benéfica do monoterpeno frente a mudança da permeabilidade intestinal durante a obesidade. Desta forma, podemos concluir que o CT apresenta ação antiobesogênica, anti-inflamatória e antihiperlipidemica através de um efeito protetor contra alterações intestinais e hepáticas durante o desenvolvimento e progressão do quadro de obesidade.

Palavras-chave: *Dieta hiperlipidica; permeabilidade intestinal; dislipidemia; endotoxemia metabólica; monoterpeno.*

ABSTRACT

Obesity is directly related to an imbalance in the gut microenvironment and fat accumulation in adipose tissue caused by an unbalanced diet. Fat accumulation is also influenced by increased systemic lipopolysaccharide (LPS), a condition known as metabolic endotoxemia. However, the mechanisms involved in obesity-induced changes in the intestinal epithelium are poorly understood, as are the factors that can reverse them. Therefore, the search for molecules that reverse the changes resulting from the inflammatory process and reduce the increase in intestinal permeability may be an alternative for the treatment of the disease. Citral (CT) has been shown to have anti-inflammatory, antihyperlipidemic, and gastroprotective effects. Thus, our aim was to investigate the impact of CT against systemic and tissue damage associated with LPS and high-fat diet (HFD) in *in vitro* and *in vivo* models that mimic obesity. Male C57BL/6J mice (4-6 weeks, n=5-10/group) was fed for 17 weeks with a standard diet (SD) and high-fat diet (HFD), concomitantly with daily oral treatment with CT (25, 100 or 300 mg/kg) and its vehicle (1% Tween 80, 10 mL/kg). To simulate metabolic endotoxemia, the animals were subjected to intraperitoneal (i.p.) injection of LPS at 10 µg/kg once a week together with the HFD offer for 10 weeks and treated orally with CT at a dose of 300 mg/kg. Body mass gain, caloric intake, metabolic profile, adiposity index, and gene expression of inflammatory parameters were evaluated. In vitro, we used human normal colon epithelial (NCM-356) and murine rectal carcinoma CMT-93 cell lines, stimulated with LPS for 48h and 72h, respectively, to evaluate cell viability, wound healing (wound-healing assay) and protein expression of markers associated with permeability and inflammation. One-way and two-way ANOVA followed by Tukey's post-test were used ($p<0.05$). Daily treatment with CT prevented body mass gain when compared to the HFD group ($p<0.05$). However, this response was abolished by exogenous administration of LPS for 10 weeks. Furthermore, Treatment with monoterpene (300 mg/kg) promoted a significant reduction in the adiposity index and serum levels of total and LDL cholesterol, as well as an antihyperglycemic effect compared to obese mice ($p<0.05$). Treatment of animals with CT prevented metabolic endotoxemia, consequently exhibiting a systemic and colonic anti-inflammatory effect, preventing the increase in NLRP3 inflammasome gene expression induced by HFD, in addition to increasing cholesterol excretion in feces. CT (50 µg/mL) showed a proliferative effect in NCM-356 cells when compared to the control group ($p<0.05$). During metabolic endotoxemia induced by exogenous LPS, treatment with CT promoted a decrease in MPO activity and MDA levels in the liver compared to the HFD group ($p<0.05$), demonstrating a protective and anti-inflammatory effect of the monoterpene. The antioxidant capacity of CT was demonstrated by preventing the increase in SOD activity caused by HFD ingestion when compared to the DP group ($p<0.05$). We also observed that CT reversed epithelial damage during wound healing at 24h and 48h in the presence of LPS, when compared to the 6h group, an effect that elucidates the beneficial action of the monoterpene against changes in intestinal permeability during obesity. Thus, we can conclude that CT has antiobesogenic, anti-inflammatory, and antihyperlipidemic action through a protective effect against intestinal and hepatic alterations during the development and progression of obesity.

Keywords: *High-fat diet; intestinal permeability; dyslipidemia; metabolic endotoxemia; monoterpene*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGLs	Ácidos graxos livres
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
AUC	*Area under curve* – Área sob a curva
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética Uso de Animal
CMT	Linhagem celular retal de camundongo
COX	Ciclooxigenase
CT	Citral
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Dieta padrão
Epi	Epididimal
E.P.M.	Erro padrão da média
Gama-GT	Gama-glutamiltranspeptidase
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase
GSH	Glutationa reduzida
GTT	*Glucose Tolerance Test* - Teste de Tolerância a Glicose
HDL	*High-density lipoprotein*
HE	Hematoxilina-eosina
HFD	*High-fat diet* - Dieta Hiperlipidica
HGF	*Hepatocyte growth factor*
IGF	*Insulin-Like Growth Factor*

IL	Interleucina
INF	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ITT	*Insulin tolerance Test* - Teste de Tolerância a Insulina
LDL	*Low-density lipoprotein*
LPS	Lipopolissacarideo
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MDA	Malondialdeído
Mes	Mesenquimal
MMP	Metaloproteínase
MPO	Mieloperoxidase
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetilxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Ensaio de proliferação celular
MUC	Mucina
NBT	Azul de nitrotetrazólium
NCM	Linhagem celular de cólon humano normal
NF-κB	*Nuclear factor kappa B* – Fator nuclear Kappa B
NLRP	Receptores semelhantes a domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo contendo pirina
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
Per	Peritoneal
RAW	Linhagem celular de macrófagos murinos

SOD Superóxido dismutase

TBARS *Thiobarbituric acid reactive substances* - ácido 2-tiobarbitúrico

TGI Trato gastrointestinal

TJ *Tight junctions*

TLR-4 *Toll-like receptor 4*

TNF *Tumor necrosis factor* - Fator de necrose tumoral

TW Tween

VLDL *Very low-density lipoprotein*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ENDOTOXEMIA CAUSADA PELA MAIOR TRANSLOCAÇÃO DE LPS DO LÚMEN PARA A CIRCULAÇÃO SISTÊMICA DEVIDO AO AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL. O AUMENTO DE LPS SISTÊMICO CAUSA UMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA DE BAIXO GRAU ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS, PRINCIPALMENTE, COM A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DESENCADEANDO UMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM DIFERENTES TECIDOS, COMO FÍGADO E TECIDO ADIPOSO (TA). TRADUZIDA E MODIFICADA DE GHOSH E COLABORADORES (33). 34

FIGURA 2. FÓRMULAS MOLECULARES E ESTRUTURAIS DOS ISÔMEROS GERANIAL (92) E NERAL(93), QUE CONSTITUEM O CITRAL. IMAGEM REPRESENTATIVA DO CAPIM-LIMÃO E GENGIBRE, FONTES DE CITRAL. 37

CAPÍTULO I

FIGURE 1 IMPACT OF CHRONIC CITRAL (CT; 25, 100 AND 300 MG/KG) TREATMENT FOLLOWING 17 WEEKS OF A HIGH-FAT DIET-INDUCED OBESITY IN C57BL/J6 MICE. (A) EVOLUTION OF BODY WEIGHT. (B) AREA UNDER THE CURVE (AUC) OF BODY WEIGHT DEVELOPMENT OVER 17 WEEKS. (C) REPRESENTATIVE IMAGES OF EACH EXPERIMENTAL GROUP. RELATIVE MASS OF EPIDIDYMAL (EPI; D), MESENTERIC (MES; E), AND PERITONEAL (PER; F) AT. (G) ADIPOSITY INDEX OF THE SUM OF ALL AT. (H) FOOD INTAKE BY GROUP OVER 17 WEEKS. DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± S.E.M (N = 10). DIFFERENT LETTERS INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN GROUPS (P < 0.05). SD, STANDARD DIET; HFD, HIGH-FAT DIET. 57

FIGURE 2 EFFECT OF CITRAL TREATMENT AGAINST HIGH-FAT DIET-INDUCED METABOLIC CHANGES IN GLUCOSE AND LIPID PROFILE IN OBESE C57BL/J6 MICE. (A) FASTING BLOOD GLUCOSE. (B) BLOOD GLUCOSE DURING ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST (OGTT). (C) AREA UNDER CURVE (AUC) OF OGTT. LIPID PROFILE OF THE SERUM LEVELS OF (D) TOTAL CHOLESTEROL, (E) HIGH DENSITY LIPOPROTEIN, (F) VERY-LOW DENSITY LIPOPROTEIN, (G) LOW DENSITY LIPOPROTEIN, AND (H) TRIGLYCERIDES. TBARS LEVELS IN EPI AT (I) AND SERUM (J). DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± S.E.M. (N= 5-7). DIFFERENT LETTERS INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN GROUPS (P < 0.05). SD, STANDARD DIET; HFD, HIGH-FAT DIET. 58

FIGURE 3 CITRAL TREATMENT PREVENTS HIGH-FAT DIET-INDUCED METABOLIC ENDOTOXEMIA AND INFLAMMATORY RESPONSE IN OBESE MICE. SERUM LEVELS OF (A) ENDOTOXIN, (B) IL-1BETA, AND (C)TNF-ALPHA. DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± S.E.M (N= 4-5). DIFFERENT LETTERS INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN GROUPS (P < 0.05). SD, STANDARD DIET; HFD, HIGH-FAT DIET. 59

FIGURE 4 CHRONIC CITRAL (CT; 300 MG/KG) TREATMENT IMPAIRS HIGH-FAT DIET-INDUCED COLON CHANGES IN OBESE MICE. (A) RELATIVE MASS OF COLON. (B) QUANTIFICATION OF FUSCIN MARKER. (C) REPRESENTATIVE HISTOLOGICAL IMAGES OF H&E AND FUCSIN. (D) FECAL CHOLESTEROL LEVELS. (E) INTESTINAL ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY. GENE EXPRESSION OF (F) TLR4, (G) NLRP3, (H) IL-

10, (I) NLRP6, AND (J) MUC-2 IN THE COLON. DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± S.E.M. (N = 3-10). DIFFERENT LETTERS INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN GROUPS (P < 0.05). SD, STANDARD DIET; HFD, HIGH-FAT DIET..... 59

