

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE CICATRIZAÇÃO DAS ÚLCERAS
GÁSTRICAS EM ANIMAIS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA
HIPERLIPÍDICA E A AÇÃO DO CITRAL**

RIE OHARA

BOTUCATU – SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE CICATRIZAÇÃO DAS
ÚLCERAS GÁSTRICAS EM ANIMAIS COM OBESIDADE
INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA E A AÇÃO DO CITRAL

RIE OHARA

ORIENTADORA: PROFA. ASSOC. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA

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

Prof. Assoc. Clélia Akiko Hiruma-Lima

BOTUCATU – SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ohara, Rie.

Caracterização do perfil de cicatrização de úlceras gástricas em animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e a ação do citral / Rie Ohara. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

Capes: 21006008

1. Úlcera gástrica. 2. Obesidade. 3. Cicatrização. 4. Aromatizantes.

Palavras-chave: cicatrização; citral; obesidade; úlcera gástrica.

Agradecimentos

O presente trabalho teve a duração de quatro anos e meio e ao longo de todo esse tempo, muitos passaram por mim. Esses anos foram carregados de acontecimentos daqueles que chamamos de históricos e é impossível dissociar o contexto em que vivemos do trabalho que apresento aqui. Este trabalho começou em março de 2018 e finaliza em agosto de 2022 e eu gostaria de dedicar este espaço da minha tese a todos que de alguma forma colaboraram durante esse longo e árduo percurso. Alguns em especial, vou citar aqui:

Primeiramente, à minha avó Yoshica e minha mãe Laura, que não puderam me acompanhar durante este processo, mas a quem devo muito do que sou e do que desejo ser. Foram duas pessoas que não tiveram a chance de concluir um Ensino Superior, mas sempre acreditaram na educação como ferramenta de busca de autonomia e de luta contra pobreza (*in memoriam*).

À professora Clélia, que me orientou desde a iniciação científica em 2014, que conheceu e acolheu todas as minhas versões que existiram durante esse tempo e segue sendo um exemplo de ética e perseverança, uma pessoa que abraça o mundo e o faz com muito êxito.

À professora Lúcia, que também me acompanhou durante todo esse tempo, que sempre vou admirar por ser alguém “à frente do seu tempo” e nos ensina a desfrutar o mundo sem deixar de questionar suas injustiças.

Sem as diferentes lutas individuais e coletivas das mulheres que citei anteriormente, esse trabalho jamais teria existido.

Agradeço também a todos que passaram pelo laboratório de Ensaios Biológicos com Produtos Naturais: Gabriela, Vinícius, Maycon, Felipe Lima, Renata, Priscila, Ana Carolina, Victoria, Melina e Felipe Fagundes. Vocês são muito especiais na minha vida, muito obrigada por toda a colaboração no trabalho e principalmente pela amizade e parceria de vocês!

À professora Patrícia Fidelis, com quem aprendi muito sobre o ensino, principalmente sobre a humanidade no ensino. Sou muito grata pela oportunidade que tive de iniciar minha vida na docência ao seu lado.

Agradeço também às meninas com quem pude dividir a casa, a vida, as lamentações e as comemorações: Ana Flávia, Agda, Thaís, Vitória e ao Dingo. Tenho muita sorte de poder ter compartilhado a vida com vocês!

Ao Massaharu, pelo amor, sensibilidade, apoio e compreensão durante os altos e baixos dessa jornada.

As minhas amigas Bruna, Talitha, Thauanne, Marília, Juliana e Andressa. Encontrei umas palavras da escritora Rupi Kaur que expressam meu sentimento e minha gratidão por ter vocês na minha vida: “Eu posso viver sem amor romântico, mas eu não consigo sobreviver sem as mulheres que eu chamo de amigas, elas sabem exatamente o que eu preciso antes mesmo de eu saber que preciso, a maneira como nos disponibilizamos umas para outras é apenas diferente”.

A todos os funcionários e professores do Setor de Fisiologia que contribuíram com a execução deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

O meu agradecimento por todos esses anos de formação ao Instituto de Biociências de Botucatu e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Câmpus de Botucatu.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. A todas e todos, deixo aqui o meu MUITO OBRIGADA!

Prólogo

O desenvolvimento deste projeto de doutorado possibilitou estudos direcionados à prospecção de biomoléculas com potencial terapêutico para doenças do trato gastrointestinal. Durante a execução deste trabalho, também foram realizadas outras atividades no intuito de enriquecer minha formação profissional e científica:

Trabalhos apresentados em eventos científicos

Apresentação oral

2021:

- **OHARA, R.**; DARIO, F. L.; BUENO G; RODRIGUES, V. P.; EMILIO-SILVA, M. T.; ASSUNCAO, R.; FIORETTO, A. C.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. Modulation of matrix metalloproteinases exerted by Citral in the healing of gastric ulcers in eutrophic and obese mice. Simpósio de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e seus Potenciais Terapêuticos.

Apresentações em painel

2020:

- OLIVEIRA, P. F.; **OHARA, R.**; ALVES, N. P. C. Humanity in remote physiology teaching: creating a connect and interactivity during covid-19 pandemic. 55º Congresso Anual Sociedade Brasileira de Fisiologia.
- OLIVEIRA, P. F.; ALVES, N. P. C.; **OHARA, R.** Humanidade no ensino remoto de fisiologia: criando vínculo e interatividade em tempos de pandemia. E-Educação: Criatividade, Inovação e Essência.

2019:

- BUENO, G.; PERICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; **OHARA, R.**; EMILIO-SILVA, M. T.; ROCHA, L. R. M.; BASTEN, M. A.; NUNES, D.; HIRUMA-LIMA, C. A. The role of essential oil *Baccharis trimera* in experimental ulcer disease: characterization of anti-inflammatory and healing mechanisms of action. 7th Brazilian Conference on Natural Products.
- EMILIO-SILVA, M. T.; RODRIGUES, V. P.; BUENO, G.; **OHARA, R.**; ROCHA, L. R. M.; BRANCO, L. G.; HIRUMA-LIMA, C. A. Citral reduced levels of plasmatic TNF-alfa in mice fed with standard diet (SD) and high-fat diet (HFD) following LPS-induced systemic inflammation. 7th Brazilian Conference on Natural Products.
- HIRUMA-LIMA, C. A.; PERICO, L. L.; EMILIO-SILVA, M. T.; **OHARA, R.**; BUENO, G.; RODRIGUES, V. P.; ROCHA, L. R. M.; BARBOSA FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Monoterpenes: systematic review about the advances in the management of peptic Ulcer and *Helicobacter pylori*. 7th Brazilian Conference on Natural Products.

- **OHARA, R.;** PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; BUENO, G.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Terminalia catappa*: an alternative treatment for gastric lesions induced by ischemia and reperfusion. 7th Brazilian Conference on Natural Products.

Participação em eventos científicos

2021: Simpósio de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e seus Potenciais Terapêuticos (João Pessoa/PB).

2019: 7th Brazilian Conference on Natural Products (Rio de Janeiro/RJ).

Participação em bancas avaliadoras

2019: Banca avaliadora na primeira fase do XXXI Congresso de Iniciação Científica. Instituto de Biociências de Botucatu - IBB, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu/SP, Brasil.

2018: Banca avaliadora na primeira fase do XXX Congresso de Iniciação Científica. Instituto de Biociências de Botucatu - IBB, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu/SP, Brasil.

Atividades de extensão universitária

2018 a 2020: Monitora do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programas de Extensão Universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico”, realizado no Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu/SP.

Atividades de ensino

2020 a 2021: Disciplinas ministradas como professora bolsista do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências, UNESP- Botucatu/SP:

Fisiologia Humana – Enfermagem (24h)

Fisiologia Humana – Ciências Biológicas (16h)

Fisiologia Humana – Física médica (16h)

Fisiologia Humana – Nutrição (35h)

Iniciação Científica – Ciências Biomédicas (45h)

Atividades de divulgação científica

2020: Webinar: “Sexo na pandemia”. Agência de Divulgação Científica e de Comunicação do IBB/UNESP. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=jqB7pdssKuU>

2021: Webinar: “De pernas pro ar”: Uma conversa sobre o prazer sexual feminino. Agência de Divulgação Científica e de Comunicação do IBB/UNESP. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=yp2zkSA1XFU>

Artigos completos publicados em periódicos

2021:

- BUENO, G.; RICO, S. L. C.; PÉRICO, L. L.; **OHARA, R.**; RODRIGUES, V. P.; EMÍLIO-SILVA, M. T.; ASSUNÇÃO, R.; ROCHA, L. R. M.; NUNES, D. S.; BESTEN, M. A.; HEIDEN, G.; CAMARGO, A. L. C.; 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*. JCR 2020: 4,36.

2020:

- PÉRICO, L. L.; EMÍLIO-SILVA, M. T.; **OHARA, R.**; RODRIGUES, V. P.; BUENO, G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ROCHA, L. R. M.; BATISTA, L. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. Systematic analysis of monoterpenes: advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. *Biomolecules*. JCR 2020: 4,879.
- **OHARA, R.**; PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; BUENO, G.; ZANATTA, A. C.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; CONSTATINO, F. B.; JUSTULIN, L. A.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Terminalia catappa* L. infusion accelerates the healing process of gastric ischemia- reperfusion injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. JCR 2020: 4,36.
- EMÍLIO-SILVA, M. T.; RODRIGUES, V. P.; BUENO, G.; **OHARA, R.**; MARTINS, M. G.; HORTA-JÚNIOR, J. A. C.; BRANCO, L. G. S.; ROCHA, L. R. M.; HIRUMA-LIMA, C. A. Hypothermic Effect of acute citral treatment during LPS-induced systemic inflammation in obese mice: reduction of serum TNF- α and leptin levels. *Biomolecules*. JCR 2020: 4,879.

2019:

- PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; **OHARA, R.**; NUNES, V. V. A.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Can the gastric healing effect of *Eugenia punicifolia* be the same in male and female rats? *Journal of Ethnopharmacology*. JCR 2020: 4,36.

2018:

- PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; **OHARA, R.**; BUENO, G.; NUNES, V. V. A.; SANTOS, R. C.; CAMARGO, A. C. L.; JUSTULIN, L. A.; ANDRADE, S. F.; STEIMBACH, V. M. B.; SILVA, L. M.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; SANTOS,

C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Sex-specific effects of extract on gastric ulcer healing in rats. *World Journal of Gastroenterology*. JCR 2020: 5,742.

Cursos realizados

2022: Introdução à Gestão da Inovação em Medicamentos da Biodiversidade. Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ (60h)

2020: Curso de Formação e Desenvolvimento da Docência "Como Trabalhar com Ensino Remoto: Possibilidades e Desafios – 2ª Edição – Faculdade de Medicina de Botucatu - FMB, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (15h)

2019: Docência no Ensino Superior: fundamentos, metodologias e práticas pedagógicas. Instituto de Educação e Pesquisa em Práticas Pedagógicas - IEP³, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (30h)

Disciplinas cursadas

Tópicos em Biologia Geral e Aplicada (30h)

Empreendedorismo (60h)

O cientista e o professor universitário (30h)

Comunicação científica oral (45h)

International peer review process (30h)

Prática pedagógica no Ensino Superior: Recursos de Ensino-Aprendizagem (45h)

Fisiopatologia da Obesidade e do Diabetes (60h)

Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia (90h)

Lista de figuras

FIGURA 1 – EVENTOS DA CICATRIZAÇÃO DA ÚLCERA GÁSTRICA.	18
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE CITRAL.....	20
FIGURA 3 - LINHA DO TEMPO DE INDUÇÃO DE OBESIDADE E INDUÇÃO DE LESÃO DE CADA GRUPO.....	23
FIGURA 4 - CLASSIFICAÇÃO DAS ESTRUTURAS DA LESÃO GÁSTRICA.	23
FIGURA 5 - EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL AO LONGO DA INDUÇÃO DE OBESIDADE.	25
FIGURA 6 - ÍNDICE DE ADIPOSIDADE.....	26
FIGURA 7 - ÁREA TOTAL DO ESTÔMAGO.	26
FIGURA 8 - ÁREA DA ÚLCERA EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS INDUÇÃO DA LESÃO.	27
FIGURA 9 - ÁREA DO TECIDO DE REGENERAÇÃO.	28
FIGURA 10 – ESTÔMAGOS DE ANIMAIS ALIMENTADOS COM SD E HFD.	29
FIGURA 11 – QUANTIFICAÇÃO DE IL-1 β E TNF- α	31
FIGURA 12 – ATIVIDADE DAS MMP-2 E 9.	32
FIGURA 13 – QUANTIFICAÇÃO DE VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, EGF E HGF	33
FIGURA 14 – EVOLUÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE IL-1 β E TNF- α	63
FIGURA 15 – EVOLUÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE VEGF-A, VEGF-C E VEGF-D	64
FIGURA 16 – EVOLUÇÃO TEMPORAL DA CONCENTRAÇÃO DE EGF-A E HGF	66

Resumo

A obesidade causa um quadro inflamatório de baixo grau que pode resultar em agravamentos de distúrbios do trato gastrointestinal e maior dificuldade no processo de cicatrização em úlceras gástricas. Apesar de alguns estudos terem investigado a relação entre obesidade e as úlceras gástricas, ainda não existe uma relação clara estabelecida entre essas duas doenças. Diante desse cenário, este trabalho tem dois objetivos principais: Caracterizar o perfil de cicatrização de lesões gástricas em animais eutróficos e obesos e avaliar os efeitos farmacológicos do citral sobre a cicatrização. Para caracterização do perfil de cicatrização foram usados camundongos Swiss machos e para avaliação da ação do citral foram usados camundongos C57Bl-J6. Em ambos experimentos, os animais foram divididos em 2 grupos: Dieta padrão (SD) e dieta hiperlipídica (HFD) e após 12 semanas de ingestão das dietas, os animais passaram por cirurgia de indução de úlcera gástrica por ácido acético. Para comparação do perfil de cicatrização entre animais SD e HFD, os estômagos dos animais foram coletados em cinco períodos pós-indução: 1, 3, 7, 10 ou 14 dias. Também avaliamos a ação do citral em três doses: 25, 100 ou 300 mg/kg durante a fase inicial e tardia da cicatrização, 3 e 10 dias subsequentes de tratamento, respectivamente. Para esse experimento foram incluídos os grupos: controle negativo tratados com veículo (Tween 80 a 1%, 10 mL/kg) e controle positivo tratados com Lansoprazol (30 mg/kg). Todos os estômagos foram coletados para análise morfológica macroscópica, zimografia para quantificação de metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e 9) e quantificação por imunoenensaio multiplex de IL-1 β , TNF- α , VEGF-A, C e D, EGF, HGF e FGF-2. Como resultado, observamos que houve desaceleração da fase inicial da cicatrização em animais que receberam HFD em relação aos animais alimentados com SD. Essa alteração foi seguida de redução da atividade de MMP-9 no mesmo grupo após sete dias de indução da lesão. Os perfis de fatores de crescimento também se mostraram diferentes entre animais que receberam diferentes dietas, principalmente o VEGF-D e EGF. Ao avaliar a ação do citral, verificamos que entre os animais alimentados com HFD, apenas os grupos que receberam citral nas doses de 100 e 300 mg/kg apresentaram redução significativa da área da base da úlcera entre 3 e 10 dias após a indução da lesão. No grupo tratado com citral na dose de 100 mg/kg, a progressão da cicatrização foi acompanhada por redução da atividade de MMP-9. As diferenças observadas no progresso de cicatrização e nas atividades de MMP-2 e 9 podem ser explicadas pelas diferentes respostas em animais alimentados com SD e HFD sobre as concentrações de IL-1 β e TNF- α , citocinas que promovem resposta aguda no processo inflamatório. Consequentemente, os fatores de crescimento VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, EGF e HGF responderam de diferentes formas aos tratamentos administrados nos grupos SD e HFD. Desta

forma, podemos concluir que a ingestão de diferentes dietas interfere no processo de cicatrização de úlceras gástricas e altera as respostas farmacológicas no tratamento das úlceras. O citral promoveu maior taxa de cicatrização apenas em camundongos obesos, quando comparado com os outros tratamentos. Essa mudança foi acompanhada por uma diminuição na MMP-9 tecidual e por modulação da ativação da MMP-2.

Palavras-chave: úlcera gástrica, citral, obesidade, cicatrização.

Abstract

Obesity causes a low-grade inflammatory condition that can impair gastrointestinal tract disorders and greater difficulty in the healing process in gastric ulcers. Although some studies have investigated the relationship between obesity and gastric ulcers, there is still no clear relationship established between these two diseases. Given this scenario, this work has two main objectives: Characterize the healing profile of gastric lesions in eutrophic and obese animals and evaluate the pharmacological effects of citral on healing process. To characterize the healing profile, male Swiss mice were used and to evaluate the action of citral, C57Bl-J6 mice were used. In both experiments, the animals were divided into 2 groups: standard diet (SD) and high fat diet (HFD) and after 12 weeks of ingestion of the diets, the animals underwent gastric ulcer induction surgery. To compare the healing profile between SD and HFD animals, the animals' stomachs were collected at five post-induction periods: 1, 3, 7, 10 or 14 days. We also evaluated the action of citral at three doses: 25, 100 or 300 mg/kg during the early and late stages of healing, 3 and 10 subsequent days of treatment, respectively. For this experiment, the groups were included: negative control treated with vehicle (1% Tween 80, 10 mL/kg) and positive control treated with Lansoprazole (30 mg/kg). All stomachs were collected for macroscopic morphological analysis, zymography for quantification of matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and 9) and quantification by multiplex immunoassay of IL-1 β , TNF- α , VEGF-A, C and D, EGF, HGF and FGF-2. As a result, we observed that there was a deceleration of the initial phase of healing in animals that received HFD compared to animals fed with SD. This change was followed by a reduction in MMP-9 activity in the same group after seven days of injury induction. The growth factor profiles were also different between animals that received different diets, mainly VEGF-D and EGF. When evaluating the action of citral, we found that among the animals fed with HFD, only the groups that received citral at doses of 100 and 300 mg/kg showed a significant reduction in the area of the ulcer base between 3 and 10 days after the induction of the lesion. In the group treated with citral at a dose of 100 mg/kg, healing progression was accompanied by a reduction in MMP-9 activity. The differences observed in the healing progress and in the activities of MMP-2 and 9 can be explained by the different responses in animals fed with SD and HFD on the concentrations of IL-1 β and TNF- α , cytokines that promote an acute response in the inflammatory process. Consequently, the growth factors VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, EGF and HGF responded differently to treatments administered in the SD and HFD groups. Thus, we can conclude that the intake of different diets interferes with the healing process of gastric ulcers and alters the pharmacological responses in the treatment of ulcers. Citral promoted a higher healing rate only

in obese mice, when compared to the other treatments. This change was accompanied by a decrease in tissue MMP-9 and by modulation of MMP-2 activation.

Keywords: gastric ulcer, citral, obesity, healing.