FIGURE 5 EFFECTS OF CITRAL IN MURINE RECTAL CARCINOMA CMT-93 CELLS STIMULATED WITH LPS (10 µG/ML). (A) CELLULAR VIABILITY. (B) REPRESENTATIVE WESTERN BLOTS IMAGES. PROTEIN EXPRESSION LEVELS OF (C) OCCLUDIN, (D) ZO-1, (E) INOS, AND (I) IL-6. DATA ARE EXPRESSED AS MEAN ± S.E.M. (N = 3-4). DIFFERENT LETTERS INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN GROUPS (P < 0.05)..... 60

CAPÍTULO II

FIGURA 1. DESENHO EXPERIMENTAL: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CT300 (CITRAL 300 MG/KG) NA INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA METABÓLICA INDUZIDA POR HFD E ADMINISTRAÇÃO SEMANAL DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) POR 10 SEMANAS. TW = TWEEN 80 A 1% (10 ML/KG), COMO VEÍCULO. 66

FIGURA 2. EFEITO DO CITRAL 300 MG/KG (CT300) DURANTE 10 SEMANAS NA INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA METABÓLICA PELA ADMINISTRAÇÃO SEMANAL DE LIPOPOLISSACARIDEO (LPS) EM CAMUNDONGOS MACHOS C57BL/J6 OBESOS. A) EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL. B) AREA SOB A CURVA DA EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL. C) ÍNDICE DE ADIPOSIDADE. MASSA DO TA EPIDIDIMAL (EPI; D), PERITONEAL (PER; E), MESENQUIMAL (MES; F), E MARROM (TAM; G). H) IMAGEM REPRESENTATIVA DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL. I) INGESTÃO ALIMENTAR SEMANAL. RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± E.P.M. (N = 10). GRUPOS COM DIFERENTES LETRAS INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05)..... 73

FIGURA 3. EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO DE CITRAL 300 MG/KG (CT300) SOB O PERFIL LIPÍDICO SÉRICO DE CAMUNDONGOS C57BL/J6 ALIMENTADOS COM HFD E SUBMETIDOS A ENDOTOXEMIA METABÓLICA POR LPS. A) COLESTEROL TOTAL. B) HIGH DENSITY LIPOPROTEIN (HDL). C) VERY LOW-DENSITY LIPOPROTEIN (VLDL). E) LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL). F) TRIGLICERÍDEOS. RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± E.P.M. (N= 6). GRUPOS COM LETRAS DIFERENTES INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05)..... 74

FIGURA 4. GLICEMIA DE JEJUM DE CAMUNDONGOS C57BL/J6 ALIMENTADOS COM HFD E TRATADOS COM CT 300 MG/KG (CT300) SUBMETIDOS A ENDOTOXEMIA METABÓLICA POR LPS. RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± E.P.M. (N= 10). GRUPOS COM LETRAS DIFERENTES INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05). 74

FIGURA 5. TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL A GLICOSE (GTT) E TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA (ITT) APÓS PERÍODO DE TRATAMENTO E INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA METABÓLICA. A) CURVA GLICÊMICA DURANTE 120 MINUTOS APÓS ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL DE GLICOSE (2 MG/KG). B) AREA SOB A CURVA DA CURVA GLICÊMICA. C) RETORNO GLICÊMICO APÓS 120 MINUTOS. D) CURVA GLICÊMICA DURANTE 90 MINUTOS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE INSULINA (0,75 U/KG). E) AREA SOB A CURVA DA CURVA GLICÊMICA. F)

RETORNO GLICÊMICO APÓS 90 MINUTOS. RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± E.P.M. (N= 7). GRUPOS COM DIFERENTES LETRAS INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05)..... 77

FIGURA 6. NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTOXINA (A) E ATIVIDADE SÉRICA DE FOSFATASE ALCALINA (B) EM CAMUNDONGOS C57BL/J6 ALIMENTADOS COM HFD E TRATADOS COM CT 300 MG/KG (CT300) SUBMETIDOS A ENDOTOXEMIA METABÓLICA POR LPS. RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± E.P.M. (N= 5-10). GRUPOS COM LETRAS DIFERENTES INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05). 79

FIGURE 7. PARÂMETROS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS C57BL/J6 ALIMENTADOS COM HFD E TRATADOS COM CT NA DOSE DE 300 MG/KG (CT300) SUBMETIDOS A ENDOTOXEMIA METABÓLICA POR LPS. (A) RAZÃO DE MASSA DO FÍGADO/MASSA CORPORAL, (B) ATIVIDADE DA ENZIMA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST), (C) ATIVIDADE DA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) E (D) ATIVIDADE DA GAMA-GLUTAMILTRANSPEPTIDASE (GAMA-GT). RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± E.P.M. (N= 7-10). GRUPOS COM LETRAS DIFERENTES INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05). 81

FIGURE 8. PERFIL INFLAMATÓRIO E OXIDATIVO DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS C57BL/J6 ALIMENTADOS COM HFD E TRATADOS COM CT NA DOSE DE 300 MG/KG (CT300) SUBMETIDOS A ENDOTOXEMIA METABÓLICA PELO LPS. (A) NÍVEIS DE NITRITOS, (B) ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO), (C) NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA), (D) NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), (E) ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD). RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM MÉDIA ± E.P.M. (N= 5-6). GRUPOS COM DIFERENTES LETRAS INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05). 82

CAPÍTULO III

FIGURA 1. CARACTERIZAÇÃO DO IMPACTO DO LPS NA REGENERAÇÃO DE FERIDAS (RANHURAS) EM CÉLULAS NCM356 DURANTE 48H DE ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. A) IMAGENS REPRESENTATIVAS DO FECHAMENTO DE RANHURAS EM CÉLULAS CONTROLE E ESTIMULADAS COM LPS 10 NG/ML ÀS 0H, 6H, 24H E 48H. B) PORCENTAGEM DO FECHAMENTO DAS RANHURAS QUANDO COMPARADO COM O TEMPO INICIAL. ****P<0,0001 VS RESPECTIVA ÁREA EM 6H; #P<0,05 VS CONTROLE. C) A EXPRESSÃO DE INOS, TLR4, IL-6, IL-10, IL-4, MMP-9, HGF, TGF-1β, CLAUDINA E OCLUDINA APÓS 48H DE CÉLULAS ESTIMULADAS COM LPS. *P < 0,05 VERSUS CONTROLE. TODOS OS DADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M. 95

FIGURA 2. EFEITOS DA CT NA VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE CÉLULAS EPITELIAIS DO CÓLON NORMAIS HUMANAS NCM365. OS DADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M.. AS DIFERENTES LETRAS INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05)..... 96

FIGURA 3. CT5 (CITRAL 5 μG/ML) ACELEROU A REGENERAÇÃO DA FERIDA EM CÉLULAS NCM356 ESTIMULADAS COM LPS 10 NG/ML. A) IMAGENS REPRESENTATIVAS DO FECHAMENTO DAS RANHURAS EM CÉLULAS TRATADAS COM CT NAS 0H, 6H, 24H E 48H. B) PORCENTAGEM DE REGENERAÇÃO DE RANHURAS QUANDO COMPARADO COM O TEMPO INICIAL. OS DADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M.. *P < 0,05 VS RESPECTIVA ÁREA EM 6H. 98

FIGURA 4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICAS DE PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS, DE BARREIRA E DE FATORES DE CRESCIMENTO APÓS TRATAMENTO COM CT5 EM CÉLULAS NCM356 ESTIMULADAS POR LPS. A EXPRESSÃO GÊNICA DE INOS, TLR4, IL-6, IL-10, IL-4, MMP-9, HGF, TGF-1β, CLAUDINA E OCLUDINA APÓS 48H DE ESTÍMULO. OS DADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M., (N = 4)..... 99

FIGURA 5. EFEITOS DA CT NA VIABILIDADE CELULAR (A) E PRODUÇÃO DE NITRITOS (B) EM CÉLULAS RAW264. OS DADOS SÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± E.P.M. (N = 4). AS DIFERENTES LETRAS INDICAM A DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA (P < 0,05)..... 100

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABLE 1. PRIMERS SEQUENCE..... 55

CAPÍTULO II

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES UTILIZADAS NA DIETA PADRÃO E HIPERLIPÍDICA (HFD)..... 65

CAPÍTULO III

TABELA 1. SEQUÊNCIA DE PRIMERS..... 90

SUMÁRIO

I. APRESENTAÇÃO 27

II. INTRODUÇÃO 28

i. OBESIDADE 28

ii. OBESIDADE E MICROBIOTA 29

iii. OBESIDADE E BARREIRA INTESTINAL 31

iv. OBESIDADE E ENDOTOXEMIA METABÓLICA 32

v. TERAPEUTICA ATUAL 36

vi. CITRAL 36

III. OBJETIVO 39

IV. CAPÍTULO I 40

V. CAPÍTULO II 60

***VI.* CAPÍTULO III 84**

VII. CONCLUSÕES FINAIS 101

REFERÊNCIAS 102

I. APRESENTAÇÃO

Esta tese será apresentada no formato de capítulos, sendo precedidos por uma revisão bibliográfica sobre obesidade e endotoxemia metabólica e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do quadro patológico, assim como a apresentação sobre o Citral e suas atividades farmacológicas já descritas na literatura. O **capítulo I** é apresentado no formado de artigo que foi submetido para a revista cientifica *Frontiers in Pharmacology* com os resultados do tratamento crônico do composto concomitantemente a indução de obesidade. O **capítulo II** contém resultados do efeito do Citral ao desenvolvimento de endotoxemia metabólica induzida por administração exógena da endotoxina LPS que será submetido ao periódico *Journal of Ethnopharmacology*. E no **capítulo III,** são apresentados os resultados do estudo *in vitro* da atividade do citral sob células intestinais e imunológicas que serão submetidos para a revista cientifica *Cells*.