Sumário

APRESENTAÇÃO	15
INTRODUÇÃO	16
OBESIDADE	16
ÚLCERAS GÁSTRICAS	17
CICATRIZAÇÃO	18
CITRAL	20
CAPÍTULO I	21
METODOLOGIA	21
<i>Animais.....</i>	<i>21</i>
<i>Indução de obesidade por dieta hiperlipídica.....</i>	<i>21</i>
<i>Indução de lesão gástrica por ácido acético</i>	<i>22</i>
<i>Análise macroscópica</i>	<i>23</i>
<i>Análise zimográfica</i>	<i>24</i>
<i>Quantificação de IL-1β, TNF-α, EGF, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, HGF e FGF-2</i>	<i>24</i>
<i>Análise estatística</i>	<i>24</i>
RESULTADOS	24
<i>Evolução da massa corporal e índice de adiposidade</i>	<i>24</i>
<i>Análise morfológica dos estômagos.....</i>	<i>26</i>
<i>Quantificação de citocinas pró-inflamatórias</i>	<i>30</i>
<i>Atividade das metaloproteinases de matriz.....</i>	<i>30</i>
<i>Quantificação de fatores de crescimento.....</i>	<i>30</i>
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO.....	38
CAPÍTULO II	39
ABSTRACT	39
INTRODUCTION	40
MATERIALS AND METHODS.....	43
<i>Animals.....</i>	<i>43</i>
<i>Experimental design</i>	<i>43</i>
<i>Obesity induction.....</i>	<i>44</i>
<i>Gastric ulcer induced by acetic acid</i>	<i>44</i>
<i>Macroscopic analysis.....</i>	<i>45</i>
<i>Quantification of MMP-2 and MMP-9 by zymography</i>	<i>45</i>
<i>Statistical analysis</i>	<i>46</i>

RESULTS.....	46
<i>Induction of obesity by HFD ingestion</i>	46
<i>Gastric ulcer induced by acetic acid</i>	50
<i>The activity of matrix metalloproteinases</i>	53
DISCUSSION	55
CONCLUSION.....	57
REFERENCES.....	58
ANEXO I	61
MATERIAL E MÉTODOS	61
<i>Organização de pools</i>	61
<i>Quantificação de IL-1β, TNF-α, EGF, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, HGF e FGF-2</i>	61
<i>Análise estatística</i>	61
RESULTADOS.....	61
<i>Quantificação de citocinas pró-inflamatórias</i>	61
<i>Quantificação de fator de crescimento endotelial vascular A, C e D (VEGF-A, C e D)</i>	62
<i>Quantificação de fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento hepático (HGF)</i>	65
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO.....	70
CONCLUSÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

Apresentação

A divisão dos capítulos deste trabalho foi organizada no sentido de encaminhar os textos para publicação.

A **Introdução** contém uma revisão bibliográfica para contextualização de todos os estudos apresentados neste trabalho. O **capítulo I** contém o estudo amplo da caracterização do perfil de cicatrização de úlceras gástricas em animais alimentados com dieta hiperlipídica. O **capítulo II** contém o manuscrito resultante da primeira parte da avaliação farmacológica do citral, que está sendo submetido para publicação na revista científica *Inflammopharmacology*, portanto o texto será apresentado nos moldes desse periódico. O **Anexo I** contém os resultados adicionais do estudo da atividade do citral.

Introdução

Obesidade

No Brasil, dados de 2019 mostram que 60,3% da população adulta está acima do peso e 25,9%, obesa ¹. A obesidade se caracteriza pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo decorrente do desequilíbrio entre alto consumo e baixo gasto energético ². Esse acúmulo se deposita em forma de tecido adiposo visceral, que é naturalmente produtor de citocinas pró-inflamatórias, dessa forma, a obesidade também configura um quadro inflamatório de baixo grau. Recentemente, o acúmulo de tecido adiposo visceral tem sido associado ao desenvolvimento de comorbidades como resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão, e doenças cardiovasculares ³.

A inflamação sistêmica causada pela obesidade é desencadeada por recrutamento de células imunes, interação, ativação dessas células e liberação de mediadores inflamatórios. Além disso, a combinação de outros eventos também está envolvida na manutenção desse quadro inflamatório. Podemos destacar a dieta hiperlipídica como uma das causas da inflamação no tecido adiposo logo no início da ingestão da dieta, que também foi identificada como um importante fator de manutenção da inflamação. A expansão rápida do tecido adiposo subsequente à ingestão da dieta hiperlipídica não permite que a vascularização se desenvolva em velocidade adequada, fazendo com o que o aporte sanguíneo do tecido não seja apropriado, o que leva ao quadro de hipóxia. O fator induzido por hipóxia (HIF-1 α), que induz a liberação de quimiocinas e também contribui para a manutenção do processo inflamatório ⁴.

As inúmeras consequências da obesidade levam a alterações fisiológicas sistêmicas, afetando diretamente o funcionamento de alguns órgãos. Pacientes com obesidade relatam frequentemente alteração da velocidade do esvaziamento gástrico ⁵. A obesidade abdominal, caracterizada pelo aumento de gordura visceral, está relacionada ao aparecimento de doenças do trato gastrointestinal, devido ao aumento da pressão intra-abdominal causada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo. Além disso, o tecido adiposo secreta localmente adipocitocinas como TNF- α , IL-6, resistina, leptina e adiponectinas que contribuem para manutenção do processo inflamatório ⁶.

A associação entre obesidade e úlceras pépticas tem sido estudada, porém os resultados destes estudos ainda são controversos: Um estudo realizado com profissionais da saúde dos Estados Unidos da América mostrou aumento de risco de úlceras gástricas em pessoas com obesidade ⁷. Por outro lado, um estudo mais recente realizado na Coreia do Sul mostrou que o

quadro de obesidade ou síndrome metabólica não apresentaram aumento de risco de desenvolvimento de úlceras pépticas ⁸.

Úlceras gástricas

A doença ulcerosa péptica refere-se a distúrbios ulcerativos do estômago e/ou do duodeno proximal. É uma das doenças mais comuns do trato gastrointestinal, possui etiologia multifatorial e prevalência global ⁹. No Brasil, dados de 2021 mostram que as úlceras pépticas são a causa de aproximadamente 10.000 internações por ano no sistema público de saúde ¹⁰.

As úlceras gástricas ocorrem devido a um desequilíbrio entre fatores protetores e agressores da mucosa gástrica, resultando em lesão nas camadas mucosa e muscular. Entre os fatores protetores estão a manutenção do muco e bicarbonato, prostaglandina E₂, óxido nítrico e fluxo sanguíneo adequado. Já os fatores agressores podem ser classificados como endógenos: ácido clorídrico e pepsina; ou exógenos: uso crônico e indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), tabagismo, etilismo e infecção por *Helicobacter pylori* ^{9,11}.

A úlcera gástrica se forma quando há ruptura da camada mucosa do estômago. Para que isso ocorra, há uma série de fatores envolvidos: diminuição da produção de muco e bicarbonato, que pode ser causada por suprimento sanguíneo insuficiente, infecção por *Helicobacter pylori* ou uso excessivo de AINEs. Os AINEs inibem a síntese de Prostaglandina E₂, que exerce papel fundamental na manutenção do muco. Com isso, a secreção ácida do estômago entra em contato com a muscular da mucosa, podendo causar perfuração do órgão em casos mais graves ^{12,13}.

É possível classificar as lesões gástricas em duas partes: base e margem da úlcera. A base da úlcera é a região necrótica, onde predomina tecido conjuntivo de granulação, que contém fibroblastos, macrófagos e proliferação de células endoteliais. Já a margem da úlcera, que é denominado tecido de regeneração, consiste em tecido epitelial em proliferação e expressa alta quantidade de receptores de fator de crescimento epidermal (EGF-R). Além disso, as células epiteliais do tecido de regeneração formam tubos de “linhagem celular associada à úlcera”, que invadem o tecido de granulação, migram para a superfície, ramificam-se e sofrem transformação em glândulas gástricas na cicatriz da úlcera ¹⁴.

Atualmente, o principal tratamento utilizado para úlceras gástricas envolve o uso de inibidores de secreção ácida, principalmente inibidores de bomba protônica e antagonistas de receptores histamínicos, porém o uso desses medicamentos é frequentemente acompanhado de reações adversas como dores abdominais, náusea, constipação e flatulência. O uso prolongado de inibidores de bomba de prótons também é associado a efeitos graves como danos hepáticos,

aumento do risco de desenvolvimento de câncer gástrico, fraturas ósseas e má absorção de nutrientes, o que limita o tempo de tratamento ^{9,15}. Sendo assim, nenhum dos medicamentos usados atualmente promovem reepitelização efetiva da lesão com formação de novos vasos para o suprimento sanguíneo adequado do tecido, o que acarreta em recidiva e agravamento das úlceras ¹⁶.

Cicatrização

Assim como a formação da úlcera gástrica, seu processo de cicatrização é multifatorial e complexo, e envolve reepitelização, restauração de glândulas, angiogênese e deposição de matriz extracelular. Esse conjunto de processos requer participação de várias vias moleculares que são coordenadas espacial e temporalmente (Figura 1) ¹⁴.

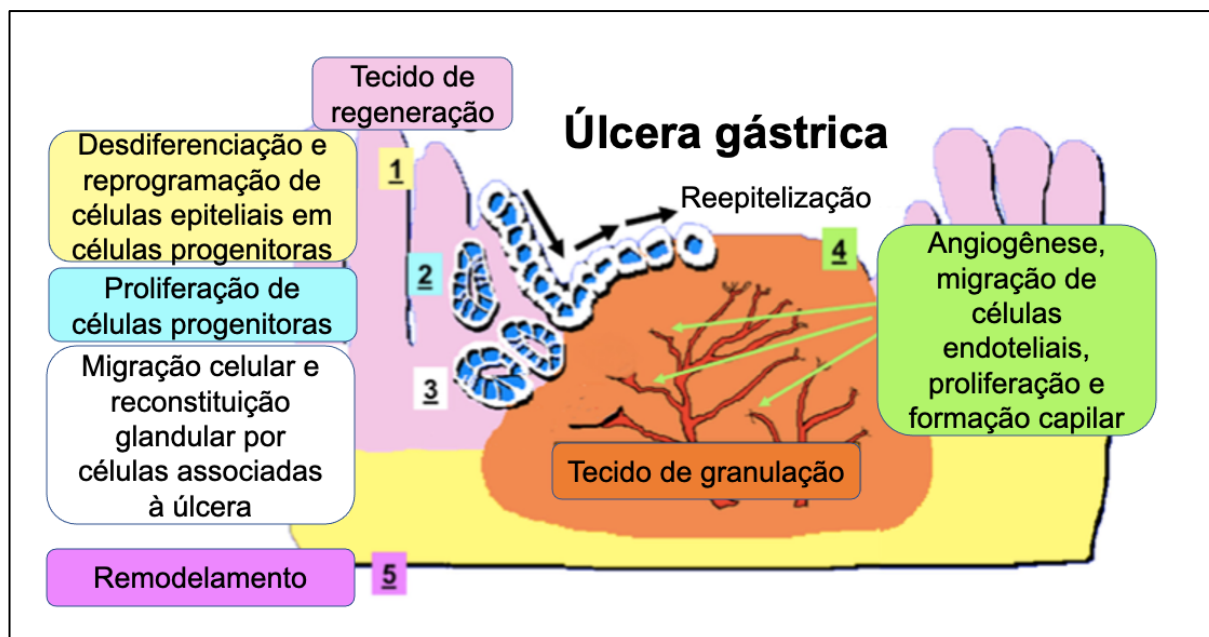


Figura 1 – Eventos da cicatrização da úlcera gástrica. Diagrama de representação de eventos da cicatrização: Migração e proliferação celular, reconstituição glandular e angiogênese ¹⁴.

Nos modelos animais utilizados para estudo da cicatrização de úlceras, podemos classificar a progressão da cicatrização em três fases: inicial, intermediária e tardia. Na fase inicial, durante o desenvolvimento da úlcera, há predominância de fatores inflamatórios indicado por células inflamatórias, aumento de COX-1 e COX-2, hipóxia, necrose tecidual e formação de tecido de granulação e margem da úlcera ¹⁷.

A partir da fase intermediária, a cicatrização é caracterizada pela migração de células epiteliais, reepitelização da úlcera e angiogênese da base da úlcera. Todas essas funções são dependentes de fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de

crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). E por último, na fase tardia, ocorre ativação do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) ^{14,17}.

É importante ressaltar que essas fases são sequenciais, porém podem se interpor entre si e a regulação da organização espacial e temporal destes eventos depende de sinalizações da matriz extracelular ¹⁷.

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura complexa multimolecular que compreende fibras de colágeno e elastina, glicoproteínas estruturais, incluindo fibronectina, laminina e mucopolissacarídeos. Em estado fisiológico, existe um equilíbrio entre síntese, depósito e degradação dos componentes da MEC e sua composição varia entre as estruturas multicelulares, sendo os fibroblastos e as células epiteliais os tipos celulares mais comuns ¹⁸.

As principais enzimas que participam da síntese e degradação da MEC são as metaloproteinases de matriz (MMPs), que são proteases dependentes de zinco e desempenham papel crucial na remodelação da MEC por meio de degradação proteolítica de seus componentes, ativação de proteínas da superfície celular e liberação de moléculas receptoras ligadas à membrana ¹⁹. As MMP-2 e a MMP-9 pertencem às gelatinases e são fundamentais no processo de cicatrização, pois desempenham papel de acelerar migração celular e reepitelização, respectivamente ^{19,20}.

Nas úlceras gástricas, a degradação da mucosa gástrica se relaciona diretamente com a degradação da matriz extracelular. As MMP-9 são secretadas principalmente por neutrófilos e macrófagos e atuam na fase inicial da cicatrização. Em pacientes com úlcera gástrica, foi detectado aumento da produção de MMP-9 na borda da lesão. Além disso, foi reportado que maior presença de MMP-9 no tecido da lesão está associada com o maior risco de recorrência das úlceras, sugerindo que a MMP-9 é um marcador de cicatrização de baixa qualidade ²¹. Já a MMP-2 é secretada principalmente por fibroblastos e leucócitos, sua atividade é considerada importante na fase inicial pois promove aceleração da migração celular. No entanto, na fase proliferativa, seu aumento está relacionado à fragilidade do tecido de regeneração ²².

Alguns processos patológicos como expansão do tecido adiposo também estão envolvidos nos fatores reguladores das enzimas proteolíticas ¹⁸. Foi constatado que em indivíduos com obesidade, há aumento dos níveis plasmáticos de MMP-2 e 9 ²³. Em estudos com animais alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) também foi possível verificar o aumento de MMP-9 no tecido adiposo visceral ¹⁸.

Citral

Os produtos naturais são excelentes fontes para prospecção de novos agentes farmacológicos, não apenas pela estrutura em si, mas também como moldes para modificação sintética, otimização da seletividade e biodisponibilidade ²⁴.

O citral é um composto de origem vegetal encontrado em espécies conhecidas como: Capim limão (*Cymbopogon citratus* e *C. flexuosus*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), gengibre (*Zingiber officinale*), entre outras. É amplamente usado pelas indústrias alimentícia, cosmética, química e farmacêutica, sendo incorporado a fragrâncias, alimentos e bebidas ²⁵.

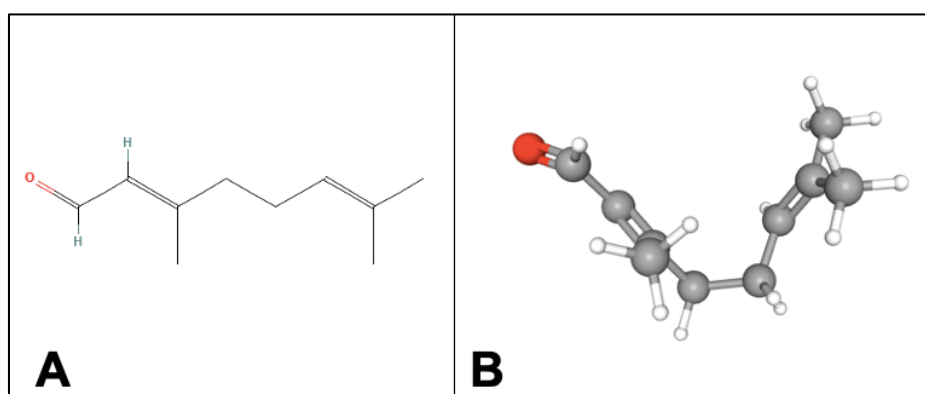


Figura 2 - Estrutura da molécula de Citral. Estrutura molecular do citral em 2D (A) e 3D (B)²⁶.

Quimicamente, o citral é classificado como monoterpeneo acíclico, que é uma mistura de dois isômeros: neral isômero cis e geranial isômetro trans (Figura 2) ²⁷. É um composto lipofílico, altamente volátil, pouco solúvel em água e meios biológicos e instável sob irradiação luminosa. A baixa biodisponibilidade do citral na administração *in vivo* limita seu uso como produto natural puro porém essa limitação pode ser contornada por meio de sistemas de entrega específicos, para aumentar suas propriedades de distribuição e atividade ²⁵. Apesar dessas limitações, já foram caracterizadas ações anti-inflamatória, antipirética, antimicrobiana, antiadipogênica, entre outras do citral ²⁵.

Os monoterpenos têm sido explorados farmacologicamente por suas ações anti-inflamatória, antioxidante e antibiótica. Além disso, nas úlceras gástricas, os monoterpenos mostraram atividade desde prevenção de lesões até aceleração do processo de cicatrização ²⁸.

Em trabalhos conduzidos anteriormente pelo nosso grupo, o citral promoveu gastroproteção no modelo de lesão gástrica induzida por AINE, porém, o efeito do citral na cicatrização de úlceras gástricas em associação com o quadro de obesidade ainda não era conhecido ²⁷.

Capítulo I

A ingestão de HFD altera a interação entre matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento na cicatrização de úlceras gástricas?

Apesar de todas as alterações sistêmicas decorrentes do quadro de obesidade que são descritas na literatura, ainda não existe evidência de associação entre o quadro de obesidade e suas implicações sobre a cicatrização de úlceras gástricas. A hipótese do presente estudo é que o tipo de dieta ingerido afeta diretamente na dinâmica dos fatores envolvidos no processo de cicatrização. Portanto, o objetivo deste estudo é caracterizar macroscopicamente as lesões gástricas nos animais que receberam dietas diferentes, bem como estabelecer o perfil de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e elementos da matriz extracelular ao longo do processo de cicatrização.

Metodologia

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos ($n = 10$) com 4 a 6 semanas de idade provenientes do Centro de Pesquisa e Produção Animal do Instituto de Biotecnologia da UNESP, Botucatu/SP. Os animais foram aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura controlada entre 23 e 25°C e ciclo claro-escuro de 12 horas e foram alimentados com ração comercial Presence® ou ração hiperlipídica e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais aprovados previamente, pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu sob o número 1100.

Indução de obesidade por dieta hiperlipídica

Para indução de obesidade, os animais foram separados em dois grupos. O primeiro recebeu dieta padrão (Presence®, Jaguaribara, CE) e o segundo, dieta hiperlipídica (PragSoluções Biociências, Jaú, SP). A dieta hiperlipídica possui 60% das calorias provenientes de lipídeos, enquanto a dieta padrão possui 16% (Tabela 1). Os animais receberam essas dietas durante 12 semanas (84 dias) e seus pesos foram aferidos duas vezes por semana ²⁹. Para o cálculo do índice de adiposidade, foram somadas as massas dos tecidos adiposos abdominal, epididimal e retroperitoneal (TAA, TAE e TAR) e o valor total foi dividido pela massa do animal (g).

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

Indução de lesão gástrica por ácido acético

Para indução da lesão, os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoforine® Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP) no sistema de anestesia inalatória de baixo fluxo (Bonther, Ribeirão Preto, SP). A taxa de indução utilizada foi de 2% e taxa de manutenção, 2,5 à 3%³⁰. Anestesiados, os animais foram laparatomizados e o estômago foi exposto para administração de 25 uL ácido acético 80% via tópica. A área de contato com o ácido acético foi delimitada por um anel plástico de 3,75 mm de diâmetro. Após 20 segundos de exposição, o ácido acético foi removido e o estômago foi lavado com solução NaCl 0,9% para remoção de qualquer resíduo. Finalizada a instalação da lesão, os animais foram suturados e devolvidos para suas respectivas caixas³¹. Para avaliar as diferentes fases da cicatrização, os animais foram divididos em 5 grupos, que foram eutanasiados após 1, 3, 7, 10 e 14 dias após a indução da lesão (Figura 3). Por se tratar de um protocolo que envolve procedimento cirúrgico, há uma perda considerável de animais durante e após a cirurgia até a finalização do experimento. Nesse experimento a perda foi de aproximadamente 25% dos animais.

Componente	Dieta padrão (SD)		Dieta hiperlipídica (HFD)	
	g/kg	kcal/kg	g/kg	kcal/kg
Amido de milho (q.s.p.)	397,5	1590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Maltodextrina	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	321	2808
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix de minerais	35	-	35	-
Mix de vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

Tabela 1 - Composição das dietas padrão (SD) e hiperlipídica (HFD).