II. INTRODUÇÃO

i. OBESIDADE

Com o avanço da industrialização e da globalização, o estilo de vida da população mundial enfrentou uma série de desafios ao se adaptar ao escasso espaço de tempo para realizar atividades básicas, como se alimentar. Diante disso, o aumento do peso corporal devido a má alimentação juntamente com o estilo de vida pouco ativo favoreceu aos dados alarmantes com elevada escalada no número de pessoas classificadas como obesas (1). A obesidade é uma doença crônica que tem crescido em países desenvolvidos e em desenvolvimento, se propagando em diferentes faixas etárias e condições socio-econômicas. Em 2022, a Organização Mundial de Saúde (OMS) destacou que um a cada oito pessoas no mundo eram obesas, isso porque quase 43% da população mundial adulta, de 18 anos ou mais, apresentavam sobrepeso e destes, 16% eram obesos (2). No Brasil, os dados se tornam ainda mais preocupantes, pois 64,6% da população adulta apresenta sobrepeso, alcançando uma porcentagem de 28,9% de adultos classificados com obesidade (3). Um outro dado alarmante é que devido a crescente incidência de obesidade, estima-se que em 2044, 48% da população adulta brasileira serão obesos (4). Com origem etiológica multifatorial, a obesidade envolve fatores biológicos e/ou ambientais, sendo definida pelo significativo efeito anabólico que leva a um progressivo aumento de reservatórios de tecido adiposo (TA) e desencadeia alterações na modulação do sistema imunológico e metabólico (5). Uma dieta desbalanceada e rica em gorduras acarreta o acúmulo excessivo de gordura corporal causando um desequilíbrio energético crônico, que resulta em um significativo aumento de peso corporal (6). Além disso, indivíduos obesos apresentam alto risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas, como diabete *mellitus* tipo 2, doenças hepáticas, autoimunes e cardiovasculares (7,8).

ii. OBESIDADE E MICROBIOTA

Nos últimos anos, diferentes trabalhos têm buscado elucidar o principal agente causador da obesidade, e a mudança do perfil da microbiota intestinal pode estar associado a ativação desse processo fisiopatológico (9,10). Entende-se como microbiota intestinal a população de diferentes espécies microbianos não patogênicos que residem no trato gastrointestinal (TGI) exercendo atividade comensal com o organismo do hospedeiro (11). Essas bactérias atuam promovendo atividade funcional em processos digestórios de degradação e absorção de nutrientes indigestos para o organismo; proporcionam proteção ao hospedeiro pois induz resistência a infecções por microorganismos patogênicos com a competição por nutrientes e produção de substâncias antimicrobianas; além disso, induzem a proliferação de células epiteliais e uma resposta imunológica adequada para proteção do hospedeiro (10,12–19). O caráter funcional da microbiota intestinal é determinado por proporções de diferentes filos de bactérias, existindo predominantemente, no TGI humano, dos filos Bacteroidota, Bacillota e Actinomycetota (20). Uma mudança na composição da alimentação pode causar alterações na população e função dessa microbiota, processo esse denominado como disbiose intestinal (21).

Estudos em humanos e animais experimentais tem descrito uma mudança na proporção da população da microbiota de indivíduos obesos (22). Um aumento abundante em bactérias do grupo de Bacillota é característico da microbiota intestinal de indivíduos obesos quando comparados com magros (23), como também é descrito uma redução na razão de Bacteroidota: Bacillota em obesos, o que proporciona maior obtenção de calorias advindas da ingestão de alimentos (24,25). Esses dados são sustentados por Le Chatelier e colaboradores (2013), que evidenciaram que a microbiota intestinal de indivíduos obesos é capaz de obter maior quantidade de calorias da dieta, o que favorece seu quadro fisiopatológico de obesidade. O mesmo estudo demonstrou que uma menor diversidade na composição da microbiota intestinal pode acarretar um aumento progressivo do peso corporal (26). Um possível mecanismo

envolvido na modulação entre a relação hospedeiro-microbiota intestinal é a expressão de receptores semelhantes a domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo contendo pirina (NLRP). Esta superfamília de proteínas é capaz de modular cascatas de sinalização inflamatória através da ativação de caspase-1 promovendo a formação de um complexo multimérico, denominado inflamassoma (27). O NLRP-6 apresenta papel chave na manutenção da microbiota e integridade da barreira intestinal, favorecendo a produção de muco e a síntese de peptídeos antimicrobianos (28,29). No entanto, em animais obesos ocorre uma redução nos níveis de NRLP-6 no intestino diretamente associado a uma alteração da composição e uma menor variabilidade da microbiota intestinal, o que possivelmente está atrelado a uma alteração no perfil de metabólitos em animais obesos (30,31). Além disso, a oferta de uma dieta com alto teor de lipídios pode favorecer a proliferação de bactérias gram-negativas, o que resulta em um aumento nos níveis de lipopolissacarideo (LPS) no lúmen intestinal, promovendo a expressão de mediadores inflamatórios na mucosa. A fim de minimizar esse impacto na homeostasia intestinal, proteínas antimicrobianas expressas por células epiteliais intestinais atuam como a primeira linha de defesa contra componentes microbianos, como o LPS (32). A fosfatase alcalina intestinal atua na detoxificação do LPS, através de sua desativação por catalisar a desfosforilação da porção lipídeo A da molécula, prevenindo assim a ativação de uma resposta inflamatória local ou sistêmica (33). Em monócitos, ocorre a ativação do inflamassoma NRLP-3, que desencadeia a maturação e liberação de interleucina (IL)-1β, que pode agravar o processo inflamatório na mucosa intestinal de indivíduos obesos (29,34). Em modelos experimentais em camundongos essa mudança de microbiota intestinal através da oferta de dieta hiperlipídica (*high-fat diet*, HFD), provoca um quadro de inflamação crônica de baixo grau associada a obesidade (35,36), resultado do processo inflamatório intestinal que aumenta a permeabilidade no TGI (20).

iii. OBESIDADE E BARREIRA INTESTINAL

Uma disfunção na integridade da barreira intestinal desencadeia alterações na permeabilidade da mucosa com a ativação do sistema imune que induz um processo inflamatório, com o desenvolvimento de doenças intestinais e sistêmicas (37,38). O processo de absorção de nutrientes é realizado através da passagem pela barreira física, formada pelo epitélio do TGI responsável por realizar a interface entre o ambiente externo (lúmen) e microambiente interno (mucosa e sistema circulatório)(39). A passagem de nutrientes é regulada por uma monocamada de células epiteliais através de duas vias diferentes, uma via transcelular e outra paracelular (40). A primeira via, a transcelular, ocorre por transporte vesicular, com a existência de transportadores específicos para proteínas, microorganismos e outros solutos na membrana apical das células epiteliais até alcançar a membrana basolateral. Já a via paracelular é caracterizada por regular a passagens de íons, água e outras pequenas moléculas entre o espaço intercelular, caráter esse proporcionado pelas junções oclusivas (*tight junction*, TJ) que regulam a passagem bidirecional entre o lúmen e o interior da mucosa (41). Quatro famílias de proteínas transmembranas constituem a TJ, sendo elas as ocludinas, claudinas, moléculas de adesão junção (JAM) e tricelulinas(42–45). Seus domínios extracelulares interagem com proteínas da TJ de células adjacentes e é através de interações que são atribuídas a capacidade seletividade da barreira (39,40). Já os domínios intracelulares, formam conglomerados protéicos com as proteínas da zônula ocludente (ZO)-1, que ancoram as proteínas transmembranas ao citoesqueleto da célula, permitindo que o citoesqueleto regule a integridade da interação entre as células através da ação da miosina quinase de cadeia leve (*myosin light-chain kinase*, MLCK), e assim, consequentemente regule a permeabilidade da barreira (39,40,46).

Devido à importante função da barreira intestinal, o processo regenerativo e os mecanismos regulatórios para a manutenção da homeostase são fatores importantes a serem investigados no combate aos danos intestinais (47,48). A utilização de ensaios *in vitro* auxiliam na compreensão dos processos

funcionais por meio da utilização de diferentes linhagens celulares, como a linhagem epitelial de cólon normal humano NCM-356 e a linhagem de adenocarcinoma retal murino CMT-93 (48,49). Ambas as linhagens celulares têm características importantes que contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção da barreira intestinal. A primeira, é uma linhagem celular pré-tumoral que tem características morfológicas semelhantes às células epiteliais intestinais humanas normais (48). Já a linhagem CMT-93 é uma cepa derivada de camundongos e é usada para entender o mecanismo regulatório entre a comunicação célula-célula (49). Assim, podemos compreender melhor as alterações do microambiente intestinal que levam a um processo quebra da barreira, que desencadeia em uma ativação da resposta inflamatória e induz a produção de citocinas (TNF-α, IL-6, IL-1β, INF-γ). Estas citocinas pró-inflamatórias tem a capacidade de prejudicar a atuação das proteínas da TJ reduzindo a transcrição; removendo as proteínas do interior vesicular; degradando as proteínas da TJ; ou até mesmo ativando quinases (como a quinase IκB, IKK) relacionados ao processo inflamatório e da modulação do citoesqueleto, resultando na redução da função de barreira das TJ (37,38). A ingestão de HFD induz a expressão de RNAm de TNF-α e ativação de fator nuclear kappa B (NF-κB), consequentemente, induz a expressão de ciclooxigenase (COX)-2, NLRP-3 e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no TGI, prejudicando a ação das proteínas constituintes da TJ, fato esse, que facilita a maior passagem de LPS ativo do lúmen para a circulação na obesidade (50). Como consequência, ocorre o aumento da concentração de LPS sistêmico no organismo de indivíduos obesos, conhecido como quadro de endotoxemia metabólica (51).

iv. OBESIDADE E ENDOTOXEMIA METABÓLICA

O LPS advindo da disbiose intestinal contribui para iniciar o processo de inflamação sistêmica crônica, sendo conhecido como marcador (“*Hallmark”)* do quadro obesogênico (52). O contínuo estímulo de LPS sistêmico é capaz de iniciar o dano metabólico no organismo do indivíduo por meio de um processo de adaptação inflamatória que ocorre com a ingestão de alto teor de lipídios (53). O LPS, um componente de

membrana de bactérias gram-negativas, é transportado através do lúmen do TGI por quilomícrons pela circulação sanguínea e alcançando outros tecidos, tais como fígado, TA e músculos (54–56). Essa endotoxina é capaz de ativar o sistema imunológico induzindo uma resposta inflamatória, principalmente, através da sensibilização de macrófagos (51,57). O macrófago está presente tanto na circulação quanto nos tecidos, como por exemplo, no fígado (células de Kupffer). O reconhecimento do LPS por macrófagos ocorre através do receptor do tipo *Toll* (TLR)-4, induzindo uma cascata de sinalização intracelular promovendo a expressão de mediadores do tipo pró-inflamatórios, tais como citocinas (IL-1β, IL-6, TNF-α, INF-γ), leptina, quimioatraentes e outros agentes efetores de uma resposta inflamatória (58,59). Cani e colaboradores (2007) comprovaram a correlação dos níveis de LPS sistêmico e a síndrome metabólica através da infusão de LPS em camundongos livres de patógenos (*Germ-free*), observando uma resposta de endotoxemia metabólica semelhante ao de animais alimentados com HFD (60) (Figura 1).