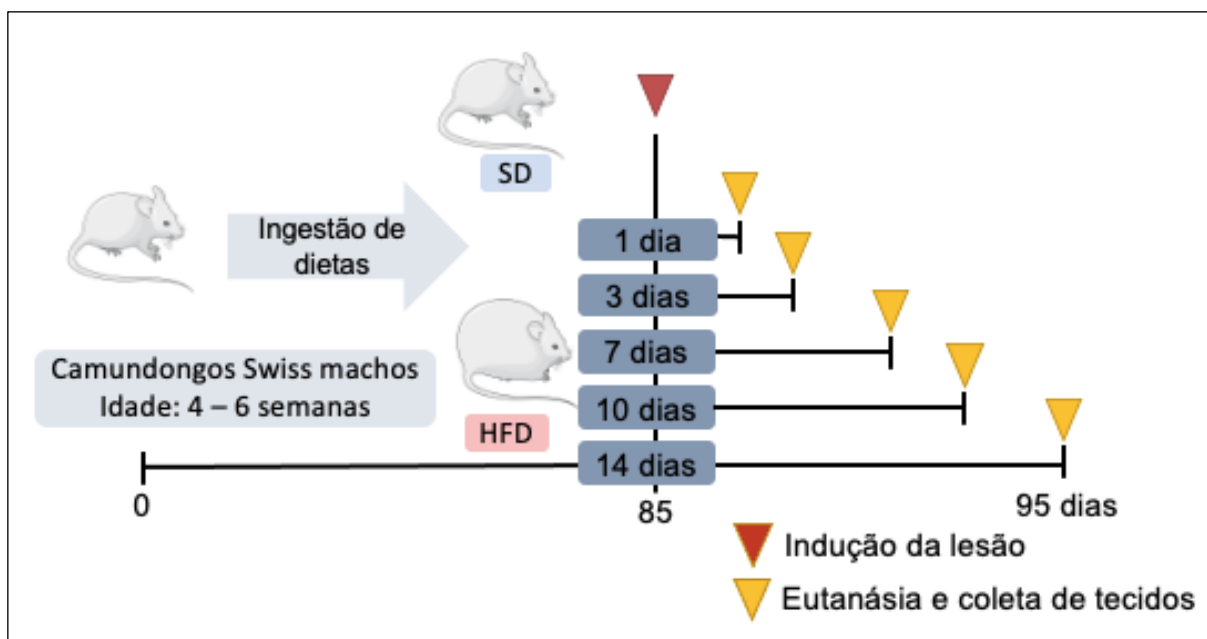


Figura 3 - Linha do tempo de indução de obesidade e indução de lesão de cada grupo. Desenho experimental para caracterização do perfil de cicatrização de úlceras gástricas em camundongos machos Swiss obesos e eutróficos (n=10).

Análise macroscópica

Para análise da área de lesão (mm^2), foi levada em consideração a metodologia adotada por Xing et al. (2020) na identificação de estruturas das úlceras ⁹. Modificações foram realizadas a essa metodologia para que fossem avaliados os aspectos macroscópicos, de acordo com a seguinte classificação: a úlcera foi considerada como a parte de menor espessura envolta pelo tecido de regeneração (Figura 4). O tecido protuberante ao redor da úlcera foi classificado como tecido de regeneração. A quantificação foi realizada no software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

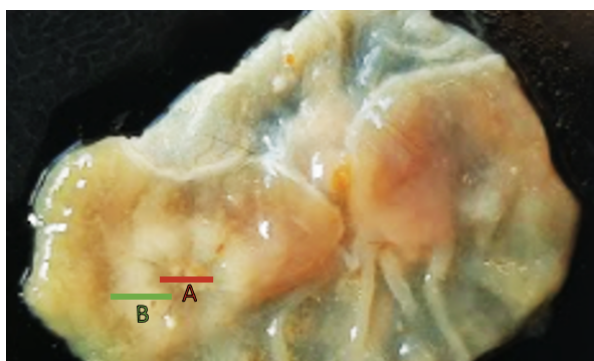


Figura 4 - Classificação das estruturas da lesão gástrica. A) Úlcera (linha vermelha). B) Margem ou tecido de regeneração (linha verde).

Análise zimográfica

O tecido da lesão foi separado e homogeneizado com tampão de extração (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0,2 M, Triton-X 100 0,1%, CaCl₂ 10 mM e coquetel inibidor de protease 1%). Os homogenatos (5 µL, contendo 0,5µg de proteína total por µL) foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 8% contendo 1 mg/mL de gelatina (Sigma St. Louis, MO, EUA), sob condições não redutoras. Os géis foram lavados duas vezes em 2,5% de Triton-X-100 (Sigma St. Louis, MO, EUA) e, em seguida, incubados em tampão de ensaio de cálcio (Tris e HCl 40 mM, pH 7,4, 0,2 M de NaCl, 10 mM CaCl₂) durante 18h a 37°C. Os géis foram corados com 0,1% de azul de Coomassie (Sigma St. Louis, MO, EUA) seguido de descoloração. As zonas de atividade gelatinolítica serviram como coloração negativa. A quantificação das bandas zimográficas (DOI) foi feita por meio da densitometria óptica ligada ao software ImageJ

32.

Quantificação de IL-1β, TNF-α, EGF, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, HGF e FGF-2

As concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e TNF-α) e fatores de crescimento (EGF; VEGF-A, C e D; HGF e FGF-2) na lesão foram determinadas por imunoensaio multiplex Luminex® (Milliplex Multiplex Assays Luminex xMAP, Merck, Darmstadt, Alemanha) com kit Multiplex MAGPMAG-24K, Magnetic Luminex Assay, Kit Multi-Analyte pré-misturado para camundongos, Merck, Darmstadt, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média ± erro padrão médio (e.p.m) dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos de t de Student para comparação entre dois grupos; Bonferroni para comparação entre animais que receberam dietas diferentes pertencentes ao mesmo grupo de dias pós indução e teste de Tukey para verificar a evolução temporal dentro do grupo que recebeu a mesma dieta. Para todas as análises, foi considerado o valor mínimo de $p < 0,05$ para determinar significância.

Resultados

Evolução da massa corporal e índice de adiposidade

Ao longo de 12 semanas (84 dias), a massa corporal de cada animal foi mensurada duas vezes por semana. Na figura 5, podemos observar que a partir da segunda semana foi possível observar aumento de 12,5% ($p < 0,01$) da massa dos animais alimentados com HFD. E ao final

do período de indução, houve um aumento de 20,8% ($p < 0,0001$) na massa corporal dos animais que receberam HFD em comparação aos que se alimentaram com SD, esses resultados demonstram que a ingestão de HFD gera um aumento significativo da massa corporal dos animais em relação aos animais alimentados com SD. Além do aumento da massa corporal, a ingestão da HFD também aumentou 2,2x o índice de adiposidade desses animais (figura 6). Esses resultados demonstram que o período de 12 semanas de ingestão de diferentes dietas foi capaz de produzir alterações de massa corporal e índice de adiposidade entre animais que receberam dietas diferentes.

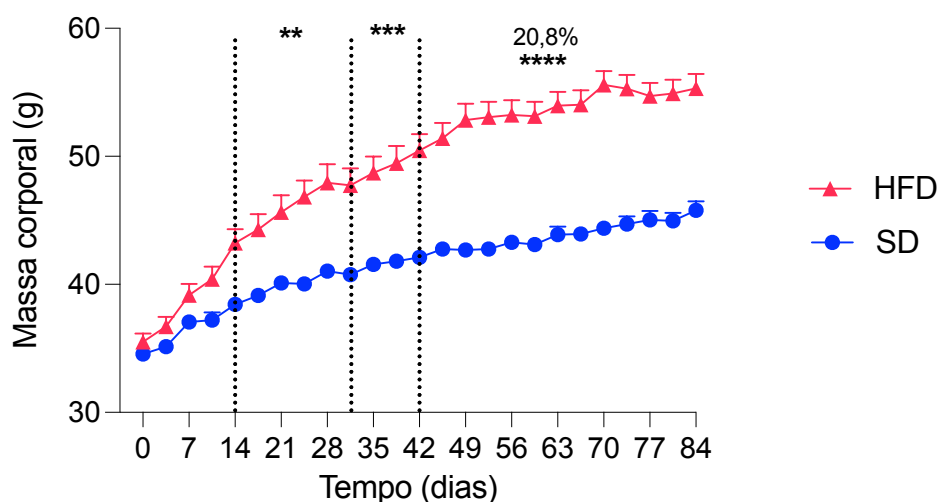


Figura 5 - Evolução da massa corporal ao longo da indução de obesidade. Comparação da evolução da massa corporal entre animais alimentados com dieta padrão (SD) e dieta hiperlipídica (HFD) ao longo do período de indução de obesidade. Os resultados estão expressos na forma de média ($n = 45-47$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, sendo $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ e $****p < 0,0001$.

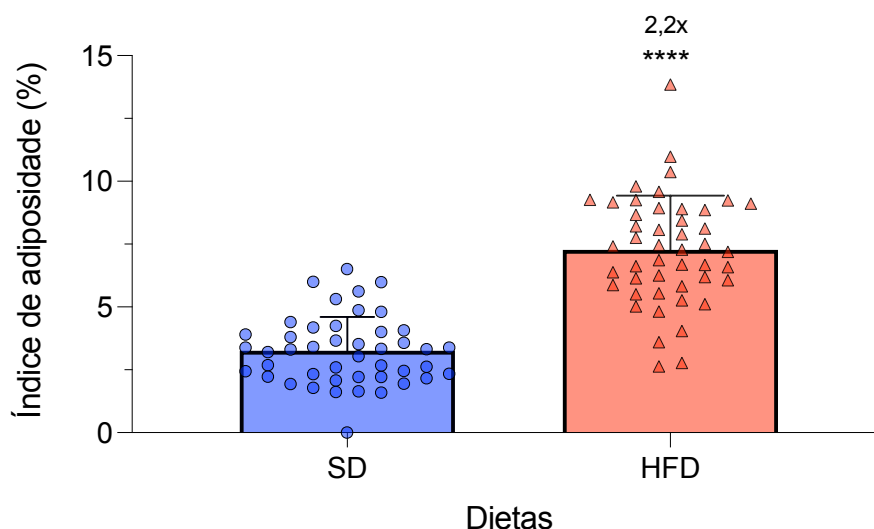


Figura 6 - Índice de adiposidade. Comparação do índice de adiposidade entre animais alimentados com dieta padrão (SD) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ e.p.m ($n = 45-47$) e a significância estatística foi determinada pelo teste t de Student, sendo **** $p < 0,0001$.

Análise morfológica dos estômagos

Área total do estômago

Na figura 7 podemos observar que após o primeiro dia de indução de lesão, os animais que receberam HFD apresentaram área total do estômago 20,3% ($p < 0,05$) menor em relação aos animais que receberam SD. Também podemos observar que apenas no grupo alimentado com SD, a área total do estômago apresenta reduções na fase tardia da cicatrização: 28,6 e 34,7% ($p < 0,01$) de diminuição em relação ao primeiro dia após a indução da lesão.

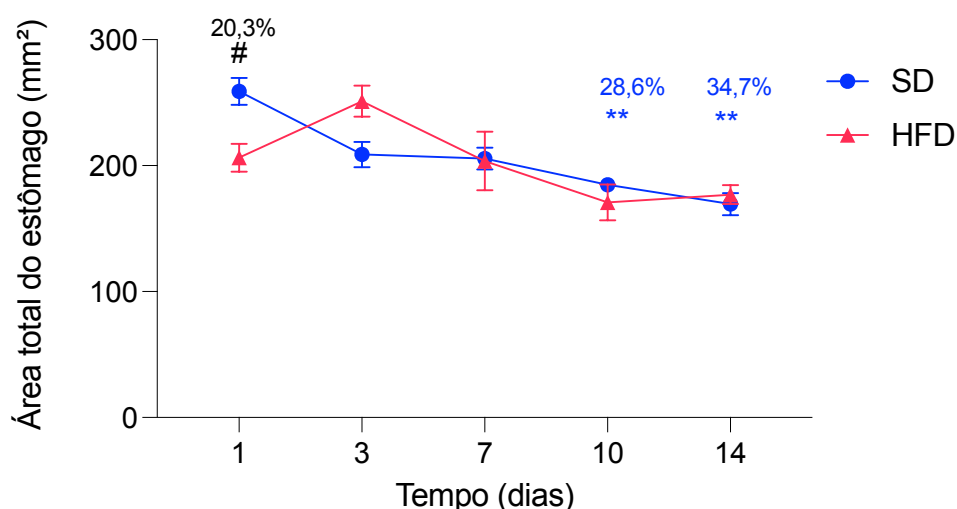


Figura 7 - Área total do estômago. Comparação da evolução da área total do estômago entre camundongos eutróficos e obesos ao longo de 14 dias. Os resultados estão expressos na forma

de média $\pm$ e.p.m ($n = 5$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey, sendo $**p < 0,01$ na comparação do mesmo grupo em relação ao primeiro dia pós indução da lesão, e teste de Bonferroni, sendo $\#p < 0,05$ para comparação entre animais que receberam dietas diferentes no mesmo período pós indução da lesão.

Área da úlcera

Ao analisar a progressão da área de lesão ao longo do tempo, não observamos diferença entre as áreas da úlcera de animais alimentados com SD e HFD em cada um dos períodos avaliados, porém verificamos que a partir do terceiro dia, houve redução significativa de 57,4% da área de lesão em relação ao primeiro dia pós indução da lesão no grupo alimentado com SD. Já no grupo alimentado com HFD, a redução foi significativamente evidenciada somente a partir do décimo dia pós indução da lesão (56,3%, $p < 0,05$). No último dia avaliado (14º dia), a redução em relação ao primeiro dia foi de 75,1% da área da úlcera no grupo alimentado com SD, e 59,8% no grupo alimentado com HFD (Figura 8).

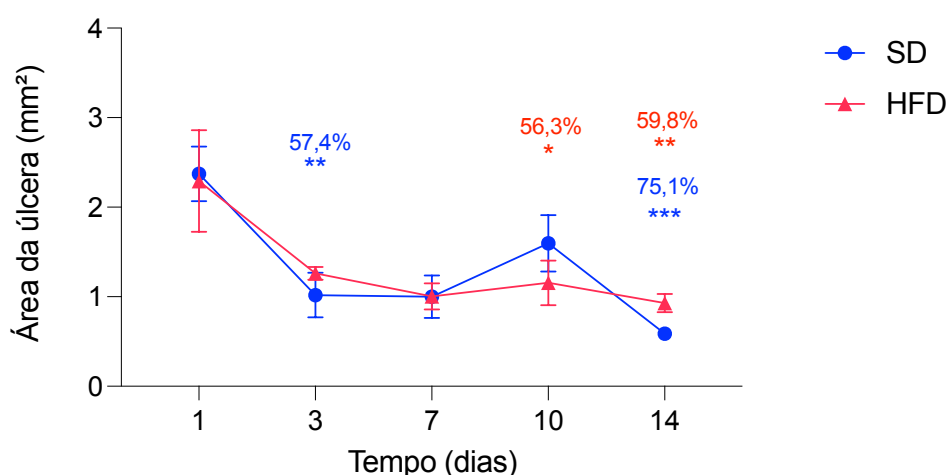


Figura 8 - Área da úlcera em diferentes períodos após indução da lesão. Comparação da evolução da área de lesão entre camundongos eutróficos e obesos ao longo de 14 dias. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ e.p.m ($n = 5$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey, sendo $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ para comparação em relação ao primeiro dia pós indução da lesão.

Área do tecido de regeneração

Na figura 9 podemos observar que a evolução do tecido de regeneração ocorre em intensidades diferentes ao longo do tempo entre os grupos SD e HFD. Apesar de não haver diferença entre os grupos SD e HFD dentro de cada período avaliado, podemos observar um pico da área do tecido de regeneração no sétimo dia pós indução da lesão, em que o grupo SD

apresenta aumento significativo de 67,9% da área do tecido de regeneração em relação ao primeiro dia, enquanto no grupo HFD, não houve aumento significativo desse tecido ao longo do período avaliado.

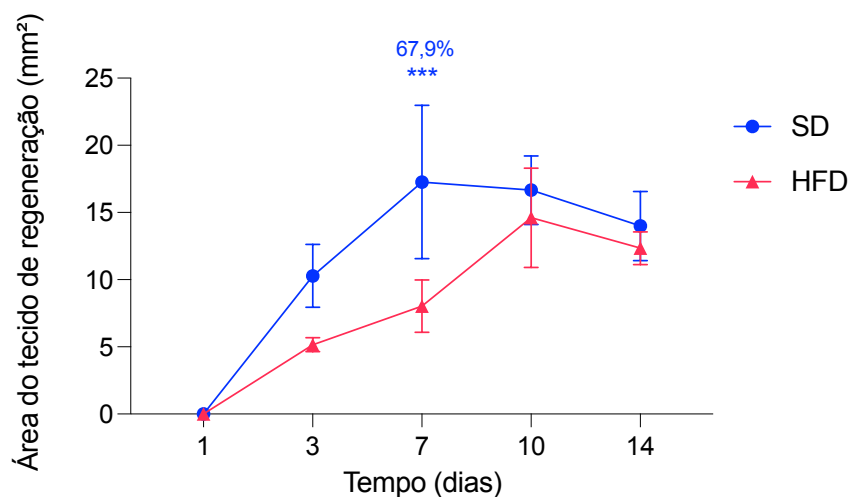


Figura 9 - Área do tecido de regeneração. Comparação da evolução da área do tecido de regeneração de lesão entre camundongos eutróficos e obesos ao longo de 14 dias. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ e.p.m ($n = 5$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey, sendo *** $p < 0,001$ para comparação em relação ao primeiro dia pós indução da lesão.

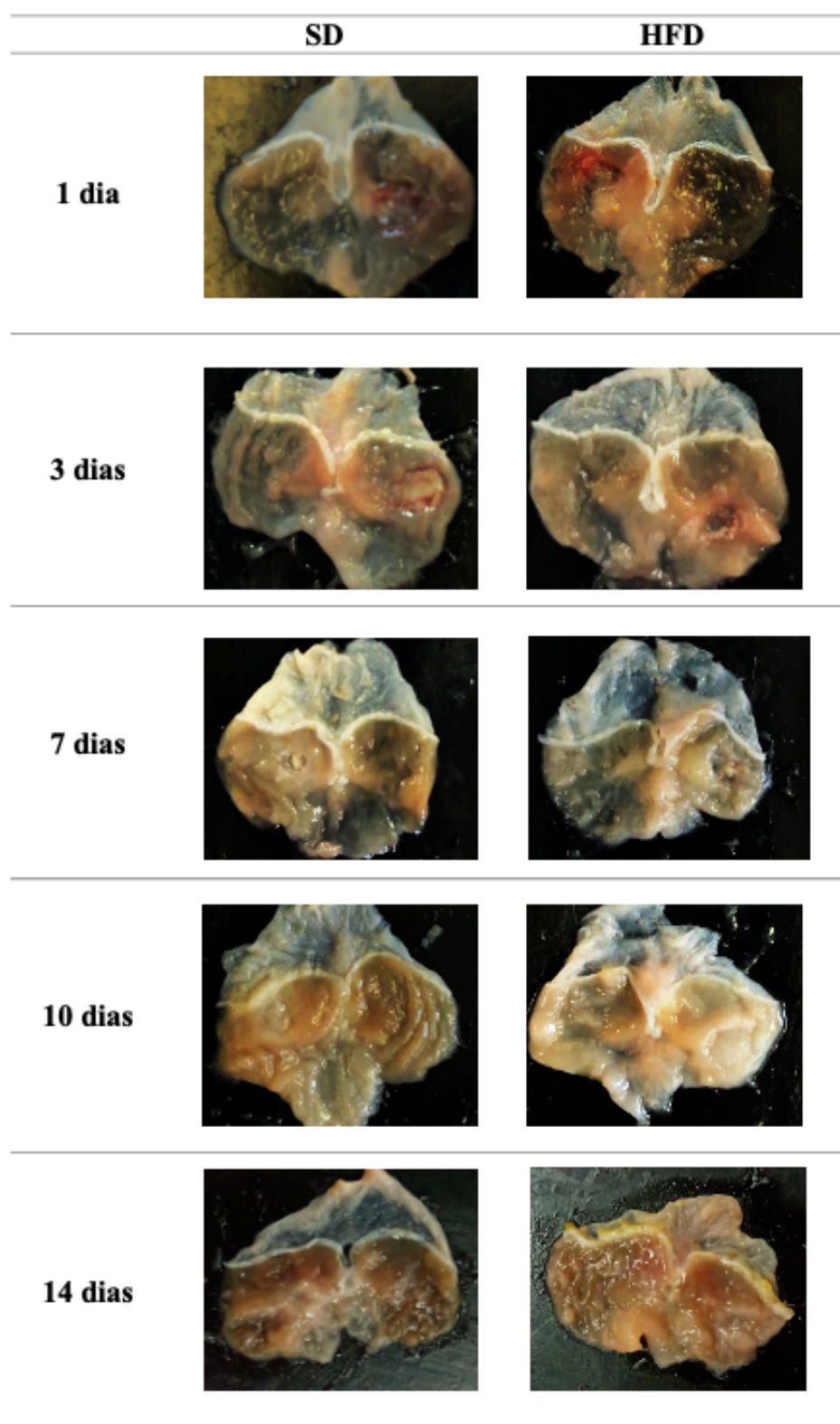


Figura 10 – Estômagos de animais alimentados com SD e HFD. Imagens macroscópicas dos estômagos de camundongos com lesão induzida por ácido acético após 1, 3, 7, 10 e 14 dias de cicatrização.