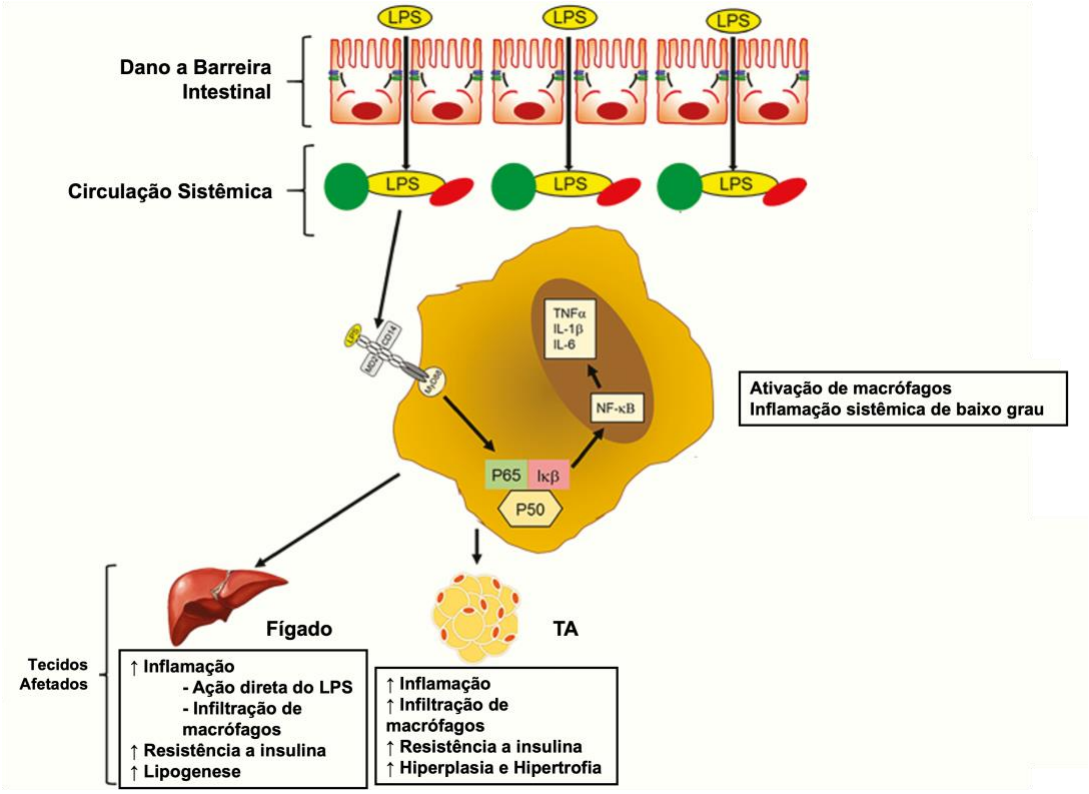


Figura 1. Endotoxemia causada pela maior translocação de LPS do lúmen para a circulação sistêmica devido ao aumento da permeabilidade intestinal. O aumento de LPS sistêmico causa uma resposta inflamatória sistêmica de baixo grau através da ativação de macrófagos, principalmente, com a produção de citocinas pró-inflamatórias desencadeando uma resposta inflamatória em diferentes tecidos, como fígado e tecido adiposo (TA). Traduzida e modificada de Ghosh e colaboradores (33).

Essa sinalização inflamatória, propiciada pelo quadro de endotoxemia metabólica, promove alteração nos níveis de mediadores inflamatórios sistêmicos e induz um quadro de desordem metabólica, como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, dislipidemia e hipertensão (61). Concomitante com a continua ingestão de uma dieta rica em lipídeos, a desordem metabólica auxilia no aumento da quantidade e tamanho de adipócitos (62), elevando ainda mais a concentração de mediadores do tipo pró-inflamatórios na circulação, quadro conhecido como metainflamação (63,64). Em razão do aumento da deposição de gordura no TA, também ocorre a deposição ectópica de lipídeos em outros tecidos, principalmente no fígado, favorecendo o desenvolvimento de esteatose e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), que pode levar a um maior risco de desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (65,66).

As altas concentrações de lipídeos e glicose, devido a uma dieta desbalanceada, favorecem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que influência diretamente no agravamento de disfunções metabólicas, principalmente, através do dano sistêmico e hepático que ocorre durante a obesidade (67). Devido a isso, mecanismos antioxidantes atuam na proteção e eliminação de EROs, através de componentes enzimáticos e não enzimáticos que agem no controle do estresse oxidativo. A enzima superóxido dismutase (SOD) está envolvida na conversão do ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio que serve de substrato para a ação da catalase (CAT) que favorece a formação de água e oxigênio molecular (68). Contudo, durante a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) também ocorre o aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, resultado do dano causado pelo aumento exacerbado de EROs na membrana celular de células hepáticas (69).

Diferentes trabalhos têm associado a endotoxemia metabólica com a produção de etanol durante a DHGNA, e consequentemente, promover a ativação de uma reposta do tipo pró-inflamatória de macrófagos hepáticos que contribui para aumento de EROs e do estresse nitrosativo, através do aumento dos níveis de nitritos que atua como um potente fator pró-inflamatório (70,71). Tal ambiente pró-inflamatório e lesivo para o tecido, contribui para um maior recrutamento de células imunitárias para o tecido hepático, como neutrófilos (72). A infiltração de neutrófilos está associada ao aumento dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO), que é um importante marcador pró-inflamatório por atuar na regulação dessas células imunitárias, contribuindo na maior produção de moléculas pró-oxidativas (73,74). O processo inflamatório hepático, leva a alterações sistêmicas que juntamente com a síndrome metabólica durante a obesidade também contribui para a promoção de mecanismos carcinogênicos, tais como aumento da sinalização para proliferação e diferenciação celular que aumenta o risco de incidência de diferentes tipos de câncer, como no cólon, esôfago e fígado (75–77).

v. TERAPÊUTICA ATUAL

Por ser uma doença crônica e complexa, o tratamento da obesidade necessita de abordagens combinadas, como a mudança no estilo de vida, reeducação alimentar e exercícios físicos (78). A abordagem farmacológica também pode ser empregada, porém apresenta poucas opções terapêuticas comprovadas e é ineficaz a longo prazo, apresentando efeitos adversos significativos (79). Um exemplo de medicamentos antiobesidade é a sibutramina, que reduz a ingestão de alimentos e aumenta a saciedade. No entanto, seu uso causa efeitos colaterais significativos que levam ao inchaço, incontinência fecal e aumento do risco de infarto e câncer de cólon (80). Outra limitação dos medicamentos antiobesidade está associada à incidência de transtornos psiquiátricos, cardiotoxicidade e o uso prolongado causa dependência dos medicamentos (81). Em casos mais grave da doença, é mais indicado a realização da cirurgia bariátrica, mas a recuperação é lenta e não exclui a possibilidade da recidiva da doença, caso a não associação das abordagens anteriores ocorram (82). Diante da dificuldade de execução das abordagens existentes e manutenção da injuria pró-inflamatória recorrente durante o processo obesogênico é necessário a busca por agentes com ação farmacológica que atuem com amplo espectro no quadro patológico da obesidade.

vi. CITRAL

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 (83,84). Os óleos essenciais existentes em plantas são ricos em substâncias com grande atuação farmacológica sendo investigados por diversos grupos de pesquisas. O citral (CT; Figura 2) é uma mistura de monoterpenóides (neral e geranial) presente em óleos essenciais de diversas espécies de plantas como *Zingiber officinale* (gengibre)(85) e *Cymbopogon citratus* (Capim limão)(86). Suas ações antifúngica, antibacteriana, antitumoral, analgésica e anti-inflamatória já foram descritas na literatura em diversos estudos *in vivo* e *in vitro* (87–91).

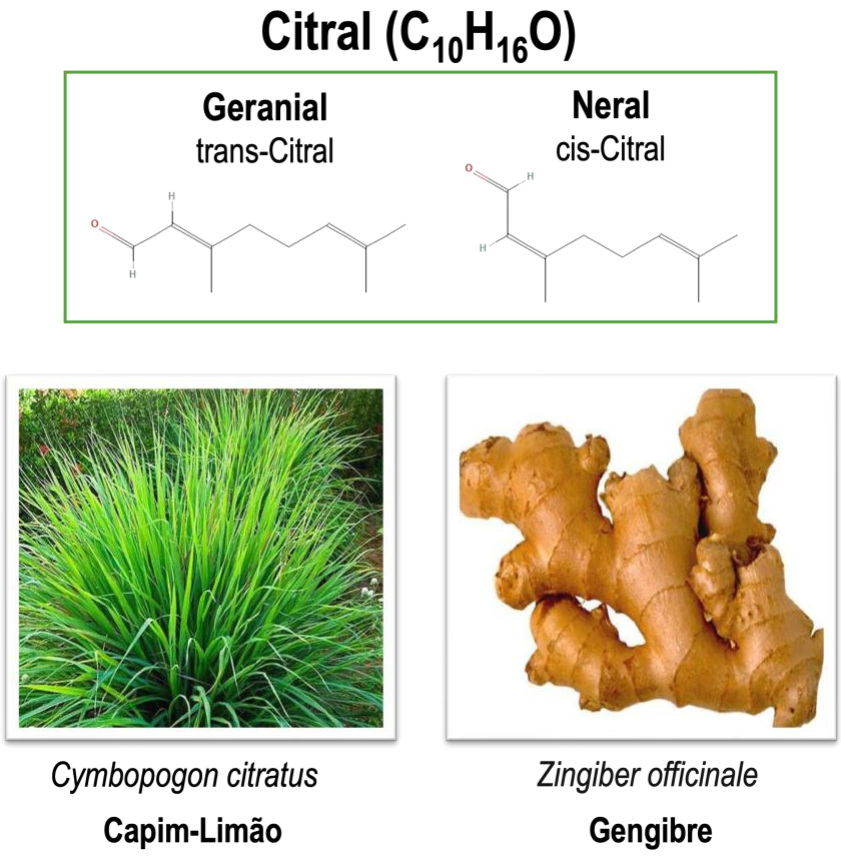


Figura 2. Fórmulas moleculares e estruturais dos isômeros Geranial (92) e Neral(93), que constituem o Citral. Imagem representativa do capim-limão e gengibre, fontes de citral.