Quantificação de citocinas pró-inflamatórias

A fase inicial da cicatrização é caracterizada pela predominância de fatores inflamatórios, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α agem principalmente na fase inicial deste processo. Na figura 11 podemos observar a variação desses fatores ao longo do tempo. Ao comparar as concentrações de IL-1 β e TNF- α em cada período, não observamos diferença significativa entre os grupos SD e HFD, porém no grupo alimentado com SD, a IL-1 β apresentou diminuição significativa de 82,3% no décimo quarto dia pós indução da lesão quando comparamos às lesões de 1 dia. Já no grupo alimentado com HFD, a concentração de IL-1 β não variou significativamente nas lesões de animais do grupo HFD (Figura 11-A). O TNF- α apresenta perfis semelhantes tanto em animais alimentados com SD, quanto em animais alimentados com HFD, diminuindo ao longo da cicatrização (Figura 11-B).

Atividade das metaloproteinases de matriz

Na figura 12- A, podemos ver que a atividade de MMP-2 na lesão não foi alterada ao longo do período avaliado de acordo com as diferentes dietas recebidas. Por outro lado, ao avaliar a atividade de MMP-9, constatamos que no sétimo dia pós indução da lesão, houve redução de 52,5% da atividade de MMP-9 no grupo HFD em relação ao grupo SD (Figura 12-B). No sétimo dia após a indução da lesão, as lesões gástricas do grupo alimentado com SD apresentaram aumento de 97,4% da atividade de MMP-9, porém esse aumento não se manteve ao longo dos outros períodos avaliados. Os animais alimentados com HFD não apresentaram variação de MMP-9 ao longo da cicatrização.

Quantificação de fatores de crescimento

Durante a cicatrização, os fenômenos de proliferação, migração e diferenciação celular dependem intimamente de fatores de crescimento. Entre esses fatores, foram quantificados o fator de crescimento endotelial vascular A C e D (VEGF-A, C e D); fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento epidermal (EGF) (Figura 13). No primeiro dia após a indução da lesão, as lesões de animais alimentados com HFD apresentam redução de 51% de VEGF-A e 67,6% de EGF em relação ao grupo SD. A partir do terceiro dia, os níveis de VEGF-A se equiparam para os dois grupos de animais, porém a concentração de EGF nos tecidos de animais que receberam diferentes dietas se comportam de formas distintas: ocorre um aumento de 3,8x no grupo HFD e redução de 60,2% da concentração de EGF em relação ao primeiro dia após indução da lesão. A partir do período de 3 dias também observamos que o grupo HFD

apresenta concentração de VEGF-D 71% menor em relação ao grupo SD e essa diferença se manteve na avaliação do período de 7 dias após a indução da lesão. Após 7 dias da implantação da lesão gástrica, também observamos aumento de 28,5% de fator de crescimento de hepatócito nas lesões de animais alimentados com HFD em relação ao grupo SD. A partir do décimo dia após a indução da lesão, as diferenças entre os grupos alimentados com as dietas não se mantiveram. Também foi quantificado fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-2), porém não foi possível comparar os valores pois todas as amostras continham concentrações acima do limite de detecção da técnica utilizada.

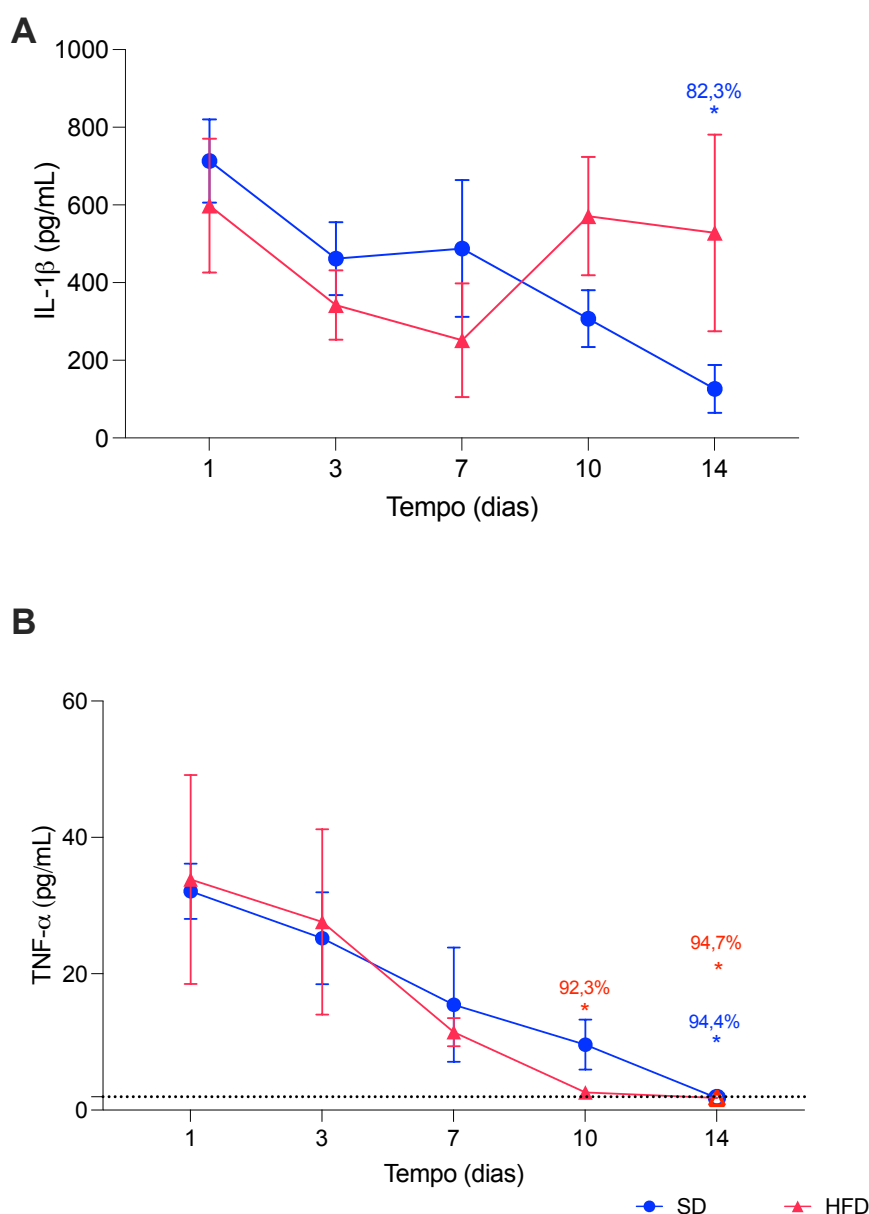


Figura 11 – Quantificação de IL-1 β e TNF- α . Comparação da evolução da atividade de **A)** IL-1 β e **B)** TNF- α na lesão de camundongos eutróficos e obesos ao longo de 14 dias. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ e.p.m (n = 5), a linha pontilhada representa o limite de detecção da técnica e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias

seguida pelo teste de Tukey, sendo $*p < 0,05$ para comparação em relação ao primeiro dia pós indução da lesão.

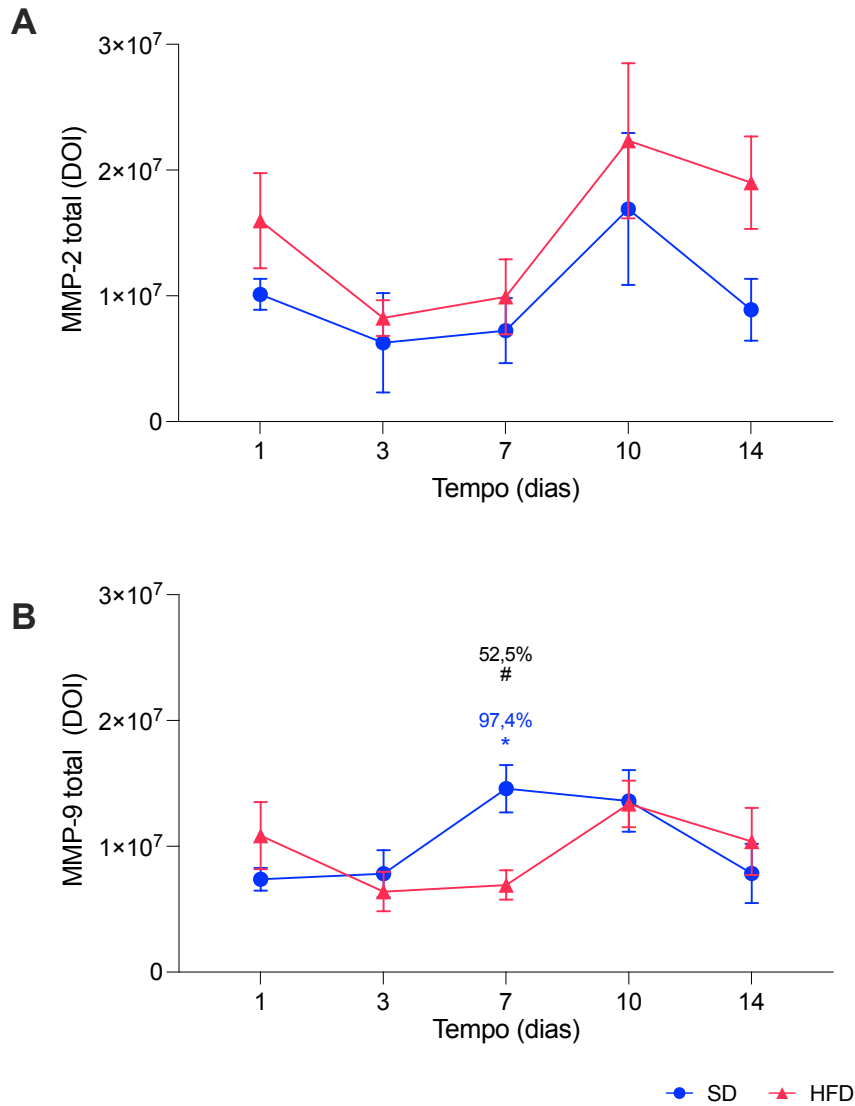


Figura 12 – Atividade das MMP-2 e 9. Comparação da evolução da atividade de MMP-2 e 9 na lesão de camundongos eutróficos e obesos ao longo de 14 dias. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ e.p.m ($n = 5-6$) e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey, sendo $*p < 0,05$ para comparação em relação ao primeiro dia pós indução da lesão e Bonferroni, sendo $\#p < 0,05$ entre animais que receberam dietas diferentes no mesmo período pós indução da lesão.

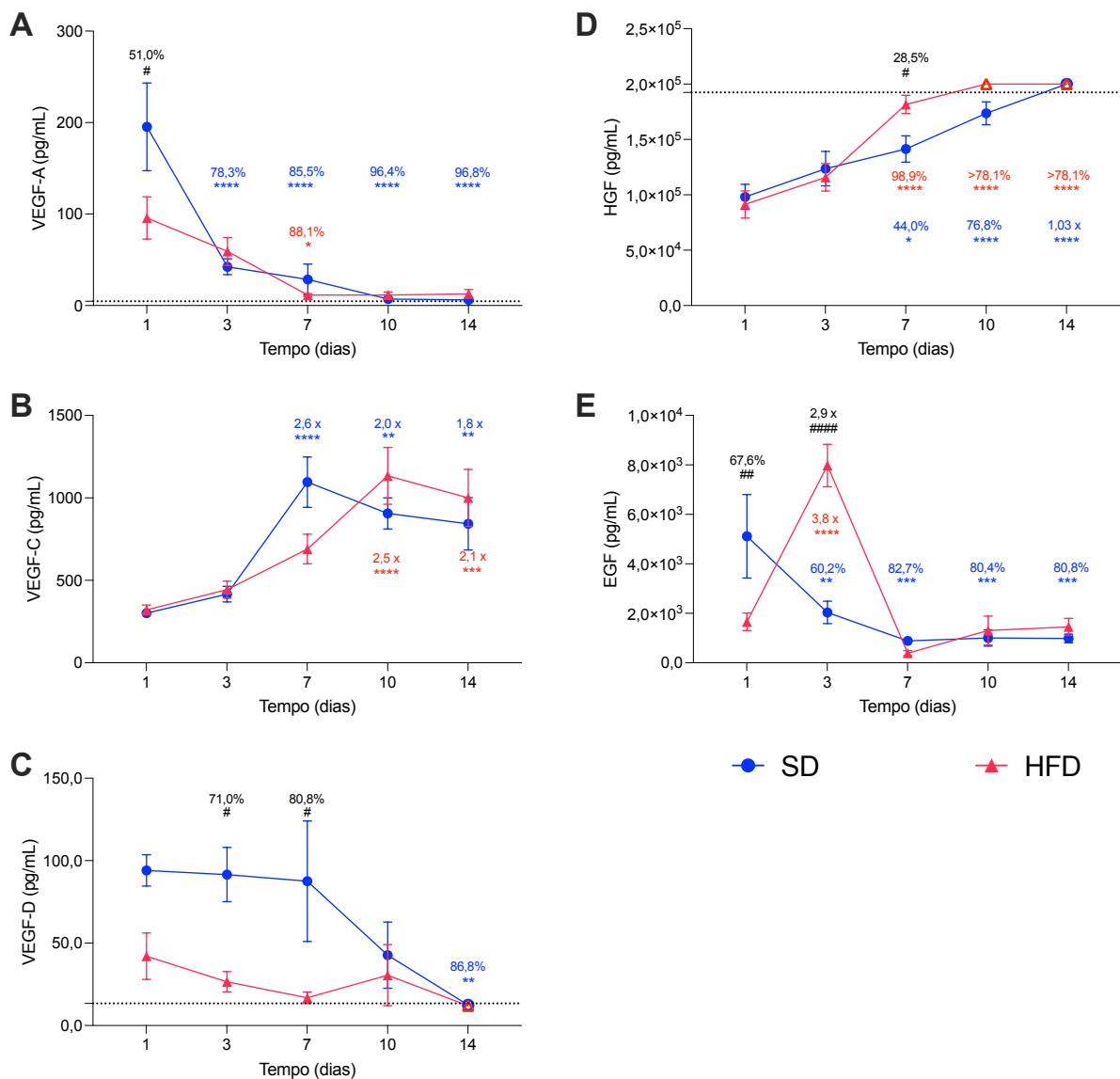


Figura 13 – Quantificação de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, EGF e HGF na lesão de camundongos eutróficos e obesos ao longo de 14 dias. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ e.p.m (n = 5), a linha pontilhada representa o limite de detecção da técnica e a significância estatística foi determinada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ para comparação em relação ao primeiro dia pós indução da lesão e Bonferroni, sendo # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e #### $p < 0,001$ entre animais que receberam dietas diferentes no mesmo período pós indução da lesão.

Discussão

A obesidade está associada ao aumento da inflamação sistêmica crônica, alterações na composição da microbiota intestinal, e ruptura do funcionamento normal da barreira epitelial na mucosa gastrointestinal ³³. Alguns estudos foram realizados buscando estabelecer uma relação entre úlceras gástricas e obesidade, porém os diferentes estudos mostram resultados que não permitem afirmar que existe uma relação direta entre essas duas doenças ^{7, 34, 35}. Por se

tratar de duas doenças multifatoriais, existe uma limitação de isolamento de fatores para se estabelecer relação entre eles em estudos clínicos. Entretanto, podemos observar que há mediadores de todas as fases do processo de cicatrização que tem sua função alterada nos indivíduos com obesidade em relação a indivíduos eutróficos, como por exemplo: aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com obesidade ⁴ e alteração no perfil de expressão de metaloproteinases de matriz tanto no tecido adiposo como no soro desses pacientes ^{23, 36}. Portanto, o presente estudo foi desenvolvido partindo da hipótese que a cicatrização de úlceras gástricas apresenta perfis diferentes em grupos que se alimentam de formas distintas. Nos estudos para investigação de síndrome metabólica e obesidade, é recomendado o uso de camundongos C57Bl/6, pois estes possuem maior propensão ao desenvolvimento de comorbidades em resposta à ingestão de dieta hiperlipídica ³⁷. Para o presente estudo, a utilização de camundongos da linhagem Swiss possibilitou a investigação isolada da associação entre o tipo de dieta ingerida e suas implicações no processo de cicatrização de úlceras gástricas.

Com os resultados obtidos neste estudo, observamos que ao final do período de 12 semanas de ingestão de HFD, os animais deste grupo apresentaram aumento da massa corporal, bem como do índice de adiposidade (Figuras 5 e 6), o que inclui o aumento de tecido adiposo abdominal, mimetizando desta forma as alterações necessárias para o estudo da relação entre diferentes dietas e cicatrização. O acúmulo de tecido adiposo abdominal gera aumento da pressão intragástrica, alterando a motilidade gastrointestinal em pacientes com obesidade ⁵. Além disso, já foi constatado que camundongos alimentados com HFD durante 12 semanas apresentam acúmulo gordura ectópica no citosol do epitélio na fossa gástrica e leve acúmulo no epitélio glandular na cárdia ³⁸.

No modelo experimental utilizado, foi possível classificar as partes da úlcera macroscopicamente, conforme a classificação mostrada na figura 4. A área da úlcera corresponde à região central da lesão que possui tecido de menor espessura e está na fase inflamatória, e a literatura descreve que nessa área há maior quantidade de neutrófilos e macrófagos ¹⁷. Ao analisar a progressão da área de lesão ao longo do tempo, verificamos que no grupo alimentado com SD, a redução da área foi significativamente maior a partir do terceiro dia em relação ao primeiro dia. Já no grupo HFD, apenas no décimo dia foi possível observar redução significativa da área de lesão em comparação ao primeiro dia após indução. Este resultado mostra que o grupo HFD demanda mais tempo para diminuir a área de lesão em relação ao grupo SD.

Para avaliar se a inflamação crônica de baixo grau causada pela ingestão de HFD afeta o processo de cicatrização, quantificamos no local da lesão, a IL-1 β e o TNF- α , citocinas que caracterizam inflamação crônica de baixo grau e são utilizadas como marcadores em modelos experimentais de obesidade ⁴. As lesões gástricas de animais que receberam diferentes dietas não apresentaram diferença nos níveis TNF- α ao longo do período avaliado. Por outro lado, a IL-1 β apresentou diferentes perfis nos grupos SD e HFD. No grupo SD, os níveis de IL-1 β diminuíram progressivamente ao longo do tempo, e no grupo de animais alimentados com HFD, os níveis da citocina IL-1 β aumentaram, a partir do décimo dia após a instalação da lesão. A IL-1 β é um marcador de inflamação aguda, que tende a diminuir no decorrer da evolução do processo de cicatrização das lesões gástricas, como ocorreu no grupo SD. Portanto, a partir deste resultado podemos concluir que a ingestão de HFD prejudica o processo de cicatrização mantendo elevados os níveis de IL-1 β ainda na fase tardia da cicatrização. Alguns estudos mostram que a presença de IL-1 β dificulta a cicatrização e contribui para a cronicidade da lesão, e isso ocorre devido a inibição das TIMPs, que são inibidores de metaloproteinases de matriz, aumentando desta forma a degradação de matriz extracelular ^{39,40}.

Ao redor da área da úlcera gástrica, forma-se o tecido de regeneração, onde as glândulas gástricas dilatam, células parietais são reprogramadas para células progenitoras e estão em intensa proliferação. Durante o período entre dois e três dias após a formação da úlcera ocorre essa desdiferenciação que é crucial para migração e reepitelização da úlcera ¹⁴.

O tecido conjuntivo cicatricial é rico em matriz extracelular ⁴¹, portanto, neste trabalho foram quantificadas as atividades das gelatinases (MMP-2 e 9) nas lesões por zimografia, que em conjunto com outros fatores, desempenham papel fundamental na deposição e degradação de matriz extracelular. Assim como a dinâmica dos fatores de crescimento, as MMPs desempenham papéis diferentes ao longo das diferentes fases da cicatrização ²⁰. As metaloproteinases de matriz 2 são secretadas principalmente por leucócitos e fibroblastos e atuam migração celular ²². Na figura 11-A podemos ver que a atividade de MMP-2 não foi diferente entre animais alimentados com HFD e SD. Entretanto, ao avaliar a atividade de MMP-9, o grupo alimentado com HFD apresentou redução de atividade de MMP-9 em relação ao grupo SD na fase intermediária de cicatrização (Figura 11-B). A MMP-9 é secretada principalmente por neutrófilos e macrófagos, portanto, sua atividade está relacionada à fase inflamatória da cicatrização e é mais intensa na fase inicial da cicatrização. Estudos mostraram presença de MMP-9 na borda da lesão, o que é crucial para que haja proliferação das células do tecido de regeneração. Porém, em lesões crônicas, a presença de MMP-9 na fase tardia da lesão

está associada a uma cicatrização de baixa qualidade e ao risco de recorrência da úlcera ²¹. Em nosso estudo, vimos que o pico da atividade de MMP-9 ocorre no sétimo dia de cicatrização nos animais que receberam SD, porém, ao final do período analisado, sua atividade diminui. Já no grupo HFD, esse pico ocorre no décimo dia de cicatrização. Portanto, observando a progressão do tecido de regeneração e a atividade da MMP-9, podemos concluir que a diminuição de sua atividade causada pela ingestão de HFD diminui a velocidade de progressão do tecido de regeneração. Os estudos realizados até o momento ainda não estabelecem uma relação clara entre a atividade de MMP-9 e obesidade, porém sabemos que as alterações metabólicas e inflamatórias decorrentes da obesidade interferem na atividade dos componentes da matriz extracelular ³⁶. Os resultados das análises morfológicas da lesão e da atividade enzimática das gelatinases indicam que a inflamação de baixo grau decorrente do quadro de obesidade somado às alterações da produção de metaloproteinases de matriz refletem na dinâmica dos fatores envolvidos na cicatrização.

O remodelamento tecidual também é modulado pelos fatores de crescimento liberados no local da lesão, que permitem a proliferação e migração celular, além de promover vascularização do tecido de regeneração ¹⁴. Neste trabalho foi possível quantificar VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, EGF e HGF.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é descrito em estudos de cicatrização de lesão gástrica pois está envolvido na proliferação celular, angiogênese e formação de tubos microvasculares, desempenhando papel crucial durante a cicatrização da úlcera ¹⁷. Nesses estudos, o principal subtipo investigado é o VEGF-A, que age em receptores VEGFR1 e VEGFR2 e promove reconstituição de vasos sanguíneos. O VEGF-C e D agem majoritariamente porém não exclusivamente na reconstituição de vasos linfáticos ⁴².

Neste estudo quantificamos o VEGF-A, C e D e verificamos que eles possuem diferentes perfis ao longo da cicatrização. Na figura 13 podemos observar que tanto o VEGF-A como o VEGF-D diminuem ao longo do tempo de cicatrização, enquanto o VEGF-C aumenta.

O VEGF-A é liberado em situações de hipóxia e em resposta a processos inflamatórios. Em um estudo realizado em córneas, o VEGF-A demonstrou um papel importante na indução da neovascularização relacionada à resposta inflamatória ⁴³. No presente estudo, o pico de atividade do VEGF-A ocorreu no primeiro dia de cicatrização nos dois grupos, porém se mostrou diminuído nas lesões gástricas de animais alimentados com HFD em relação aos animais que receberam SD. No primeiro dia após a indução da lesão, não há diferença significativa na presença de mediadores inflamatórios nas lesões, portanto, é possível afirmar

que a no grupo alimentado com HFD, o tecido é menos responsivo no sentido de liberar VEGF-A, podendo desta forma prejudicar a neovascularização na recuperação dessas lesões.

A principal atividade descrita do VEGF-C é a formação de novos vasos linfáticos e indução de permeabilidade vascular ⁴⁴. Um estudo clínico realizado com pacientes com úlceras gástricas associou a presença de VEGF-C ao agravamento, cronicidade da lesão e ao desenvolvimento de câncer gástrico ⁴⁵. Neste estudo, vimos que o pico de VEGF-C ocorre no sétimo dia de cicatrização para os animais do grupo SD e no décimo dia no grupo HFD, considerando que sua presença seja prejudicial na fase tardia da lesão, podemos afirmar que a ingestão de HFD também retarda a diminuição desse fator.

O VEGF-D ativa receptores VEGFR2 e VEGF3, aumenta atividade de metaloproteinases de matriz ⁴⁶ e já foi reportado como o fator angiogênico mais potente em relação aos outros VEGFs em um estudo realizado em músculo esquelético ⁴⁷. Verificamos que o VEGF-D se comporta de forma diferente nas lesões de acordo com a dieta ingerida. Os animais do grupo SD apresentaram maiores níveis de VEGF-D até o sétimo dia de cicatrização quando comparados com o grupo HFD no mesmo período. No sétimo dia também vimos que os níveis de MMP-9 em animais do grupo SD são maiores que no grupo HFD. Desta forma, o VEGF-D se mostra como um potencial fator de modulação de atividade de MMP-9 na cicatrização de úlceras e essa atividade sofre interferência da dieta ingerida pelos animais.

A ação do HGF nas úlceras gástricas é reportada principalmente na fase tardia da cicatrização ¹⁷, ele age sobre a proliferação, migração e sobrevivência de células epiteliais e endoteliais envolvidas no reparo tecidual ⁴⁸. Experimentos com camundongos que tiveram MET (receptor de HGF) inativado na epiderme mostraram que esses animais exigiram o dobro de tempo para cicatrização em relação a camundongos selvagem, evidenciando a importância de sua ação no processo de cicatrização ⁴⁹. No presente estudo, foi possível identificar o aumento significativo de HGF no sétimo dia de cicatrização tanto no grupo SD quanto no grupo HFD. O grupo HFD também apresenta aumento significativo de HGF em relação ao grupo SD neste período. Considerando que o HGF age em resposta ao dano tecidual, o aumento no grupo HFD pode ser atribuído à condição inflamatória do tecido, que como visto na figura 11-A não mostra redução dos níveis de IL-1 β ao longo do período estudado.

Nas úlceras gástricas, o EGF estimula a cicatrização pois possui papel crucial na desdiferenciação de células epiteliais que vão constituir a mucosa adjacente à lesão e possibilitar a regeneração de estruturas da mucosa ¹⁴. Sua atividade na cicatrização de úlceras é bem estabelecida por estudos que mostram sua aplicação sistêmica e local, ambos aumentando a taxa de cicatrização das úlceras ⁵⁰. Em nosso estudo, vimos que o pico de EGF ocorre na fase

inicial da cicatrização. No grupo SD, o pico de atividade de EGF ocorreu no primeiro dia, porém no grupo HFD, o pico ocorreu no terceiro dia, sendo sua concentração 3x maior do que a encontrada no grupo SD. Apesar dos níveis de EGF se apresentarem maiores na fase inicial da cicatrização das lesões no grupo HFD, a cicatrização neste grupo não foi melhor. Nenhum dos marcadores avaliados neste trabalho apresentou uma alteração semelhante a esse perfil, portanto essa alteração deve ser melhor investigada, pois o EGF exerce um papel chave na cicatrização das lesões gástricas.

Conclusão

Os camundongos machos Swiss alimentados por 12 semanas com dieta hiperlipídica apresentaram o processo de cicatrização das úlceras gástricas prejudicado, ao reduzir a velocidade de cicatrização. As principais consequências da ingestão de dieta hiperlipídica no processo de cicatrização foram: manutenção dos níveis de IL-1 β na fase tardia da cicatrização, quando o esperado era sua redução devido a diminuição do processo inflamatório; ausência de pico de atividade de MMP-9 durante o processo de cicatrização; retardo do pico de concentração de VEGF-C em relação ao grupo SD; diminuição de VEGF-D na fase inicial da cicatrização e pico de atividade de EGF no terceiro dia de cicatrização, que não foi observado no grupo SD. Além das alterações macroscópicas, os perfis de atividade de fatores inflamatórios, matriz extracelular e fatores de crescimento apresentaram diferença ao longo da cicatrização de lesões em animais que receberam diferentes dietas.

Capítulo II

Citral: Modulation of MMP-2 and 9 on the healing of gastric ulcers associated with obesity induced by high-fat diet

Abstract

Obesity causes a low-grade inflammatory condition that can result in other comorbidities such as type 2 diabetes mellitus, hypertension, hepatic steatosis and atherosclerosis. In addition, in cases of gastrointestinal tract disorders, there is an increase in the severity of gastric lesions and greater difficulty in the healing process, intensified by the use of drugs that further aggravate the lesions in the gastric mucosa in obese individuals. Against this backdrop, this study aims to evaluate the pharmacological effects of Citral on the healing of gastric lesions in eutrophic and obese animals. C57Bl/6 male mice were divided into 2 groups (n=60): animals fed for 12 weeks with a standard diet (SD) or a high fat diet (HFD). Then, both groups underwent gastric ulcer induction surgery with acetic acid (80%). Citral was administered orally, in three doses: 25, 100 or 300 mg/kg during 3 or 10 days, a Sham group was included that was only laparotomized and not suffered an injury induction. For this experiment, the groups were additionally included: negative control treated with vehicle (1% Tween 80, 10 mL/kg) and positive control treated with Lansoprazole (30 mg/kg). All stomachs were collected for morphological analysis and zymographic and molecular analysis. The macroscopic analysis of the lesions was performed by quantifying the area of the regenerating tissue and the ulcer. Furthermore, we quantified matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and 9) by zymography. Two-way analysis of variance was used for statistical analysis, followed by the Tukey, Dunnett or Bonferroni test. The minimum significance level adopted for this study was $p < 0.05$. After 12 weeks of obesity induction, the animals that received a high-fat diet showed changes such as an increase in body mass, an increase in adiposity index and an alteration of the serum lipid profile compared to the group that received a standard diet. We found that among the animals fed with HFD, only the groups that received Citral at doses of 100 and 300 mg/kg showed a significant reduction in the area of the ulcer base between the two periods evaluated. In the group treated with Citral at a dose of 100 mg/kg, healing progression was accompanied by a reduction in MMP-9 activity ($p < 0.05$). So far, we can conclude that the high-fat diet altered the activity of matrix metalloproteinase 9, which caused a deceleration of the initial phase of the healing process. And although we did not detect evident macroscopic changes, we found that in obese animals, treatment for 10 days with Citral at a dose of 100 mg/kg promoted the greater progression of scar tissue accompanied by a decrease in MMP-9 activity.

Introduction

In 2016, 39% of the world's adult population aged 18 years and over (39% of men and 40% of women) were overweight and 13% were obese (World Health Organization). Obesity is characterized by the excessive accumulation of adipose tissue resulting from the imbalance between high consumption and low energy expenditure, this accumulation is deposited in the form of visceral adipose tissue, which is naturally a producer of pro-inflammatory cytokines, thus, obesity also configures a low-grade inflammatory condition. The accumulation of visceral adipose tissue has recently been associated with the development of comorbidities such as insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, and cardiovascular disease (Kim et al. 2022).

The systemic inflammation caused by obesity is triggered by the recruitment of immune cells, interaction and activation of these cells and the release of inflammatory molecules. In addition, the combination of other events is also involved in the maintenance of this inflammatory condition. We can highlight the high-fat diet, which causes inflammation in adipose tissue at the beginning of the diet, and has been identified as an important factor in maintaining inflammation. The rapid expansion of adipose tissue after the ingestion of a high-fat diet leads to systemic physiological changes, directly affecting the functioning of some organs (Wu and Ballantyne 2020). Obese patients often report alterations in the speed of gastric emptying (Sampath et al. 2021). Abdominal obesity, characterized by increased visceral fat, is related to the onset of several diseases of the gastrointestinal tract, due to the increase in intra-abdominal pressure caused by the excessive accumulation of adipose tissue (Sogabe et al. 2016). Furthermore, adipose tissue locally secretes adipocytokines such as TNF- α and IL-6, which aggravate gastric lesions, as shown in some studies to investigate the mechanism of action of antiulcerogenic agents, the inhibition of these cytokines as a gastroprotective factor (Sogabe et al. 2016; Aziz et al. 2019).

The association between obesity and peptic ulcers has been explored in some studies and the results are still controversial. However, it is possible to state that the mechanisms not yet elucidated of the possible association between obesity and peptic ulcers may be accentuated by low-grade chronic inflammation (Sogabe et al. 2016). Although there is no established association between the two diseases, there are studies that show that the deficient vascularization resulting from obesity directly affects the healing process in the skin, as it hinders the recruitment of angiogenic factors necessary for complete healing of the lesion (Anderson and Hamm 2014). An ulcer is formed when the mucous layer of the stomach is disrupted. for that occurs, there are several factors involved: decreased production of mucus and bicarbonate, which may be caused by insufficient blood supply, *Helicobacter pylori*

infection, or overuse of NSAIDs (Takeuchi and Amagase 2018; Dunlap and Patterson 2019). It is possible to histologically classify gastric lesions into two parts: base and margin of the ulcer. The base of the ulcer is the necrotic region, where granulation connective tissue predominates, which contains fibroblasts, macrophages and endothelial cell proliferation. On the other hand, the ulcer margin, which in this study we will call regenerating tissue, consists of proliferating epithelial tissue that has undergone dedifferentiation and expresses a high amount of growth factors (Tarnawski and Ahluwalia 2021).

Currently, the main treatment used for gastric ulcers involves the use of acid secretion inhibitors, mainly proton pump inhibitors and histamine receptor antagonists, but the use of these drugs is often accompanied by adverse reactions such as abdominal pain, nausea, constipation and flatulence. Prolonged use of proton pump inhibitors is also associated with liver damage and increased risk of developing gastric cancer, which limits treatment time, in addition to causing adverse effects outside the digestive system such as kidney disease, dementia and bone fractures (Fossmark et al. 2019; Xing et al. 2020). Therefore, none of the drugs currently used promote effective re-epithelialization of the lesion with the formation of new vessels for the adequate blood supply of the tissue, which leads to recurrence and worsening of ulcers (Kangwan 2014). Like the formation of gastric ulcer, its healing process is multifactorial and complex and involves re-epithelialization, restoration of glands, angiogenesis and extracellular matrix deposition (Tarnawski and Ahluwalia 2021).

The extracellular matrix (ECM) is a complex multimolecular structure comprising collagen and elastin fibers, structural glycoproteins including fibronectin and laminin, and mucopolysaccharides. In a physiological state, there is a balance between synthesis, deposition and degradation of ECM components and its composition varies among multicellular structures, with fibroblasts and epithelial cells being the most common cell types (Berg et al. 2019). The main enzymes that participate in ECM synthesis and degradation are matrix metalloproteinases (MMPs), which are zinc-dependent proteases and play a crucial role in ECM remodeling through proteolytic degradation of components of its components, activation of surface proteins and release of membrane-bound receptor molecules (Raeeshzadeh-Sarmazdeh et al. 2020). MMPs with gelatinase activity hydrolyze gelatin into polypeptides, peptides, and amino acids that can then be secreted across the cell membrane. MMP-2 and MMP-9 belong to the gelatinases and facilitate the binding of gelatin and collagen through three fibronectin type II-like repeat domains inserted into the catalytic domain of the structure. Both MMP-2 and MMP-9 are fundamental in the healing process, as they play a role in accelerating cell migration and re-epithelialization, respectively (Caley et al. 2015; Raeeshzadeh-Sarmazdeh et al. 2020). In

gastric ulcers, the degradation of the gastric mucosa is directly related to the degradation of the extracellular matrix. MMP-9 is secreted mainly by neutrophils and macrophages and act in the initial phase of healing, in patients with gastric ulcers, increased production of MMP-9 was detected at the edge of the lesion. Furthermore, it has been reported that a higher presence of MMP-9 in the tissue of the lesion is associated with a higher risk of ulcer recurrence, suggesting that MMP-9 is a marker of low-quality healing (Li et al. 2013). MMP-2 is secreted mainly by fibroblasts and leukocytes, its activity is considered important in the initial phase because it promotes cell migration acceleration. However, in the proliferative phase, its increase is related to the fragility of the regenerating tissue (Kanno et al. 2019). Some pathological processes, such as the expansion of adipose tissue, are involved in the regulatory factors of proteolytic enzymes. It was also found that in obese individuals, there is an increase in plasma levels of MMP-2 and 9. In studies with animals fed with HFD, it was also possible to verify the increase in MMP-9 in visceral adipose tissue (Derosa et al. 2008; Berg et al. 2019).

Considering this multifactorial picture of obesity associated with gastrointestinal diseases, a promising alternative for the treatment of this condition is the use of molecules from natural products, mainly due to their multi-target potential that has been explored (Li et al. 2018). Natural products are excellent sources for prospecting new pharmacological agents, not only because of the structure itself but also as templates for synthetic modification, optimization of selectivity and bioavailability (Setzer and Byler 2018). Citral is a compound of plant origin found in species such as Lemon grass (*Cymbopogon citratus* and *C. flexuosus*), lemon balm (*Melissa officinalis*), and ginger (*Zingiber officinale*), among others. It is widely used by the food, cosmetic, chemical and pharmaceutical industries, being incorporated into fragrances, food and beverages (Bailly 2020). Chemically, Citral is classified as an acyclic monoterpene, which is a mixture of two isomers: neral cis isomer and geranial trans isomer (Nishijima et al. 2014). Monoterpenes have been explored pharmacologically for their anti-inflammatory, antioxidant and antibiotic actions. In addition, in gastric ulcers, monoterpenes showed activity ranging from injury prevention to accelerating the healing process (Périco et al. 2020). In studies conducted previously by our group, Citral promoted gastroprotection in the NSAID-induced gastric injury model, however, the effect of Citral on the healing of gastric ulcers in an obesity model was not yet known (Nishijima et al. 2014). Therefore, this study aimed to evaluate the action of Citral in the initial and late phases of the healing process of gastric ulcers in eutrophic and obese mice.

Materials and Methods

Animals

C57Bl/6 male mice ($n = 10$) aged 4 to 6 weeks from the Multidisciplinary Center for Biological Research in the Field of Science in Laboratory Animals - UNICAMP were acclimatized to the conditions of the sectorial vivarium for at least seven days before the experimental manipulation, under a controlled temperature between 23 and 25°C and a 12-hour light-dark cycle and were fed with commercial chow (Presença, Jaguaribara, CE, Brazil) or high-fat (PragSoluções Biociências, Jaú, SP, Brazil) chow and water *ad libitum*. All experiments followed experimental protocols previously approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation, of the Biosciences Institute of UNESP – Botucatu under the number 1208.