Nos últimos anos, diferentes trabalhos têm demonstrado efeitos terapêuticos do monoterpeno no tratamento de alterações metabólicas e inflamatórias durante a obesidade. Modak e colaboradores (2011) observaram que a administração crônica de CT em camundongos obesos previne o acúmulo abdominal de lipídeos, com redução no peso corporal por um possível aumento na produção energética oriundo do metabolismo, com redução dos níveis séricos de AGLs, triglicerídeos e colesterol total (94). Além disso, Lai e colaboradores, investigaram o efeito hepatoprotetor do CT no dano causado por HFD em células hepáticas em modelo de DHGNA. O CT exibiu atividade protetora mediada por redução do estresse oxidativo e processo inflamatório (95). Outros trabalhos descrevem o papel imunomodulatório do CT na supressão da expressão de COX-2 em estudos *in vitro* (96) e também em modelo de peritonite induzida por LPS em ratos,

no qual o CT foi capaz de reduzir a expressão de NF-κB, moléculas de adesão e diminuir a concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-8 (97). Em um trabalho publicado por nosso grupo, demonstramos que o tratamento oral com CT foi capaz de diminuir a resposta nociceptiva através da modulação de mediadores inflamatórios endógenos, como o glutamato, prostanóides, óxido nítrico (NO) e TNF-α, moléculas cruciais na sinalização nociceptiva em um modelo de dor crônica (86). O CT também atuou na inibição da liberação de NO por meio da redução da produção e expressão de iNOS, frente a injúria e a ativação do sistema imune (87). Demonstramos também, que o tratamento com CT administrado em de ratos eutérmicos apresenta ação antipirética, sendo capaz de reduzir a temperatura corporal na febre induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de LPS devido à redução da concentração plasmáticas de IL-1β, IL-6 e TNF-α, assim como, de PGE_2 (plasmáticas e na área pré-optica do hipotálamo) (98). Já em camundongos obesos, nosso grupo descreveu a ação hipotérmica do CT através da redução da concentração sérica (TNF-α e leptina) e hipotalâmica (IL-6) de mediadores inflamatórios durante o desafio imune com LPS (99). Entretanto, apesar dos importantes achados do papel do CT como anti-hiperlipidêmico, anti-inflamatório e antipirético ainda não se conhece sua atuação durante o processo de iniciação e promoção da obesidade e permeabilidade intestinal, como também, no quadro de endotoxemia metabólica, um dos fatores chave para desencadear a inflamação metabólica em indivíduos obesos. Assim, nossa hipótese é que o CT atue reduzindo uma resposta obesogênica, através da modulação do ambiente intestinal contribuindo para uma melhora de alterações metabólicas e sistêmicas durante a obesidade induzida com HFD.

REFERÊNCIAS

1. Sung H, Siegel RL, Torre LA, Pearson-Stuttard J, Islami F, Fedewa SA, et al. Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. CA Cancer J Clin. 2019 Mar 12;69(2):88–112.

2. WHO. Obesity and overweight. World Health Organization; 2018 [cited 2019 Sep 12]. WHO | World Health Organization. Available from: http://www.who.int/en/

3. https://data.worldobesity.org/maps/?mapid=74&agegroup=AT&area=maps [Internet]. Global Obesity Observatory - World Obesity.

4. Almost half of Brazilian adults will be living with obesity within 20 years [Internet]. 2024 [cited 2025 Jan 2]. Available from: https://www.worldobesity.org/news/almost-half-of-brazilian-adults-will-be-living-with-obesity-within-20-years

5. Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. Cardiovasc Res. 2017;113(9):1009–23.

6. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. Nature. 2006 Sep 21;443(7109):289–95.

7. De Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A. Chronic and degenerative diseases: Obesity, inflammation and the immune system. Proceedings of the Nutrition Society. 2012;71(2):332–8.

8. Scully T. Public health: Society at large. 2014 Apr;508(7496):S50–1.

9. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006 Dec 21;444(7122):1027–31.

10. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V., Gou YK, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 2;101(44):15718–23.

11. Davis CD. The gut microbiome and its role in obesity. Nutr Today. 2016;51(4):167–74.

12. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. Science (1979). 2012 Jun 8;336(6086):1262–7.

13. Hooper L V., Littman DR, Macpherson AJ. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. Science (1979). 2012 Jun 8;336(6086):1268–73.

14. Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. FEMS Microbiol Rev. 2014 Sep;38(5):996–1047.

15. Nicholson JK, Wilson ID. Understanding 'Global' Systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism. Nat Rev Drug Discov. 2003 Aug;2(8):668–76.

16. Neves AL, Chilloux J, Sarafian MH, Rahim MBA, Boulangé CL, Dumas ME. The microbiome and its pharmacological targets: therapeutic avenues in cardiometabolic diseases. Curr Opin Pharmacol. 2015 Dec;25:36–44.

17. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. Nat Rev Microbiol. 2005 May 8;3(5):431–8.

18. Nazli A, Yang PC, Jury J, Howe K, Watson JL, Söderholm JD, et al. Epithelia Under Metabolic Stress Perceive Commensal Bacteria as a Threat. Am J Pathol. 2004 Mar;164(3):947–57.

19. Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA. The Application of Ecological Theory Toward an Understanding of the Human Microbiome. Science (1979). 2012 Jun 8;336(6086):1255–62.

20. BIBBÒ S, GIORFIO V, SCALDAFERRI F, MASCUCCI L, GASBARRINI A, CAMMAROTA G. The role of diet on gut microbiota composition. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(22):4742–9.

21. Vezza T, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Garrido-Mesa J, Romero M, Sánchez M, et al. The metabolic and vascular protective effects of olive (Olea europaea L.) leaf extract in diet-induced obesity in mice are related to the amelioration of gut microbiota dysbiosis and to its immunomodulatory properties. Pharmacol Res. 2019 Oct 11;104487.

22. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes. 2008 Jun 1;57(6):1470–81.

23. Ravussin Y, Koren O, Spor A, LeDuc C, Gutman R, Stombaugh J, et al. Responses of Gut Microbiota to Diet Composition and Weight Loss in Lean and Obese Mice. Obesity. 2012 Apr 19;20(4):738–47.

24. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V., Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004 Nov 2;101(44):15718–23.

25. Bouter KE, van Raalte DH, Groen AK, Nieuwdorp M. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. Gastroenterology. 2017 May 1;152(7):1671–8.

26. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. Nature. 2013 Aug 28;500(7464):541–6.

27. Zambetti LP, Mortellaro A. NLRPs, microbiota, and gut homeostasis: unravelling the connection. J Pathol. 2014 Aug;233(4):321–30.

28. Chen GY, Liu M, Wang F, Bertin J, Núñez G. A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. The Journal of Immunology. 2011 Jun 15;186(12):7187–94.

29. Wang J, Dong R, Zheng S. Roles of the inflammasome in the gut-liver axis (Review). Mol Med Rep. 2019 Jan;19(1):3–14.

30. Wang G, Wang Q, Bai J, Zhao N, Wang Y, Zhou R, et al. Upregulation of Intestinal NLRP6 Inflammasomes After Roux-en-Y Gastric Bypass Promotes Gut Immune Homeostasis. Obes Surg. 2020 Jan 11;30(1):327–35.

31. Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, Dohnalová L, Zilberman-Schapira G, Mahdi JA, et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. Cell. 2015 Dec;163(6):1428–43.

32. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. Chamaillard M, editor. PLoS One. 2012 Oct 16;7(10):e47713.

33. Ghosh SS, Wang J, Yannie PJ, Ghosh S. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. J Endocr Soc [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2025 Jan 2];4(2):bvz039. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7033038/

34. Li J, Pang B, Shao D, Jiang C, Hu X, Shi J. Artemisia sphaerocephala Krasch polysaccharide mediates lipid metabolism and metabolic endotoxaemia in associated with the modulation of gut microbiota in diet-induced obese mice. Int J Biol Macromol. 2019 Nov;

35. Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. British Journal of Nutrition. 2015 Oct 14;114(7):999–1012.

36. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006 Dec 14;444(7121):860–7.

37. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Vol. 9, Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group; 2009. p. 799–809.

38. Gil-Cardoso K, Ginés I, Pinent M, Ardévol A, Blay M, Terra X. Effects of flavonoids on intestinal inflammation, barrier integrity and changes in gut microbiota during diet-induced obesity. Nutr Res Rev. 2016 Dec 14;29(2):234–48.

39. Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cellular and Molecular Life Sciences. 2013 Feb 11;70(4):631–59.

40. Barreau F, Hugot J. Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria. Curr Opin Microbiol. 2014 Feb;17:91–8.

41. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. Vol. 2, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2001. p. 285–93.

42. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. Journal of Cell Biology. 1993;123(6 II):1777–88.

43. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. Journal of Cell Biology. 1998 Jun 29;141(7):1539–50.

44. Martìn-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. Journal of Cell Biology. 1998 Jul 13;142(1):117–27.

45. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita SS, Tsukita SS. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol. 2005 Dec 19;171(6):939–45.

46. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE, GONZALEZMARISCAL L. Tight junction proteins. Progress in Biophysics and Molecular Biology Pergamon; Jan 1, 2003 p. 1–44.

47. Iizuka M. Wound healing of intestinal epithelial cells. World J Gastroenterol. 2011;17(17):2161.

48. Stauffer JS, Manzano LA, Balch GC, Merriman RL, Tanzer LR, Moyer MP. Development and characterization of normal colonic epithelial cell lines derived from normal mucosa of patients with colon cancer. Am J Surg. 1995 Feb;169(2):190–5; discussion 195-6.