Experimental design

We evaluated the action of Citral (Sigma, St. Louis, MO, USA) in the early and late phases of healing. For both, mice were divided into twelve groups ($n = 10$ /each): V-SD: animals fed with standard diet and treated with vehicle (Tween 80, 1%); L-SD animals fed with standard diet and treated with Lansoprazole (30 mg/kg); C1-SD animals fed with standard diet and treated with Citral (25 mg/kg); C2-SD animals fed with standard diet and treated with Citral (100 mg/kg); C3-SD animals fed with standard diet and treated with Citral (300 mg/kg); Sham-SD animals fed with standard diet that underwent laparotomy without lesion induction; V-HFD: animals fed with high-fat diet and treated with vehicle (Tween 80, 1%); L-HFD animals fed with high-fat diet and treated with Lansoprazole (30 mg/kg); C1-HFD animals fed with high-fat diet and treated with Citral (25 mg/kg); C2- HFD animals fed with high-fat diet and treated with Citral (100 mg/kg); C3-HFD animals fed with high-fat diet and treated with Citral (300 mg/kg) and Sham-SD animals fed with high-fat diet that underwent laparotomy without lesion induction (Figure 1). Citral doses were chosen based on previous studies (Nishijima et al. 2014). For euthanasia, mice were anesthetized with Isoflurane (Isoforine® Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brazil) and blood was obtained from a cardiac puncture, 24 h after the last treatment administration, then centrifugated to collect the sera for further biochemical estimations.

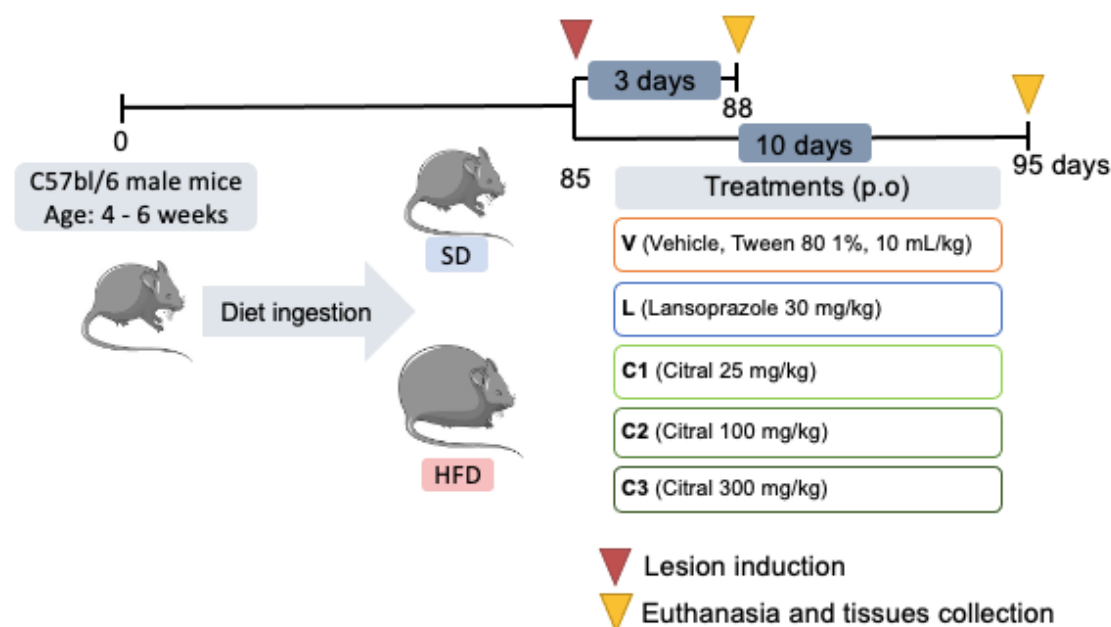


Fig. 1 - Experimental design to evaluate Citral in the early (3 days) and late (10 days) phases of gastric ulcer healing in C57Bl/6 eutrophic and obese mice.

Obesity induction

For obesity induction, the animals were separated into two groups. The first received a standard diet (SD) and the second, a high-fat diet (HFD). The high-fat diet has 60% of calories from lipids (Table 1), while the standard diet has 16%. The animals received this diet for 12 weeks (84 days) and they were weighed twice a week, along with food intake control (Gotardo et al. 2013).

Component	g/kg	kcal/kg
Corn starch (q.s.)	115,5	462
Casein	200	800
Sucrose	100	400
Maltodextrin	132	528
Lard	321	2808
Soy oil	40	360
Cellulose	50	-
Mineral mix	35	-
Vitamin mix	10	-
L-Cystine	3	-
Choline	2,5	-
Total	1000	5358

Table 1- Composition of the high-fat diet (HFD)

Gastric ulcer induced by acetic acid

For lesion induction, the animals were anesthetized with isoflurane. The induction rate used was 2% and the maintenance rate was 2.5 to 3% in the low-flow inhalation anesthesia

system equipment (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brazil). After being anesthetized, the animals were laparatomized and the stomach was exposed for administration of 25 μ L acetic acid 80% topically. The contact area with acetic acid was delimited by a plastic ring with a diameter of 3.75 mm. After 20 seconds of exposure, the acetic acid was removed and the stomach was washed with saline (0.9% NaCl) to remove any residue. After the installation of the lesion, the animals were sutured and returned to their respective boxes (Okabe et al. 1971). To evaluate the action of Citral, the animals were divided into 5 treatment groups: Vehicle (V), Tween 80, 1%, used as control negative; Lansoprazole (L) (Ravoos Laboratories, Hyderabad, India), a dose of 30 mg/kg, drug used to treat gastric ulcers and Citral (Sigma, St. Louis, MO, USA) at doses of 25, 100 and 300 mg/kg (C1, C2 and C3, respectively). For each experiment, the Sham group was included, containing animals that underwent laparotomy without inducing injury. As it is a protocol that involves a surgical procedure, there is a considerable loss of animals during and after surgery until the end of the experiment. In this experiment, the loss was approximately 25% of the animals between eutrophic and obese animals.

Macroscopic analysis

For analysis of the lesion area, we adopted the methodology of Xing and collaborators in the identification of ulcer structures (Xing et al. 2020). Modifications were made to this methodology so that the macroscopic aspects could be evaluated, according to the following classification: the ulcer was considered as the thinnest part surrounded by the regenerating tissue (Figure 2). The tumescent tissue around the ulcer was classified as regenerating tissue. Quantification was performed using ImageJ software (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA).

Quantification of MMP-2 and MMP-9 by zymography

The lesion tissue was separated and homogenized with extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl, 0.1% Triton-X 100, 10 mM CaCl₂ and 1% protease inhibitor cocktail). The homogenates were subjected to 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis containing 1 mg/mL of gelatin (Sigma, St. Louis, MO, USA) under non-reducing conditions. The gels were washed twice in 2.5% Triton-X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and then incubated in calcium assay buffer (40 mM Tris and HCl, pH 7.4, 0.2M NaCl, 10mM CaCl₂) for 18h at 37°C. Gels were stained with 0.1% Coomassie blue followed by decolorization. Zones of gelatinolytic activity served as negative staining. The quantification of the zymographic bands was performed using optical densitometry linked to the ImageJ software (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) (Steffensen et al. 2001).

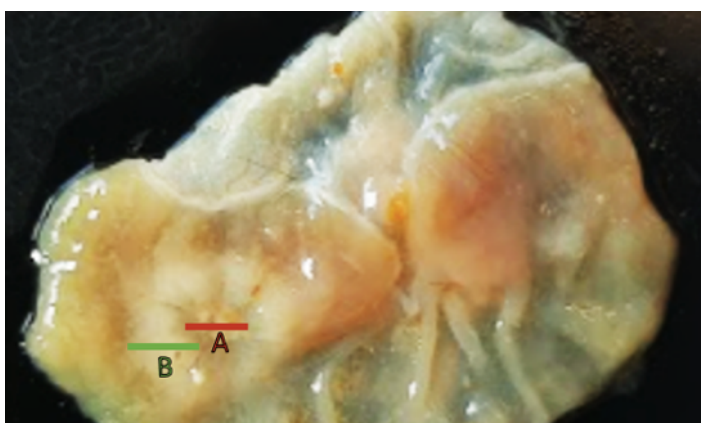


Fig. 2 - Classification of gastric ulcer structures. A) Ulcer (red line). B) Margin or regenerating tissue (green line)

Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (s.e.m) of the parameters obtained. To compare the effect of diets regardless of the treatment used, one-way ANOVA followed by Student's t test was used. To evaluate the temporal evolution of healing, a comparison was made between different periods of the same treatment in animals that received the same diet. For this comparison, two-way ANOVA followed by the Bonferroni test was performed. To compare the effect of treatments within groups that received the same diet, the posttest used was the Dunnett test, in which comparisons were made between the groups that received Lansoprazole and Citral at three different doses in relation to the negative control group. The comparison was made separately for the 3- and 10-day treatments. Finally, to verify the effect of different diets, we compared the evolution of the lesion within the same treatment given for the same period. For this, we used the Bonferroni post-test.

Results

Induction of obesity by HFD ingestion

For the pharmacological evaluation of the action of Citral, mice of the C57Bl/6 strain were used, as they are more prone to the development of comorbidities resulting from obesity. Over 12 weeks (84 days) the body mass of each animal was measured twice a week, and from the third week onwards, it was possible to observe a significant increase of 10.1% ($p < 0.05$) in the mass of the animals fed with HFD compared to SD. The figure 3 shows a statistical difference from the third week after the start of HFD ingestion in relation to animals fed with SD. At the end of the obesity induction period, the difference between the body mass of mice fed different diets was 51.8% ($p < 0.0001$), demonstrating that the present strain responds well

to the ingestion of a high-fat diet concerning the body weight gain. At the end of the treatments, the animals were euthanized and their abdominal (TAA), epididymal (TAE), and retroperitoneal (TAR) adipose tissues were collected. To calculate the adiposity index, the masses of the TAA, TAE, and TAR were added and the total value was divided by the mass of the animal. Animals fed HFD had a 2.3x higher adiposity index ($p < 0.0001$) than animals fed SD (Figure 4).

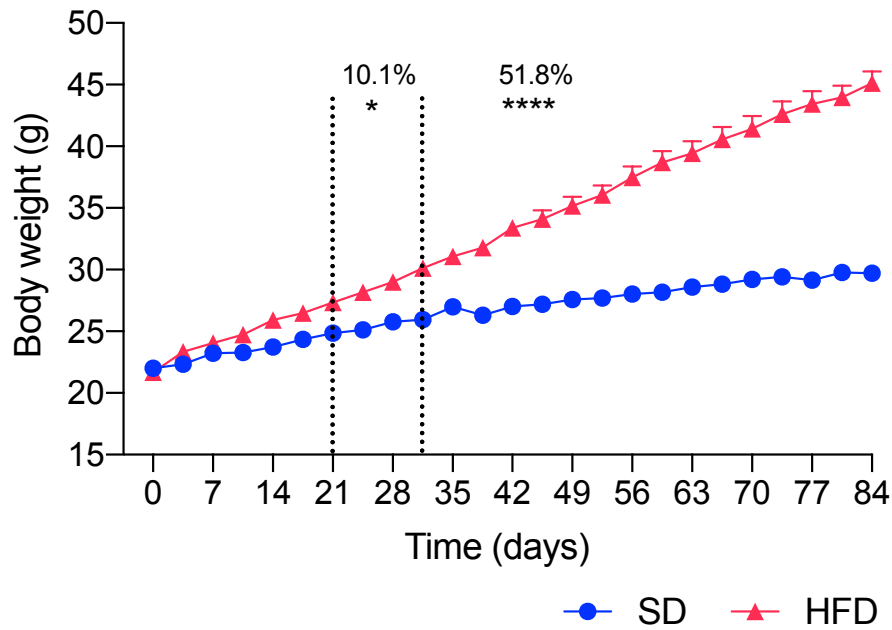


Fig. 3 - Comparison of body weight evolution between animals fed with a standard diet (SD) and a high-fat diet (HFD) throughout the period of obesity induction. Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m ($n = 96-106$). Statistical significance was determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test * $p < 0.05$ and **** $p < 0.0001$.

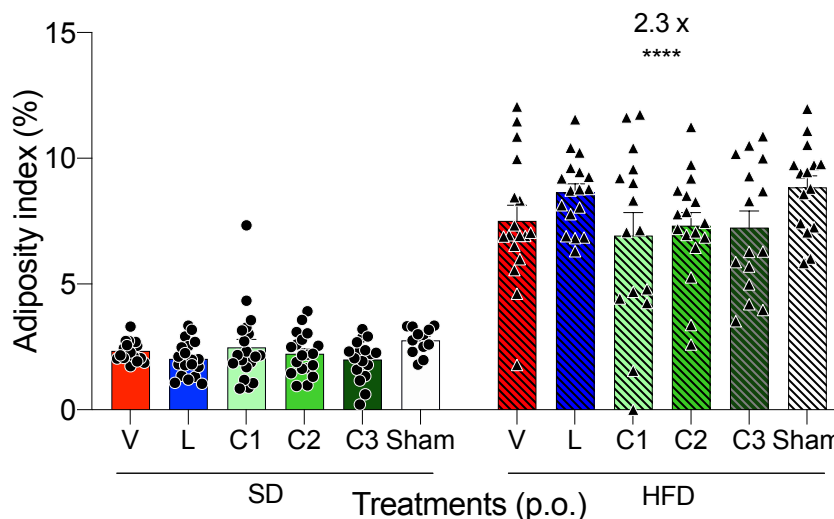


Fig. 4 - Comparison of adiposity index between animals fed standard diet (SD, $n=106$) and high fat diet (HFD, $n=96$) and treated with V – Vehicle, L – Lansoprazole, C1 – Citral (25 mg/kg), C2 – Citral (100 mg/kg) and C3 – Citral (300 mg/kg). The comparison was performed regardless of the treatment received, considering only the diet. Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m and statistical significance was determined by two-way ANOVA, followed by Student's t test **** $p < 0.0001$.

To verify the metabolic alterations, the lipid profile and blood glucose of the group treated for 10 days were evaluated (Table 2). The figure 5A shows the total cholesterol in animals that received HFD was 31.8% ($p < 0.001$) higher than in animals fed with SD. Likewise, LDL showed alterations, with an increase of 1.8x ($p < 0.0001$) in relation to the group fed with SD (Figure 5B). Despite these changes, HDL levels did not change in animals that received HFD (Figure 5C). Some studies show variations in the time of ingestion of HFD for serum changes to occur (Preguiça et al. 2020). Therefore, we can confirm that at the end of 12 weeks of ingestion of a high-fat diet, C57Bl/6 mice showed increased body mass, increased adiposity index, and increased serum levels of total and LDL cholesterol.

	SD				
	Vehicle 10 mL/kg	Lansoprazole 30 mg/kg	Citral 25 mg/kg	Citral 100 mg/kg	Citral 300 mg/kg
Glucose (mg/dL)	204,5 ± 12,85	203,2 ± 15,96	184,50 ± 5,69	205,66 ± 7,67	180,33 ± 15,93
Total cholesterol (mg/dL)	136,7 ± 5,59	133,00 ± 6,53	140,84 ± 4,63	135,17 ± 5,31	128,00 ± 7,49
HDL (mg/dL)	78,0 ± 5,08	83,34 ± 3,92	77,17 ± 3,14	78,34 ± 3,28	80,67 ± 3,04
LDL (mg/dL)	28,50 ± 8,17	22,84 ± 5,21	35,67 ± 6,07	34,34 ± 6,60	22,34 ± 4,78
Triglycerides (mg/dL)	151,0 ± 16,95	134,0 ± 14,89	142,3 ± 20,12	112,0 ± 12,70	124,67 ± 17,13
	HFD				
	Vehicle 10 mL/kg	Lansoprazole 30 mg/kg	Citral 25 mg/kg	Citral 100 mg/kg	Citral 300 mg/kg
Glucose (mg/dL)	196,83 ± 30,1	280,3 ± 21,27	179,2 ± 42,91	205,2 ± 22,17	178,33 ± 22,23
Total cholesterol (mg/dL)	184,0 ± 27,59	221,8 ± 25,32	156,2 ± 19,12	150,3 ± 20,32	185,7 ± 16,47
HDL (mg/dL)	75,0 ± 5,30	76,34 ± 4,64	65,60 ± 11,42	72,17 ± 3,12	75,67 ± 3,56
LDL (mg/dL)	87,67 ± 24,42	125,3 ± 23,55	75,0 ± 13,75	60,34 ± 17,13	91,50 ± 15,65
Triglycerides (mg/dL)	107,0 ± 22,12	100,8 ± 15,37	78,0 ± 7,18	88,67 ± 10,80	92,34 ± 8,29

Table 2 - Biochemical parameters of mice after induction of gastric ulcer by acetic acid and 10 days of treatment.

Data are represented as mean ± s.e.m. SD= standard diet and HFD= high-fat diet.

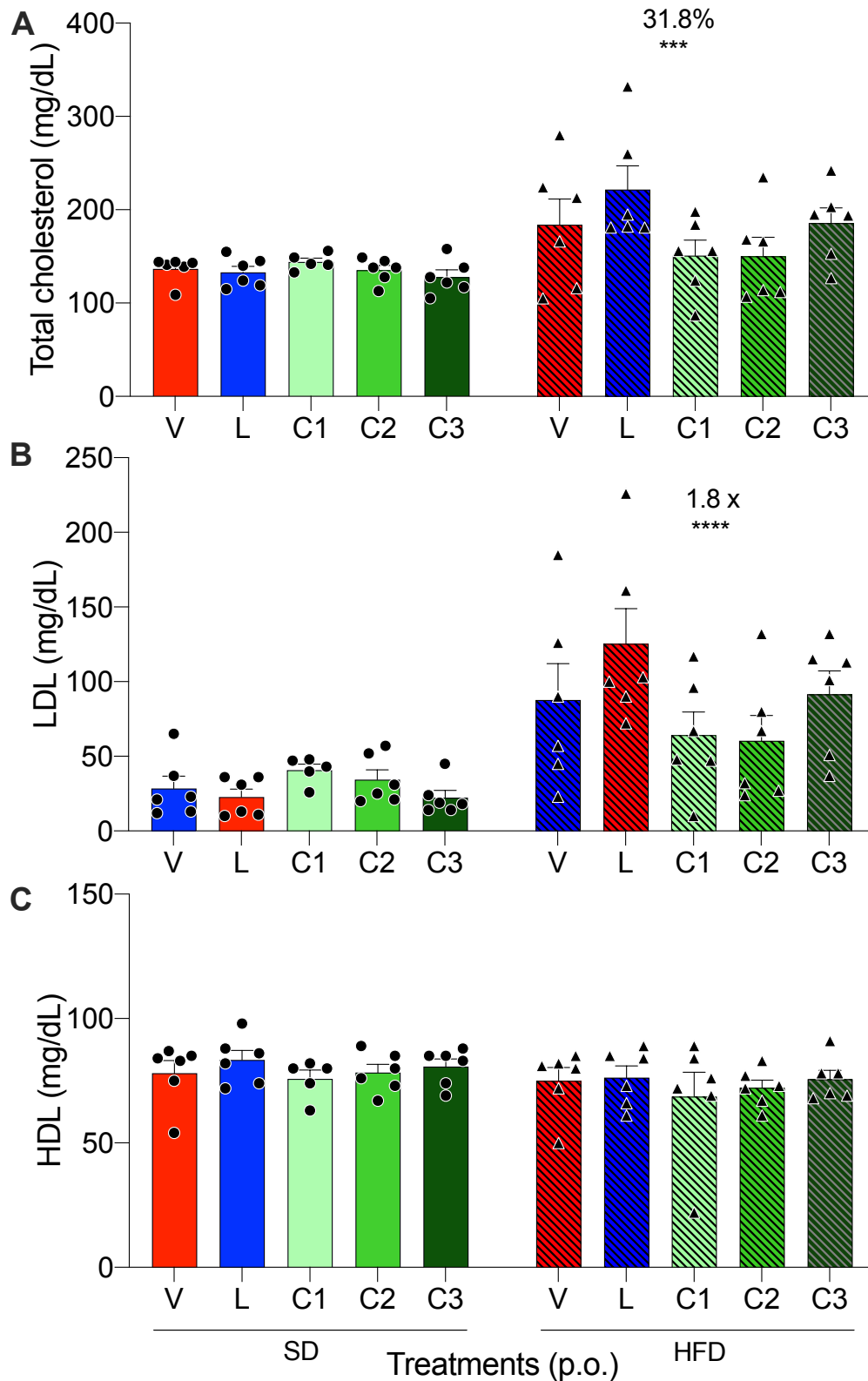


Fig. 5 - Lipid profile in animals fed standard diet (SD) and high-fat diet (HFD) and treated with V – Vehicle, L – Lansoprazole, C1 – Citral (25 mg/kg), C2 – Citral (100 mg/kg) and C3 – Citral (300 mg/kg). The comparison was performed regardless of the treatment received, considering only the diet. Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m. (n = 30-34) and statistical significance was determined by two-way ANOVA, with ***p < 0.001.

Gastric ulcer induced by acetic acid

In the early phase evaluated in this study, it was not possible to observe regenerating tissue (Figure 6). Therefore, in figure 7 we have a comparison between treatments only in the area of the regenerating tissue of the animals that were treated for 10 days after the induction of the lesion. There was no significant difference in the areas of tissue regeneration between animals that received different treatments compared to the vehicle group.

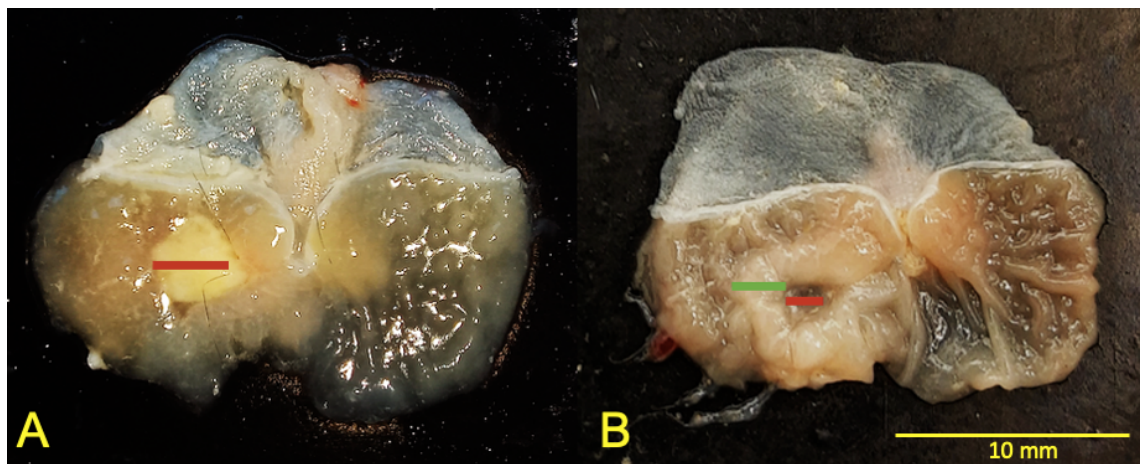


Fig. 6 - Stomachs of animals treated for 3 (A) and 10 (B) days. The red lines represent the base of the ulcer and the green line the regenerating tissue.

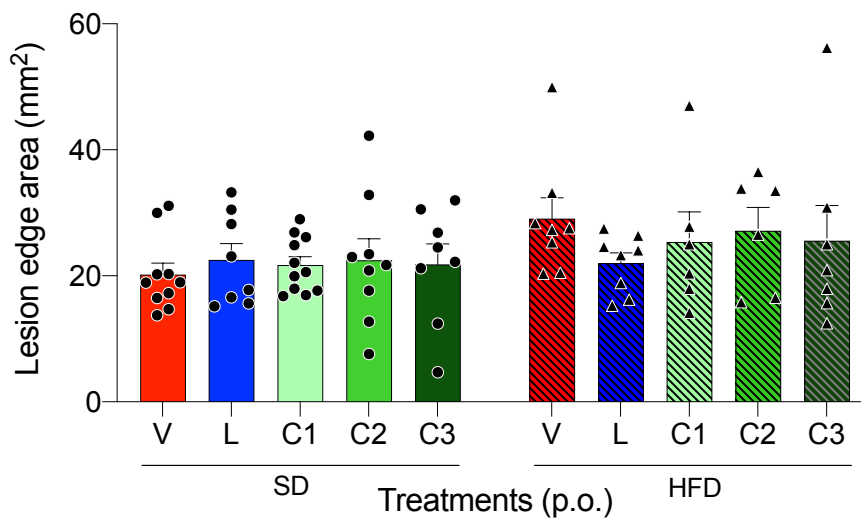


Fig. 7 - Lesion edge area in animals fed SD (standard diet) and HFD (high-fat diet) and treated with V – Vehicle, L – Lansoprazole, C1 – Citral (25 mg/kg), C2 – Citral (100 mg/kg) and C3 – Citral (300 mg/kg). Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m (n = 6-11) and statistical significance was determined by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

Comparing the areas of the base of the ulcer regardless of treatment, we observed that in the animals that received HFD there was a reduction of the lesion area in 35.2% of the stomachs of animals that fed with SD ($p < 0.001$), this difference is evidenced in the graph of figure 8B.

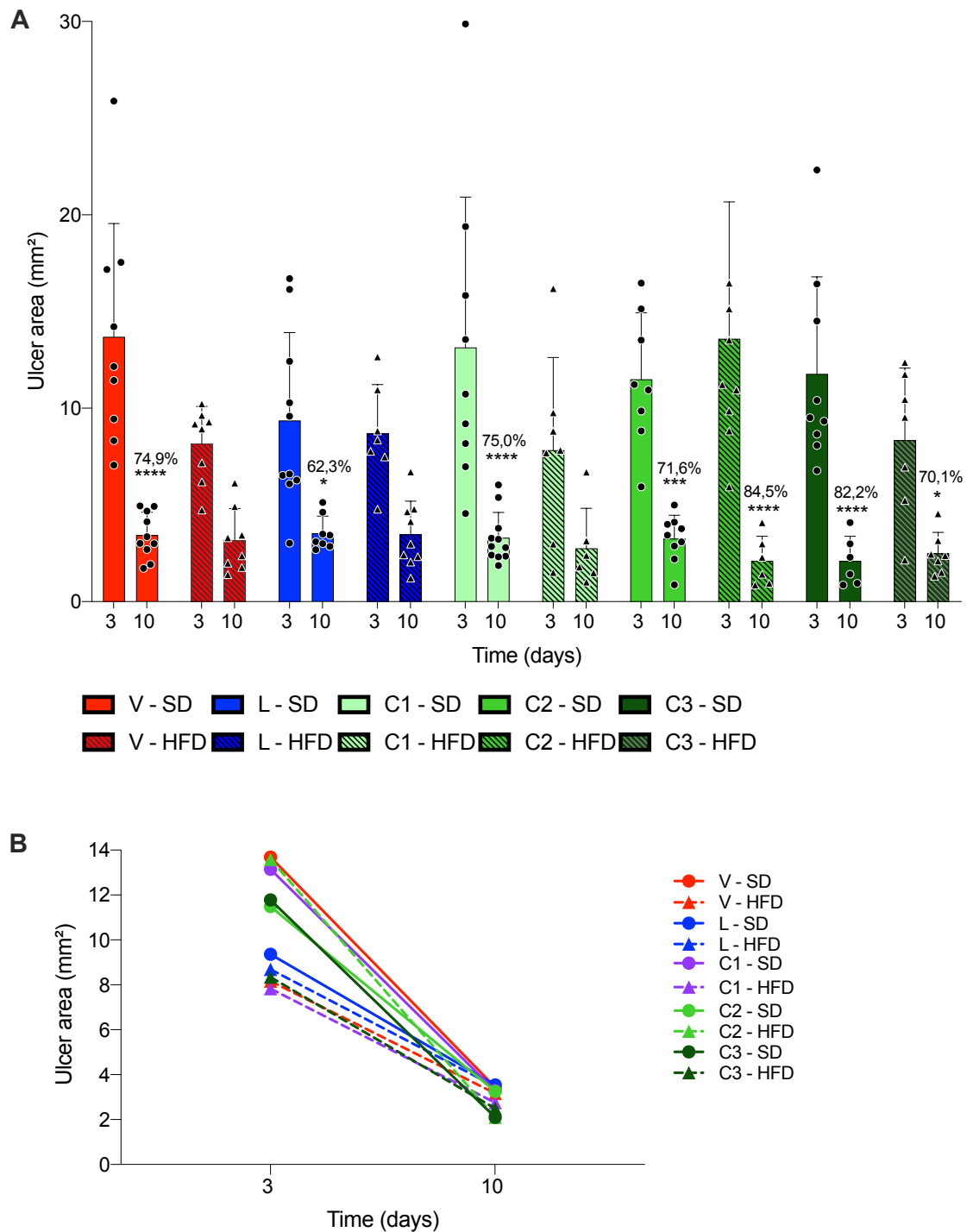


Fig. 8 - Temporal evolution of the ulcer area in animals fed with SD (standard diet) and HFD (high fat diet). The lesion areas were compared on the tenth day in relation to the third day after induction of lesion of the animals treated with V – Vehicle, L – Lansoprazole, C1 – Citral (25 mg/kg), C2 – Citral (100 mg/kg) and C3 – Citral (300 mg/kg). Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m (n = 6-11) and statistical significance was determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, with * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Despite the difference in the initial phase, after 10 days of treatment, there was no significant difference in the area of injury between the diets, which shows that the healing rate in animals fed SD was higher and faster compared to animals fed HFD. Regarding the evolution of healing, all groups fed with SD showed a significant reduction in the area of the ulcer base over time. Among the animals fed with HFD, only the groups that received daily treatment with Citral at doses of 100 and 300 mg/kg showed a significant reduction in the ulcer base area between the third and tenth day after ulcer induction. In figure 9 we can see one stomach from each experimental group.

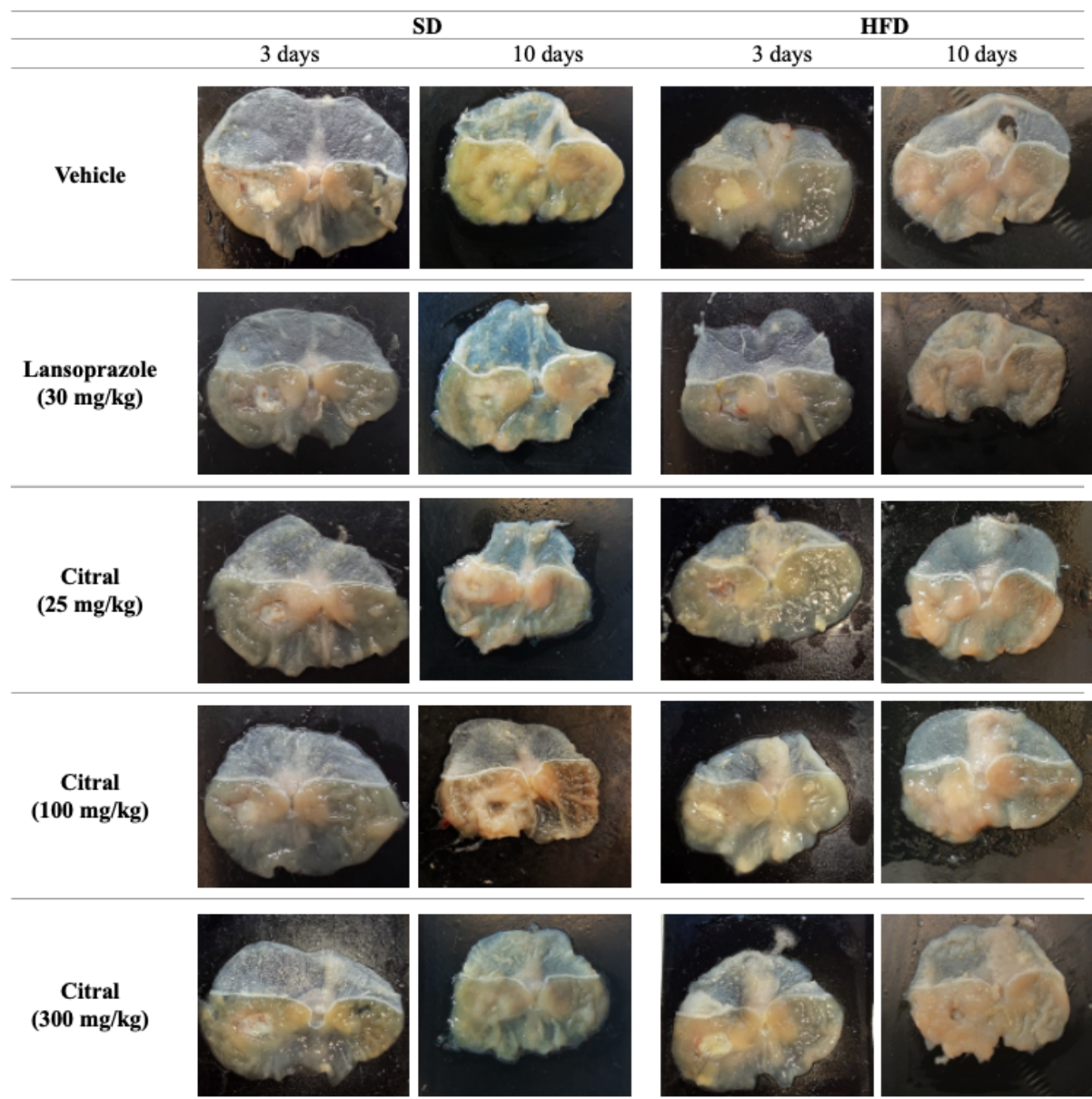


Fig. 9 - Macroscopic images of mice stomach with acetic acid-induced lesion after three and ten days of treatment.

The activity of matrix metalloproteinases

For a more specific evaluation of the action of Citral, especially at doses in which we detected a significant decrease in the area of the ulcer base in animals fed with HFD, we quantified by zymography the activity of matrix metalloproteinases 2 and 9, which act on the degradation of the extracellular matrix, migration cellular and re-epithelialization. Regarding the temporal evolution, when comparing only the different treatment periods, regardless of the treatment received, there was a 20% increase in MMP-2 activity in the stomachs of animals that received 10 days of treatment compared to animals treated for 3 days ($p < 0.05$).

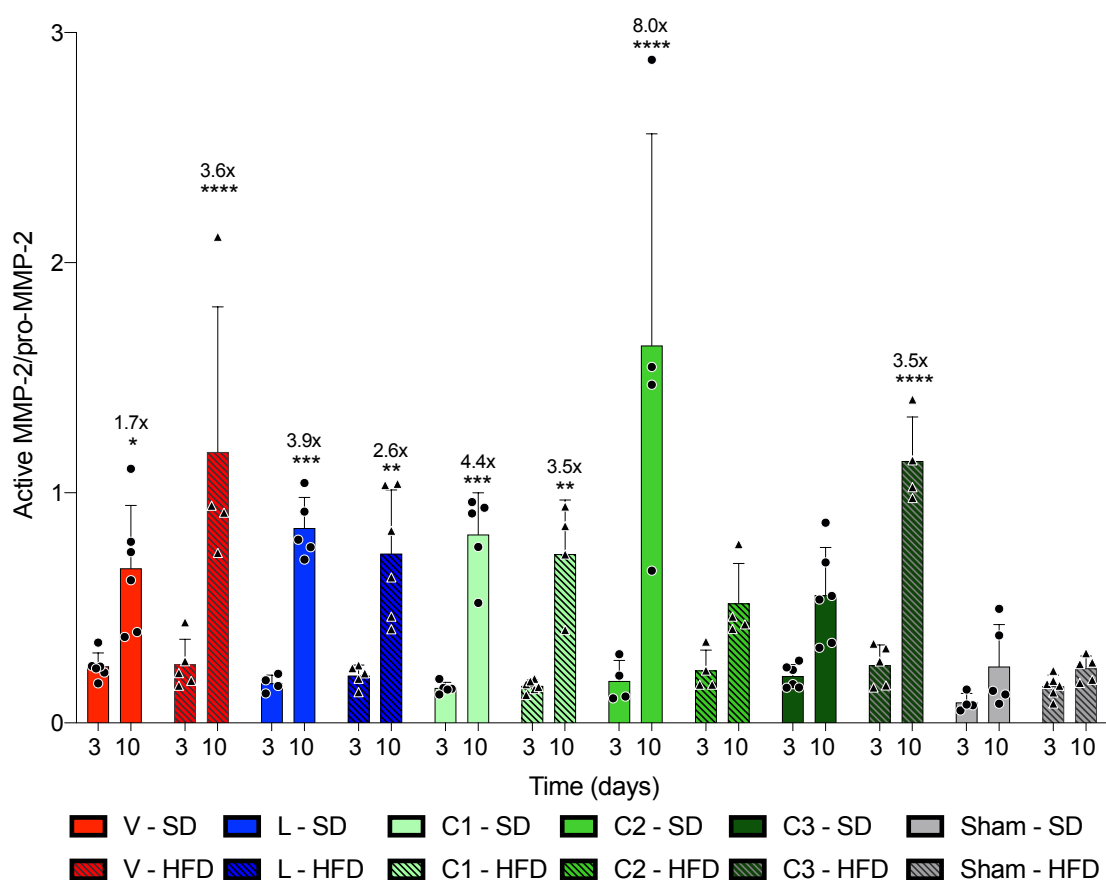


Fig. 10 – Active MMP-2/Pro-MMP-2 rate in the lesions of animals fed SD (standard diet) and HFD (high-fat diet). MMP-2 activities were compared on the tenth day in relation to the third day after induction of injury of animals treated with V – Vehicle, L – Lansoprazole, C1 – Citral (25 mg/kg), C2 – Citral (100 mg/kg) and C3 – Citral (300 mg/kg). Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m ($n = 4-6$) and statistical significance was determined by two-way ANOVA followed by the Bonferroni test, with * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

Figure 10 shows the rate of activation of MMP-2. There was a significant increase in the MMP-2 activation rate in all groups, except in the animals treated with Citral at a dose of 100 mg/kg fed with SD and HFD; and in the group treated with Citral at a dose of 300 mg/kg fed with SD (Figure 10). These same groups showed the highest rates of lesion area reduction (Figure 8A).

When evaluating the activity of MMP-9, we did not observe any difference between treatments when comparing the group that received the same diet and was treated by the same period. There was also no significant difference caused by diet change within groups of animals that received the same treatment for the same period. However, when evaluating the temporal evolution of MMP-9 activity, we found that there was a difference between the activities in the initial and late phase in the animals that received Citral at the dose of 25 mg/kg among the eutrophic animals. And within the group of obese animals, the activity of MMP-9 had a significant increase between 3 and 10 days in animals that received lansoprazole and Citral at a dose of 100 mg/kg (Figure 11).