49. Martin CA, El-Sabban ME, Zhao L, Burakoff R, Homaidan FR. Adhesion and Cytosolic Dye Transfer between Macrophages and Intestinal Epithelial Cells. Cell Adhes Commun. 1998 Jan 11;5(2):83–95.

50. Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NMJ, Magness S, et al. High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. Gaetani S, editor. PLoS One. 2010 Aug 16;5(8):e12191.

51. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007 Jul;56(7):1761–72.

52. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. J Obes. 2016;2016:1–27.

53. Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Bergé M, Cenac C, et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. Gut. 2012 Apr 1;61(4):543–53.

54. Kluger MJ. Fever: Role of Pyrogens and Cryogens. Physiol Rev. 1991 Jan;71(1):93–127.

55. Vreugdenhil ACE, Rousseau CH, Hartung T, Greve JWM, van 't Veer C, Buurman WA. Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein Mediates LPS Detoxification by Chylomicrons. The Journal of Immunology. 2003 Feb 1;170(3):1399–405.

56. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. Annu Rev Physiol. 2010 Mar 17;72(1):219–46.

57. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. Journal of Clinical Investigation. 2005 May 2;115(5):1111–9.

58. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Vol. 1, Nature Reviews Immunology. European Association for Cardio-Thoracic Surgery; 2001. p. 135–45.

59. Shi H, Kokoeva M V., Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. Journal of Clinical Investigation. 2006 Nov 1;116(11):3015–25.

60. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007 Jul;56(7):1761–72.

61. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. Genome Med. 2016 Dec 20;8(1):42.

62. Genuth SM. Diabetologia Effect of High Fat vs. High Carbohydrate Feeding on the Development of Obesity in Weanling oh~oh Mice. Diabetologia. 1976;12:155–9.

63. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. 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. 2004 May 1;145(5):2273–82.

64. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. Annu Rev Immunol. 2011 Apr 23;29(1):415–45.

65. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. Metabolism. 2019 Mar;92:82–97.

66. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism. 2016 Aug;65(8):1049–61.

67. Engin A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Adv Exp Med Biol. 2017;960:443–67.

68. Piao L, Choi J, Kwon G, Ha H. Endogenous catalase delays high-fat diet-induced liver injury in mice. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology. 2017;21(3):317.

69. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol. 2013 Mar 25;13(3):159–75.

70. Barroso MV, Graça-Reis A, Cattani-Cavalieri I, Gitirana LB, Valenca SS, Lanzetti M. Mate tea reduces high fat diet-induced liver and metabolic disorders in mice. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2019 Jan;109:1547–55.

71. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2009 Jun;49(6):1877–87.

72. Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. Cardiovasc Res [Internet]. 2017 Jul 1;113(9):1009–23. Available from: https://academic.oup.com/cardiovascres/article/113/9/1009/3952694

73. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. Arch Biochem Biophys. 2018 Feb;640(December 2017):47–52.

74. Engin A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In 2017. p. 443–67.

75. Schoen RE, Tangen CM, Kuller LH, Burke GL, Cushman M, Tracy RP, et al. Increased Blood Glucose and Insulin, Body Size, and Incident Colorectal Cancer. JNCI Journal of the National Cancer Institute. 1999 Jul 7;91(13):1147–54.

76. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. Vol. 4, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2004. p. 579–91.

77. Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, et al. Body Mass Index and Risk of Adenocarcinomas of the Esophagus and Gastric Cardia. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 1998 Jan 21;90(2):150–5.

78. Wadden TA, Webb VL, Moran CH, Bailer BA. Lifestyle modification for obesity: New developments in diet, physical activity, and behavior therapy. Vol. 125, Circulation. Circulation; 2012. p. 1157–70.

79. Kushner RF. Weight loss strategies for treatment of obesity. Prog Cardiovasc Dis. 2014 Jan 1;56(4):465–72.

80. Kang JG, Park CY. Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. Diabetes Metab J [Internet]. 2012;36(1):13. Available from: http://e-dmj.org/journal/view.php?doi=10.4093/dmj.2012.36.1.13

81. Gasmi A, Mujawdiya PK, Nehaoua A, Shanaida M, Semenova Y, Piscopo S, et al. Pharmacological Treatments and Natural Biocompounds in Weight Management. Pharmaceuticals. 2023 Jan 30;16(2):212.

82. Wolfe BM, Kvach E, Eckel RH. Treatment of obesity. Vol. 118, Circulation Research. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 1844–55.

83. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med. 2006;27(1):1–93.

84. Rishton GM. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. American Journal of Cardiology. 2008;101(10 SUPPL.).

85. Mangprayool T, Kupittayanant S, Chudapongse N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. Fitoterapia. 2013 Sep;89(1):68–73.

86. Nishijima CM, Ganev EG, Mazzardo-Martins L, Martins DF, Rocha LRMM, Santos ARSS, et al. Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. Eur J Pharmacol. 2014 Aug 5;736:16–25.

87. Lee HJ, Jeong HS, Kim DJ, Noh YH, Yuk DY, Hong JT. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-$\kappa{\$}B activation in RAW264.7 cells. Arch Pharm Res. 2008 Mar;31(3):342–9.

88. Kapur A, Felder M, Fass L, Kaur J, Czarnecki A, Rathi K, et al. Modulation of oxidative stress and subsequent induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress allows citral to decrease cancer cell proliferation. Sci Rep. 2016 Jul;6(1):27530.

89. Shen Y, Sun Z, Guo X. Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR-$γ$. Eur J Pharmacol. 2015 Jan;747:45–51.

90. Verma V, Sharma V, Singh V, Kumar R, Khan MF, Singh AK, et al. Labda-8(17),12,14-trien-19-oic acid contained in fruits of Cupressus sempervirens Suppresses benign prostatic hyperplasia in rat and in vitro human models through

inhibition of androgen and STAT-3 signaling. Phytotherapy Research. 2014;28(8):1196–203.

91. Bailly C. Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereo-isomers. Eur J Pharmacol. 2020 Mar 15;871:172945.

92. Pubchem [Internet]. [cited 2025 Jan 2]. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 638011, Citral. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Citral

93. PuhChem [Internet]. [cited 2025 Jan 2]. National Center for Biotechnology Information (2025). PubChem Compound Summary for CID 643779, Neral. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neral

94. Modak T, Mukhopadhaya A. Effects of citral, a naturally occurring antiadipogenic molecule, on an energy-intense diet model of obesity. Indian J Pharmacol. 2011 May;43(3):300.

95. Lai YS, Lee WC, Lin YE, Ho CT, Lu KH, Lin SH, et al. Ginger essential oil ameliorates hepatic injury and lipid accumulation in high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. J Agric Food Chem. 2016 Mar 16;64(10):2062–71.

96. Katsukawa M, Nakata R, Takizawa Y, Hori K, Takahashi S, Inoue H. Citral, a component of lemongrass oil, activates PPARα and γ and suppresses COX-2 expression. Biochim Biophys Acta. 2010 Nov;1801(11):1214–20.

97. Song Y, Zhao H, Liu J, Fang C, Miao R. Effects of Citral on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Inflammation. 2016 Apr;39(2):663–71.

98. Emílio-Silva MT, Mota CMDD, Hiruma-Lima CA, Antunes-Rodrigues J, Cárnio EC, Branco LGSS. Antipyretic Effects of Citral and Possible Mechanisms of Action. Inflammation. 2017 Oct;40(5):1735–41.

99. Emílio-Silva MT, Rodrigues VP, Bueno G, Ohara R, Martins MG, Horta-Júnior JAC, et al. Hypothermic Effect of Acute Citral Treatment during LPS-induced Systemic Inflammation in Obese Mice: Reduction of Serum TNF-α and Leptin Levels. Biomolecules. 2020 Oct 17;10(10):1454.

100. WHO - World Health Organization. https://www.who.int/news/item/04-03-2022-world-obesity-day-2022-accelerating-action-to-stop-obesity. 2022 [cited 2023 May 23]. World Obesity Day 2022 – Accelerating action to stop obesity. Available from: https://www.who.int/news/item/04-03-2022-world-obesity-day-2022-accelerating-action-to-stop-obesity

101. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, 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 [Internet]. 2011 [cited 2019 Jun 29];106(Supplement S3):S1–78. Available from: https://doi.org/10.1017/S0007114511005460

102. Turpin SM, Ryall JG, Southgate R, Darby I, Hevener AL, Febbraio MA, et al. Examination of 'lipotoxicity' in skeletal muscle of high-fat fed and *ob* / *ob* mice. J

Physiol [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Mar 27];587(7):1593–605. Available from: http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2008.166033

103. Rosendo-Silva D, Viana S, Carvalho E, Reis F, Matafome P. Are gut dysbiosis, barrier disruption, and endotoxemia related to adipose tissue dysfunction in metabolic disorders? Overview of the mechanisms involved. Intern Emerg Med. 2023 Aug 4;18(5):1287–302.

104. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat Rev Immunol [Internet]. 2009 Nov [cited 2020 Feb 15];9(11):799–809. Available from: http://www.nature.com/articles/nri2653

105. Gil-Cardoso K, Ginés I, Pinent M, Ardévol A, Blay M, Terra X. Effects of flavonoids on intestinal inflammation, barrier integrity and changes in gut microbiota during diet-induced obesity. Nutr Res Rev [Internet]. 2016 Dec 14 [cited 2019 Nov 19];29(2):234–48. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422416000159/type/journal_article

106. Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NMJ, Magness S, et al. High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. Gaetani S, editor. PLoS One [Internet]. 2010 Aug 16 [cited 2020 Feb 22];5(8):e12191. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0012191

107. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity

[Internet]. Gut Microbes Jul 14, 2012 p. 279–88. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmic.19625

108. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. Genome Med [Internet]. 2016 Dec 20 [cited 2019 Nov 5];8(1):42. Available from: http://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-016-0303-2

109. Saunders KH, Umashanker D, Igel LI, Kumar RB, Aronne LJ. Obesity Pharmacotherapy. Medical Clinics of North America [Internet]. 2018 Jan;102(1):135–48. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025712517301347

110. Kushner RF. Weight loss strategies for treatment of obesity. Prog Cardiovasc Dis. 2014 Jan 1;56(4):465–72.

111. Mangprayool T, Kupittayanant S, Chudapongse N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. Fitoterapia [Internet]. 2013 Sep;89(1):68–73. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X13001329?via%3Dihub

112. Nishijima CM, Ganev EG, Mazzardo-Martins L, Martins DF, Rocha LRMM, Santos ARSS, et al. Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. Eur J Pharmacol [Internet]. 2014 Aug 5 [cited 2018 Jan 14];736:16–25. Available from:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299914003252?via%3Dihub

113. Sharma S, Habib S, Sahu D, Gupta J. Chemical Properties and Therapeutic Potential of Citral, a Monoterpene Isolated from Lemongrass. Med Chem (Los Angeles) [Internet]. 2019 Dec 27 [cited 2021 Apr 5];17(1):2–12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31880247/

114. Modak T, Mukhopadhaya A. Effects of citral, a naturally occurring antiadipogenic molecule, on an energy-intense diet model of obesity. Indian J Pharmacol [Internet]. 2011 May [cited 2018 Jan 19];43(3):300. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713095

115. Lai YS, Lee WC, Lin YE, Ho CT, Lu KH, Lin SH, et al. Ginger essential oil ameliorates hepatic injury and lipid accumulation in high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. J Agric Food Chem [Internet]. 2016 Mar 16 [cited 2018 Jan 14];64(10):2062–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26900108

116. Emílio-Silva MT, Rodrigues VP, Bueno G, Ohara R, Martins MG, Horta-Júnior JAC, et al. Hypothermic Effect of Acute Citral Treatment during LPS-induced Systemic Inflammation in Obese Mice: Reduction of Serum TNF-α and Leptin Levels. Biomolecules [Internet]. 2020 Oct 17;10(10):1454. Available from: https://www.mdpi.com/2218-273X/10/10/1454

117. Ohara R, Dario FL, Emílio-Silva MT, Assunção R, Rodrigues VP, Bueno G, et al. Citral Modulates MMP-2 and MMP-9 Activities on Healing of Gastric Ulcers

Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity. Int J Mol Sci. 2023 Mar 3;24(5):4888.

118. Arçari DP, Santos JC, Gambero A, Ribeiro ML. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (Ilex paraguariensis) extract on adipogenesis. Food Chem. 2013;141(2):809–15.

119. Puchtler H, Barton BP, Waldrop FS, Meloan SN, Hobbs JL. A comparative study of myosins and prekeratin in epithelial cells of methacarn-fixed tissues. Histochemistry. 1985 Jun;82(5):403–9.

120. Toivio L, Launonen H, Lindén J, Lehto M, Vapaatalo H, Salmenkari H, et al. Ketogenic Diet High in Saturated Fat Promotes Colonic Claudin Expression without Changes in Intestinal Permeability to Iohexol in Healthy Mice. Nutrients. 2023 Dec 20;16(1):18.

121. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 2001 Dec 1;25(4):402–8.

122. Araújo DFS, Guerra GCB, Pintado MME, Sousa YRF, Algieri F, Rodriguez-Nogales A, et al. Intestinal anti-inflammatory effects of goat whey on DNBS-induced colitis in mice. PLoS One. 2017 Sep 28;12(9):e0185382.

123. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982 Oct;126(1):131–8.

124. Yang PC, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci [Internet]. 2012;4(9):429. Available from: http://www.najms.org/text.asp?2012/4/9/429/100998

125. Palacios-Marin I, Serra D, Jimenez-Chillarón J, Herrero L, Todorčević M. Adipose Tissue Dynamics: Cellular and Lipid Turnover in Health and Disease. Nutrients. 2023 Sep 14;15(18):3968.

126. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature. 2008 Jun 4;453(7196):783–7.

127. Spalding KL, Bernard S, Näslund E, Salehpour M, Possnert G, Appelsved L, et al. Impact of fat mass and distribution on lipid turnover in human adipose tissue. Nat Commun. 2017 May 23;8(1):15253.

128. Sprenger S, Woldemariam T, Kotchoni S, Elshabrawy HA, Chaturvedi LS. Lemongrass essential oil and its major constituent citral isomers modulate adipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. J Food Biochem [Internet]. 2022 Feb 3;46(2). Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.14037

129. Sri Devi S, Ashokkumar N. Citral, a Monoterpene Inhibits Adipogenesis Through Modulation of Adipogenic Transcription Factors in 3T3-L1 Cells. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2018;33(4):414–21.

130. Mohammad S, Thiemermann C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. Front Immunol [Internet]. 2021 Jan 11;11. Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.594150/full

131. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. Science (1979) [Internet]. 2018 Mar 23;359(6382):1376–83. Available from: https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aar3318

132. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. PLoS One. 2012 Oct 16;7(10):e47713.

133. Saad MJA, Santos A, Prada PO. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. Physiology [Internet]. 2016 Jul;31(4):283–93. Available from: http://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physiol.00041.2015

134. Liaqat I, Durrani AI, Zafar U, Rubab S, Faheem M, Mubin M, et al. Role of modified diet and gut microbiota in metabolic endotoxemia in mice. Arch Microbiol [Internet]. 2021 Jul 24; Available from: https://link.springer.com/10.1007/s00203-021-02491-4

135. Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. British Journal of Nutrition [Internet]. 2015 Oct 14 [cited 2018 Jan 29];114(7):999–1012. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114515002093

136. Sugita H, Kaneki M, Tokunaga E, Sugita M, Koike C, Yasuhara S, et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2002 Feb 1;282(2):E386–94.

137. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. Trends Immunol. 2018 Sep;39(9):677–96.

138. Xie Y, Ding F, Di W, Lv Y, Xia F, Sheng Y, et al. Impact of a high-fat diet on intestinal stem cells and epithelial barrier function in middle-aged female mice. Mol Med Rep. 2020 Jan 13;

139. Kawaguchi S, Sakuraba H, Kikuchi H, Matsuki K, Hayashi Y, Ding J, et al. Polygonum tinctorium leaf extract ameliorates high-fat diet-induced intestinal epithelial damage in mice. Exp Ther Med. 2023 Jan 26;25(3):112.

140. Tanaka S, Nemoto Y, Takei Y, Morikawa R, Oshima S, Nagaishi T, et al. High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Feb;522(4):971–7.

141. de Wit NJW, Boekschoten M V., Bachmair EM, Hooiveld GJEJ, de Groot PJ, Rubio-Aliaga I, et al. Dose-Dependent Effects of Dietary Fat on Development of Obesity in Relation to Intestinal Differential Gene Expression in C57BL/6J Mice. PLoS One. 2011 Apr 25;6(4):e19145.

142. Estaki M. Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. World J Gastroenterol [Internet]. 2014;20(42):15650. Available from: http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i42/15650.htm

143. Li Q, Yu C, Chen Y, Liu S, Azevedo P, Gong J, et al. Citral alleviates peptidoglycan-induced inflammation and disruption of barrier functions in porcine intestinal epithelial cells. J Cell Physiol. 2022 Mar 18;237(3):1768–79.

144. Bouzenna H, Hfaiedh N, Giroux-Metges MA, Elfeki A, Talarmin H. Biological properties of citral and its potential protective effects against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017 Mar;87:653–60.

145. Souza ACS, Silva LK, Queiroz TB, Marques ES, Hiruma-Lima CA, Gaivão IOM, et al. Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. Drug Chem Toxicol. 2020 Jul 3;43(4):435–40.

146. Della Guardia L, Shin AC. Obesity-induced tissue alterations resist weight loss: A mechanistic review. Diabetes Obes Metab [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2025 Jan 20];26(8):3045–57. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/dom.15637

147. Cândido FG, Valente FX, Grześkowiak ŁM, Moreira APB, Rocha DMUP, Alfenas R de CG. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. Int J Food Sci Nutr [Internet]. 2018 Feb 17 [cited 2020 Feb 10];69(2):125–43. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637486.2017.1343286

148. Teixeira TFS, Collado MC, Ferreira CLLF, Bressan J, Peluzio M do CG. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. Nutrition Research [Internet]. 2012 Sep;32(9):637–47. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0271531712001595

149. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. Journal of Endocrinology. 2014;222(3):113–27.

150. de Bona Schraiber R, de Mello AH, Garcez ML, de Bem Silveira G, Zacaron RP, de Souza Goldim MP, et al. Diet-induced obesity causes hypothalamic neurochemistry alterations in Swiss mice. Metab Brain Dis [Internet]. 2019 Apr 11 [cited 2019 Sep 23];34(2):565–73. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11011-018-0337-9

151. Estaki M. Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity. World J Gastroenterol. 2014;20(42):15650.

152. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes. 2008 Jun 1;57(6):1470–81.

153. Shi H, Kokoeva M V., Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. Journal of Clinical Investigation. 2006 Nov 1;116(11):3015–25.

154. Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. Cellular and Molecular Life Sciences [Internet]. 2015 Feb 22 [cited 2018 Jan 29];72(3):557–81. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00018-014-1762-5

155. Clemente-Postigo M, Oliva-Olivera W, Coin-Aragüez L, Ramos-Molina B, Giraldez-Perez RM, Lhamyani S, et al. Metabolic endotoxemia promotes adipose

dysfunction and inflammation in human obesity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019 Feb 1;316(2):E319–32.

156. Kumar P, Schroder EA, Rajaram MVS, Harris EN, Ganesan LP. The Battle of LPS Clearance in Host Defense vs. Inflammatory Signaling. Cells. 2024 Sep 21;13(18):1590.

157. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: Learning from nonalcoholic fatty liver disease. Free Radic Biol Med [Internet]. 2013;65:952–68. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.174

158. Kakimoto PA, Kowaltowski AJ. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. Redox Biol [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2019 Jul 11];8:216–25. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221323171630009X?via%3Dihub#t0005

159. Mota CMD, Rodrigues-Santos C, Carolino ROG, Anselmo-Franci JA, Branco LGS. Citral-induced analgesia is associated with increased spinal serotonin, reduced spinal nociceptive signaling, and reduced systemic oxidative stress in arthritis. J Ethnopharmacol. 2020 Mar;250:112486.

160. Nordin N, Yeap SK, Rahman HS, Zamberi NR, Mohamad NE, Abu N, et al. Antitumor and Anti-Metastatic Effects of Citral-Loaded Nanostructured Lipid Carrier in 4T1-Induced Breast Cancer Mouse Model. Molecules. 2020 Jun 9;25(11):2670.

161. Emílio-Silva MT, Mota CMDD, Hiruma-Lima CA, Antunes-Rodrigues J, Cárnio EC, Branco LGSS. Antipyretic Effects of Citral and Possible Mechanisms of Action. Inflammation [Internet]. 2017 Oct;40(5):1735–41. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10753-017-0615-4

162. Arçari DP, Santos JC, Gambero A, Ribeiro ML. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (Ilex paraguariensis) extract on adipogenesis. Food Chem. 2013;141(2):809–15.

163. Wang CY, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. Methods in Molecular Biology. 2012;821:421–33.

164. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetes Care. 2000 Jan;23(1):57–63.

165. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Gastroenterology. 1984 Dec;87(6):1344–50.

166. Ruiz-Malagón AJ, Rodríguez-Sojo MJ, Hidalgo-García L, Molina-Tijeras JA, García F, Pischel I, et al. The Antioxidant Activity of Thymus serpyllum Extract Protects against the Inflammatory State and Modulates Gut Dysbiosis in Diet-Induced Obesity in Mice. Antioxidants. 2022 May 28;11(6):1073.

167. Winterbourn CCCC, Hawkins RERE, Brian M, Carrell RWW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med [Internet]. 1975 Feb;85(2):337–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/803541

168. Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Analysis of Free Radicals in Biological Systems. 1995. p. 237–48.

169. Chang JF, Yeh JC, Ho CT, Liu SH, Hsieh CY, Wang TM, et al. Targeting ROS and cPLA2/COX2 Expressions Ameliorated Renal Damage in Obese Mice with Endotoxemia. Int J Mol Sci. 2019 Sep 6;20(18):4393.

170. de La Serre CB, de Lartigue G, Raybould HE. Chronic exposure to Low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons. Physiol Behav. 2015 Feb;139:188–94.

171. Lindenberg FCB, Ellekilde M, Thörn AC, Kihl P, Larsen CS, Hansen CHF, et al. Dietary LPS traces influences disease expression of the diet-induced obese mouse. Res Vet Sci. 2019 Apr;123:195–203.

172. Cabral F, Al-Rahem M, Skaggs J, Thomas TA, Kumar N, Wu Q, et al. Stabilin receptors clear LPS and control systemic inflammation. iScience. 2021 Nov;24(11):103337.

173. Barchetta I, Cimini FA, Sentinelli F, Chiappetta C, Di Cristofano C, Silecchia G, et al. Reduced Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) Levels Are Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Adipose Inflammation in Human Obesity. Int J Mol Sci. 2023 Dec 6;24(24):17174.

174. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipose tissue, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. Minerva Endocrinology. 2017 Feb;42(2).

175. Polyzos SA, Mantzoros CS. Nonalcoholic fatty future disease. Metabolism. 2016 Aug;65(8):1007–16.

176. Krisnamurti DGB, Purwaningsih EH, Tarigan TJE, Nugroho CMH, Soetikno V, Louisa M. Alterations of Liver Functions and Morphology in a Rat Model of Prediabetes After a Short-term Treatment of a High-fat High-glucose and Low-dose Streptozotocin. Open Access Maced J Med Sci. 2022 Mar 16;10(A):668–74.

177. Jalili V, Poorahmadi Z, Hasanpour Ardekanizadeh N, Gholamalizadeh M, Ajami M, Houshiarrad A, et al. The association between obesity with serum levels of liver enzymes, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase in adult women. Endocrinol Diabetes Metab. 2022 Nov 30;5(6).

178. Lambertucci F, Arboatti A, Guillermina M, Motiño O, Luján M De, Paula M, et al. ScienceDirect Disruption of tumor necrosis factor alpha receptor 1 signaling accelerates NAFLD progression in mice upon a high-fat diet ☆. J Nutr Biochem [Internet]. 2018;58:17–27. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.013

179. Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. Nat Rev Endocrinol [Internet]. 2017;13(1):36–49. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.135

180. Mitchell R McGill. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. EXCLI J. 2016;817–8.

181. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2002 Feb 1;282(2):G193–9.

182. Nakagawa H, Hayata Y, Kawamura S, Yamada T, Fujiwara N, Koike K. Lipid Metabolic Reprogramming in Hepatocellular Carcinoma. Cancers (Basel). 2018 Nov 15;10(11):447.

183. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. In: Current Protocols in Pharmacology [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3482633/pdf/nihms405309.pdf

184. DeJesus RS, Croghan IT, Jacobson DJ, Fan C, St. Sauver J. Incidence of Obesity at 1 and 3 Years Among Community Dwelling Adults: A Population-Based Study. J Prim Care Community Health. 2022 Jan 5;13.

185. Tremmel M, Gerdtham UG, Nilsson P, Saha S. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. Int J Environ Res Public Health. 2017 Apr 19;14(4):435.

186. Lasbleiz A, Gaborit B, Soghomonian A, Bartoli A, Ancel P, Jacquier A, et al. COVID-19 and Obesity: Role of Ectopic Visceral and Epicardial Adipose Tissues in Myocardial Injury. Front Endocrinol (Lausanne) [Internet]. 2021 Aug 16;12.

Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.726967/full

187. Ghosh S, Bouchard C. Convergence between biological, behavioural and genetic determinants of obesity. Nat Rev Genet [Internet]. 2017 Dec 9;18(12):731–48. Available from: http://www.nature.com/articles/nrg.2017.72

188. Mayoral LC, Andrade G, Mayoral EC, Huerta T, Canseco S, Rodal Canales F, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. Indian Journal of Medical Research [Internet]. 2020;151(1):11. Available from: http://www.ijmr.org.in/text.asp?2020/151/1/11/279134

189. Genser L, Aguanno D, Soula HA, Dong L, Trystram L, Assmann K, et al. Increased jejunal permeability in human obesity is revealed by a lipid challenge and is linked to inflammation and type 2 diabetes. J Pathol. 2018 Oct 28;246(2):217–30.

190. Potrykus M, Czaja-Stolc S, Stankiewicz M, Kaska Ł, Małgorzewicz S. Intestinal Microbiota as a Contributor to Chronic Inflammation and Its Potential Modifications. Nutrients. 2021 Oct 28;13(11):3839.

191. Wadden TA, Webb VL, Moran CH, Bailer BA. Lifestyle modification for obesity: New developments in diet, physical activity, and behavior therapy. Vol. 125, Circulation. Circulation; 2012. p. 1157–70.

192. Okumura R, Takeda K. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. Exp Mol Med. 2017 May 26;49(5):e338–e338.

193. Acciarino A, Diwakarla S, Handreck J, Bergola C, Sahakian L, McQuade RM. The role of the gastrointestinal barrier in obesity-associated systemic inflammation. Obesity Reviews. 2024 Mar 18;25(3).

194. Sundaram S, Borthakur A. Altered intestinal epithelial nutrient transport: an underappreciated factor in obesity modulated by diet and microbiota. Biochemical Journal. 2021 Mar 12;478(5):975–95.

195. Song Y, Zhao H, Liu J, Fang C, Miao R. Effects of Citral on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Inflammation [Internet]. 2016 Apr;39(2):663–71. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10753-015-0292-0

196. Hidalgo-Garcia L, Molina-Tijeras JA, Huertas-Peña F, Ruiz-Malagón AJ, Diez-Echave P, Vezza T, et al. Intestinal mesenchymal cells regulate immune responses and promote epithelial regeneration in vitro and in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice. Acta Physiologica. 2021 Oct 21;233(2).

197. Gonzalez-Andrades M, Alonso-Pastor L, Mauris J, Cruzat A, Dohlman CH, Argüeso P. Establishment of a novel in vitro model of stratified epithelial wound healing with barrier function. Sci Rep. 2016 Jan 13;6(1):19395.

198. Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 1996 Feb 1;270(2):G225–37.

199. Baumann A, Rajcic D, Brandt A, Sánchez V, Jung F, Staltner R, et al. Alterations of nitric oxide homeostasis as trigger of intestinal barrier dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease. J Cell Mol Med. 2022 Feb 14;26(4):1206–18.

200. Kucharzik T, Lügering N, Pauels HG, Domschke W, Stoll R. IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells. Clin Exp Immunol. 2001 Dec 25;111(1):152–7.

201. Meyer F, Wendling D, Demougeot C, Prati C, Verhoeven F. Cytokines and intestinal epithelial permeability: A systematic review. Autoimmun Rev. 2023 Jun;22(6):103331.

202. Al-Sadi R, Youssef M, Rawat M, Guo S, Dokladny K, Haque M, et al. MMP-9-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by p38 kinase signaling pathway activation of MLCK gene. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2019 Feb 1;316(2):G278–90.

203. Pujada A, Walter L, Patel A, Bui TA, Zhang Z, Zhang Y, et al. Matrix metalloproteinase MMP9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis associated cancer. Oncotarget. 2017 Nov 7;8(55):94650–65.

204. Znalesniak E, Hoffmann W. Modulation of Cell-cell Contacts during Intestinal Restitution <i>In Vitro</i> and Effects of Epidermal Growth Factor (EGF). Cellular Physiology and Biochemistry. 2010;25(4–5):533–42.

205. Kai Chen, Nezu R, Wasa M, Sando K, Kamata S, Takagi Y, et al. Insulin-Like Growth Factor-1 Modulation of Intestinal Epithelial Cell Restitution. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 1999 Sep 16;23(5_suppl):S89–92.

206. Bohin N, McGowan KP, Keeley TM, Carlson EA, Yan KS, Samuelson LC. Insulin-like Growth Factor-1 and mTORC1 Signaling Promote the Intestinal Regenerative Response After Irradiation Injury. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2020;10(4):797–810.

207. Lee HJ, Jeong HS, Kim DJ, Noh YH, Yuk DY, Hong JT. Inhibitory effect of citral on NO production by suppression of iNOS expression and NF-$\kappa{\$}B activation in RAW264.7 cells. Arch Pharm Res [Internet]. 2008 Mar;31(3):342–9. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s12272-001-1162-0

208. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. Nat Rev Immunol. 2014 Oct 19;14(10):667–85.