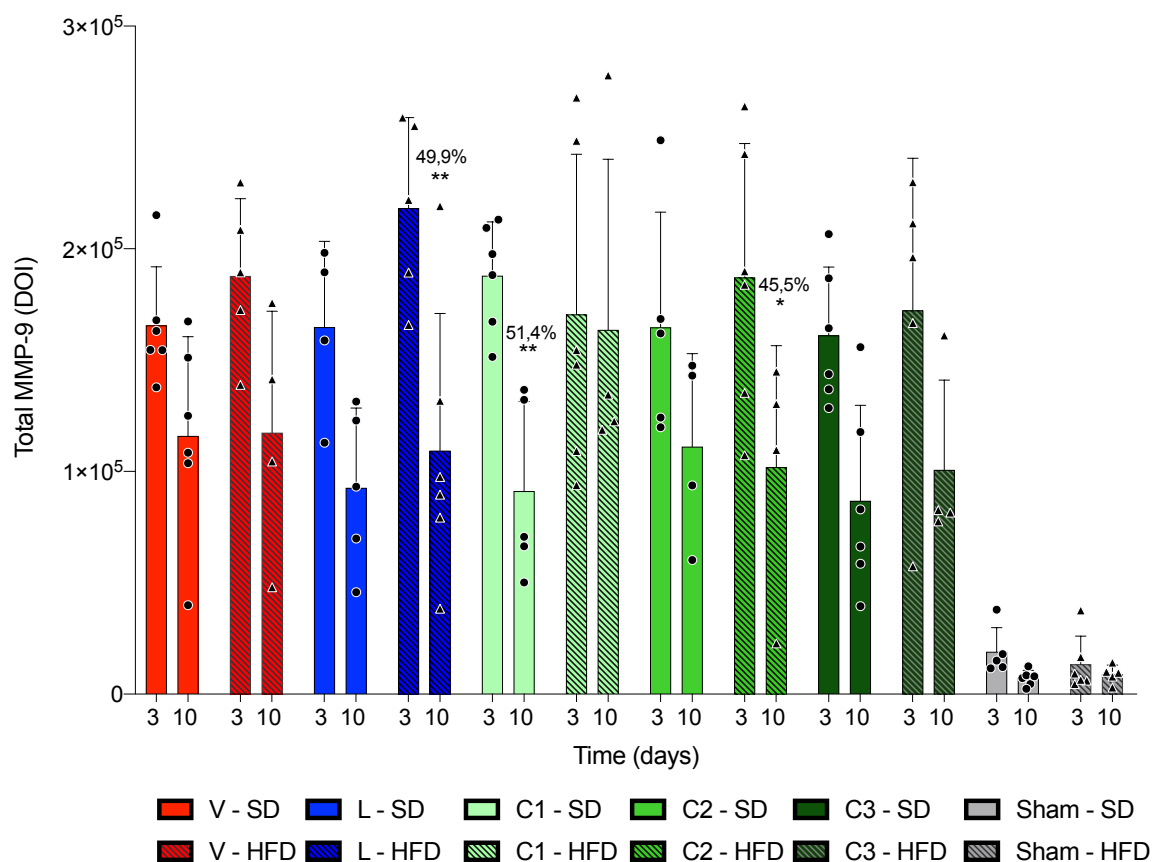


Fig. 11 - Temporal evolution of MMP-9 activity in the lesions of animals fed SD (standard diet) and HFD (high-fat diet). The lesion areas were compared on the tenth day in relation to the third day after induction of lesion of the animals treated with V – Vehicle, L – Lansoprazole, C1 – Citral (25 mg/kg), C2 – Citral (100 mg/kg) and C3 – Citral (300 mg/kg). Results are expressed as mean $\pm$ s.e.m (n = 4-6) and statistical significance was determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test, with *p < 0.05 and **p < 0.01.

It is possible to relate the reduction of the ulcer base area with the reduction of MMP-9 activity, since this enzyme acts mainly in the inflammatory phase of the lesion, and consequently, the reduction of its activity indicates the resolution of the lesion and its progression to proliferative phase in which its activity is more harmful than beneficial.

Discussion

Diet is a determinant of human health and disease, and unbalanced eating habits are the main risk factors for the development of obesity and metabolic disorders (Preguiça et al. 2020). The ingestion of a high-fat diet generates an increase in free fatty acids, which leads to the production of reactive oxygen species (ROS), which characterizes oxidative stress, responsible for the increase in the expression of pro-inflammatory cytokines, forming the condition of chronic low-grade inflammation (Wu and Ballantyne 2020). Therefore, in this study, the objective was to evaluate whether Citral would be able to overcome these changes concerning the healing of gastric ulcers induced by acetic acid.

For the study of the association between obesity and the ulcer healing profile, we chose the C57Bl/6 strain, as it has a greater predisposition to the development of metabolic alterations associated with the ingestion of HFD (Kleinert et al. 2018). In the present study, it was possible to verify changes in body weight (Figure 3), adiposity index (Figure 4), and lipid profile (Figure 5), therefore, the use of mice of the C57Bl/6 strain proved to be efficient for this objective.

The main limitation of this study was the severity of the injury caused by acetic acid in the stomach of mice. In studies conducted with rats, Lansoprazole - which belongs to the class of proton pump inhibitor drugs and is the most used pharmacological class for the treatment of gastric ulcers - is shown to be effective in reducing the lesion area of animals with ulcers induced by the same model (Bueno et al. 2021). However, in the present study, it was not possible to observe a significant difference in the lesion area between animals treated with Lansoprazole and vehicle. Despite this limitation, it was possible to observe changes in the healing process promoted by the other oral treatments used in this investigation.

We evaluated the periods of 3 and 10 days because they are healing phases in which different types of mediators operate: At three days after induction of the lesion, inflammatory cells are predominant, tissue necrosis and formation of granulation tissue and ulcer margin. Until approximately the tenth day after injury induction, intense migration of epithelial cells occurs leading to re-epithelialization of the ulcer and angiogenesis in the ulcer bed, at which point the completion phase of the healing process begins (Magierowska et al. 2019). In our study, this data was corroborated by the expressive difference in the area of regeneration tissue between animals treated for 3 and 10 days (Figure 6).

The extracellular matrix has been a widely explored pharmacological target, especially in situations where tissue repair is required since the dynamics of this complex structure determines several crucial factors for the healing process (Karamanos et al. 2021). Gastric lesions are directly associated with the degradation of the extracellular matrix, in which matrix

metalloproteinases (MMPs) play a crucial role (Li et al. 2013). It was found in experimental and clinical studies that metalloproteinases 2 and 9 change in synthesis and activity in situations of metabolic syndrome or according to variations in the type of diet ingested: A clinical study with obese patients showed an increase in both MMP-2 and 9 plasma levels in obese patients (Derosa et al. 2008). And in animal models, the levels of metalloproteinases in adipose tissue are different according to the type of diet received: a decrease in MMP-9 was reported in animals fed a diet rich in sucrose, with no change in plasma levels. However, in animals with HFD-induced obesity, increased MMP-9 activity was detected in abdominal adipose tissue (Berg et al. 2019).

Regarding the healing of gastric ulcers, it is expected for quality healing that the activity of metalloproteinases 2 and 9 will reduce over time, because in the late period, their actions are harmful to the quality of healing (Raeeszadeh-Sarmazdeh et al. 2020). In the present study, it is possible to relate the reduction of the ulcer base area observed in the C2-HFD group with the reduction of MMP-9 activity, since this enzyme acts mainly in the inflammatory phase of the lesion, and consequently, the reduction of its activity indicates the resolution of the lesion and its progression to the proliferative phase in which its activity is more harmful than beneficial (Raeeszadeh-Sarmazdeh et al. 2020). Furthermore, the presence of MMP-9 in chronic ulcers is related to lesion recurrence (Li et al. 2013), so in the late phase of healing, the reduction of its activity can be considered advantageous in the sense of resolution of tissue injury. In this investigation, it was possible to analyze the MMP-2 bands separately and classify them as pro and active. With these values, we can obtain the activation rate of these enzymes in each treatment and we observed that only in the animals of the SD-C3 and HFD-C2 groups the activation of MMP-2 did not increase significantly over time. Observing this result together with the lesion area of each of these treatments, we can suggest that in those treatments in which MMP-2 activity did not present a significant increase in its activation within 10 days after induction of the lesion, there was modulation of activation of MMP-2, which may have contributed to the reduction of the lesion area, since its high activity in the late healing phase is indicative of poor-quality healing.

Conclusion

In this study, it was possible to observe that the administration of citral at a dose of 100 mg/kg promoted a higher healing rate in obese C57Bl/6 mice, when compared with the other treatments. This change was accompanied by a decrease in tissue MMP-9 and a modulation of MMP-2 activation.

References

- Anderson K, Hamm RL (2014) Factors that impair wound healing. *J Am Coll Clin Wound Spec* 4:84–91. <https://doi.org/10.1016/j.jccw.2014.03.001>
- Aziz RS, Siddiqua A, Shahzad M, et al (2019) Oxyresveratrol ameliorates ethanol-induced gastric ulcer via downregulation of IL-6, TNF- α , NF- κ B, and COX-2 levels, and upregulation of TFF-2 levels. *Biomed Pharmacother* 110:554–560. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.002>
- Bailly C (2020) Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereoisomers. *Eur J Pharmacol* 871:172945. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172945>
- Berg G, Barchuk M, Miksztowicz V (2019) Behavior of Metalloproteinases in Adipose Tissue, Liver and Arterial Wall: An Update of Extracellular Matrix Remodeling. *Cells* 8:158. <https://doi.org/10.3390/cells8020158>
- Bueno G, Chavez Rico SL, Périco LL, et al (2021) The essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC improves gastric ulcer healing in rats through modulation of VEGF and MMP-2 activity. *J Ethnopharmacol* 271:113832. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113832>
- Caley MP, Martins VLC, O'Toole EA (2015) Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care* 4:225–234. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>
- Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, et al (2008) Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Levels in Obese Patients. *Endothelium* 15:219–224. <https://doi.org/10.1080/10623320802228815>
- Dunlap JJ, Patterson S (2019) Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterol Nurs* 42:451–454. <https://doi.org/10.1097/SGA.0000000000000478>
- Fossmark R, Martinsen TC, Waldum HL (2019) Adverse Effects of Proton Pump Inhibitors—Evidence and Plausibility. *Int J Mol Sci* 20:5203. <https://doi.org/10.3390/ijms20205203>
- Gotardo ÉMF, dos Santos AN, Miyashiro RA, et al (2013) Mice that are fed a high-fat diet display increased hepcidin expression in adipose tissue. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 59:454–461. <https://doi.org/10.3177/jnsv.59.454>
- Kangwan N (2014) Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. *World J Gastrointest Pathophysiol* 5:40. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i1.40>
- Kanno E, Tanno H, Masaki A, et al (2019) Defect of interferon γ leads to impaired wound healing through prolonged neutrophilic inflammatory response and enhanced MMP-2 activation. *Int J Mol Sci* 20:. <https://doi.org/10.3390/ijms20225657>
- Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, et al (2021) A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J* 288:6850–6912.

- <https://doi.org/10.1111/febs.15776>
- Kim J, Kim J, Jo M, et al (2022) The Roles and Associated Mechanisms of Adipokines in Development of Metabolic Syndrome. 1–19
- Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, et al (2018) Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 14:140–162. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>
- Li J, Yu H, Wang S, et al (2018) Natural products, an important resource for discovery of multitarget drugs and functional food for regulation of hepatic glucose metabolism. *Drug Des Devel Ther* 12:121–135. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S151860>
- Li SL, Zhao JR, Ren XY, et al (2013) Increased expression of matrix metalloproteinase-9 associated with gastric ulcer recurrence. *World J Gastroenterol* 19:4590–4595. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i28.4590>
- Magierowska K, Bakalarz D, Wójcik D, et al (2019) Time-dependent course of gastric ulcer healing and molecular markers profile modulated by increased gastric mucosal content of carbon monoxide released from its pharmacological donor. *Biochem Pharmacol* 163:71–83. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.011>
- Nishijima CM, Ganey EG, Mazzardo-Martins L, et al (2014) Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. *Eur J Pharmacol* 736:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.04.029>
- Okabe S, Roth JLA, Pfeiffer CJ (1971) A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats - Observations on normal healing. *Am J Dig Dis* 16:277–284. <https://doi.org/10.1007/BF02235252>
- Périco LL, Emílio-Silva MT, Ohara R, et al (2020) Systematic analysis of monoterpenes: Advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. *Biomolecules* 10:265
- Preguiça I, Alves A, Nunes S, et al (2020) Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders—A guide to a translational perspective. *Obes Rev* 21:1–29. <https://doi.org/10.1111/obr.13081>
- Raeaszadeh-Sarmazdeh M, Do LD, Hritz BG (2020) Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells* 9:1–34. <https://doi.org/10.3390/cells9051313>
- Sampath C, Wilus D, Tabatabai M, et al (2021) Mechanistic role of antioxidants in rescuing delayed gastric emptying in high fat diet induced diabetic female mice. *Biomed Pharmacother* 137:111370. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111370>
- Setzer WN, Byler KG (2018) In-silico Approaches to Natural Products Drug Discovery: A Review of the Recent Literature

- Sogabe M, Okahisa T, Kimura T, et al (2016) Influence of metabolic syndrome on upper gastrointestinal disease. *Clin J Gastroenterol* 9:191–202. <https://doi.org/10.1007/s12328-016-0668-1>
- Steffensen B, Häkkinen L, Larjava H (2001) Proteolytic Events of Wound-Healing — Coordinated Interactions Among Matrix Metalloproteinases (MMPs), Integrins, and Extracellular Matrix Molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* 12:373–398. <https://doi.org/10.1177/10454411010120050201>
- Takeuchi K, Amagase K (2018) Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. *Curr Pharm Des* 24:2002–2011. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180629111227>
- Tarnawski AS, Ahluwalia A (2021) The critical role of growth factors in gastric ulcer healing: The cellular and molecular mechanisms and potential clinical implications. *Cells* 10:. <https://doi.org/10.3390/cells10081964>
- World Health Organization Obesity. https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1
- Wu H, Ballantyne CM (2020) Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ Res* 1549–1564. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315896>
- Xing M, Fu R, Liu Y, et al (2020) Human-like collagen promotes the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats by regulating NOS and growth factors. *Food Funct* 11:4123–4137. <https://doi.org/10.1039/d0fo00288g>

Anexo I

Neste anexo serão apresentados os resultados adicionais obtidos a partir da quantificação de citocinas pró-inflamatórias e de fatores de crescimento nas amostras de lesões do experimento do capítulo anterior. O objetivo dessa investigação foi identificar fatores que interferiram na alteração de atividade das metaloproteinases de matriz e descrever os possíveis mecanismos de ação envolvidos. Para este estudo, selecionamos a dose de 100 mg/kg de citral (C2), pois foi a menor dose efetiva na primeira parte do estudo.

Material e métodos

Organização de pools

Para este ensaio, os testes foram realizados por pool. Para isso, foram utilizados 5 µL do sobrenadante do homogenato de tecido de cada amostra, totalizando cinco amostras por pool de grupo experimental.

Quantificação de IL-1 β , TNF- α , EGF, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, HGF e FGF-2

A quantificação dos marcadores foi feita por imunoensaio multiplex Luminex[®] (Milliplex Multiplex Assays Luminex xMAP, Merck, Darmstadt, Alemanha) com kit Multiplex MAGPMAG-24K, Magnetic Luminex Assay, Kit Multi-Analyte pré-misturado para camundongos (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

Análise estatística

Foi realizada análise descritiva dos resultados obtidos neste experimento e as comparações entre os grupos serão expressas em forma de porcentagem em relação ao grupo de referência.

Resultados

Quantificação de citocinas pró-inflamatórias

As concentrações das citocinas pró inflamatórias IL-1 β e TNF- α nas lesões dos animais que receberam diferentes tratamentos estão representadas na figura 14. Todos os grupos apresentaram redução dessas duas citocinas entre os períodos de 3 e 10 dias de tratamento. Entre os animais alimentados com SD, o grupo tratado com citral apresentou aumento de duas vezes das concentrações de IL-1 β e TNF- α nas lesões em relação ao grupo veículo ao final de 3 dias de tratamento. Apesar das concentrações de IL-1 β de todos os grupos terem diminuído

ao final de 10 dias de tratamento, a diferença entre o grupo citral e veículo se manteve (1,8x). Já as concentrações de TNF- α nos mesmos grupos tratados por 10 dias estão abaixo do limite de detecção da técnica, não sendo possível estabelecer uma comparação dessa citocina nesse período.

Quantificação de fator de crescimento endotelial vascular A, C e D (VEGF-A, C e D)

Na figura 15 podemos observar as concentrações de VEGF-A, C e D após 3 e 10 dias de tratamento. Todos os grupos apresentaram redução de VEGF-A entre os períodos de 3 e 10 dias. Dentre os animais alimentados com SD, podemos verificar que o grupo citral apresentou um aumento de 89,5% de VEGF-A no período de 3 dias de tratamento quando comparamos com o grupo tratado com veículo, porém essa diferença não se manteve ao final de 10 dias de tratamento. Entre os animais alimentados com HFD, o VEGF-A em animais tratados com citral foi 41,9% menor em relação ao grupo veículo.

As concentrações de VEGF-C se mostraram crescentes entre 3 e 10 dias em todos os grupos. Após dez dias de tratamento, o grupo tratado com Lansoprazol apresentou a maior concentração de VEGF-C, sendo 82,3% maior que no grupo veículo.

As concentrações de VEGF-D só foram detectáveis no grupo alimentado com SD e tratado por três dias e o grupo que apresentou maior concentração foi o grupo tratado com veículo.

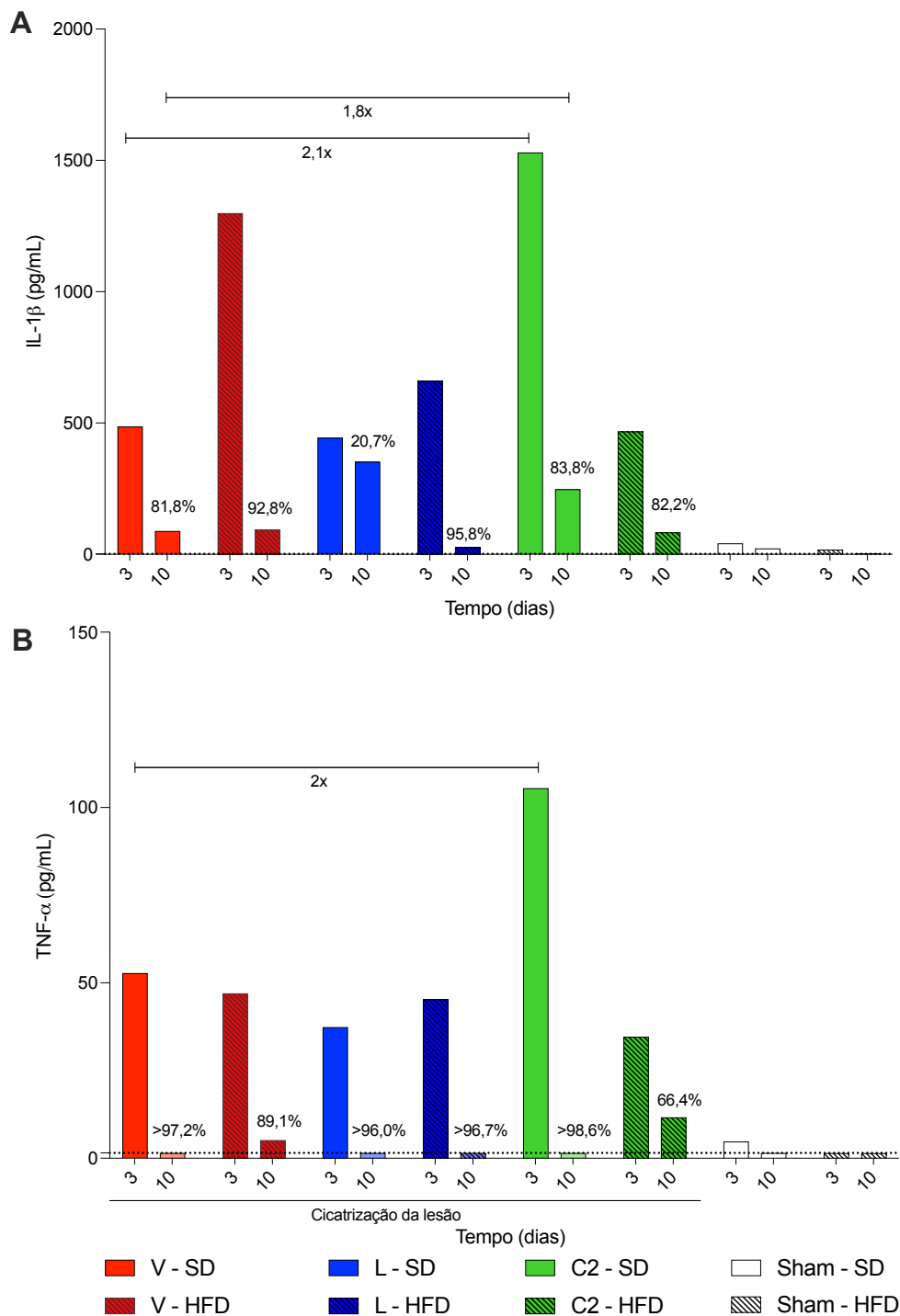


Figura 14 – Evolução temporal da concentração de IL-1 β e TNF- α nas lesões dos animais alimentados com SD (dieta padrão) e HFD (dieta hiperlipídica). Análise descritiva das concentrações no décimo dia em relação ao terceiro dia pós indução de lesão dos animais tratados com V – Veículo, L – Lansoprazol e C2 – Citral (100 mg/kg); e comparação dos tratamentos com seus respectivos veículos. Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou redução.

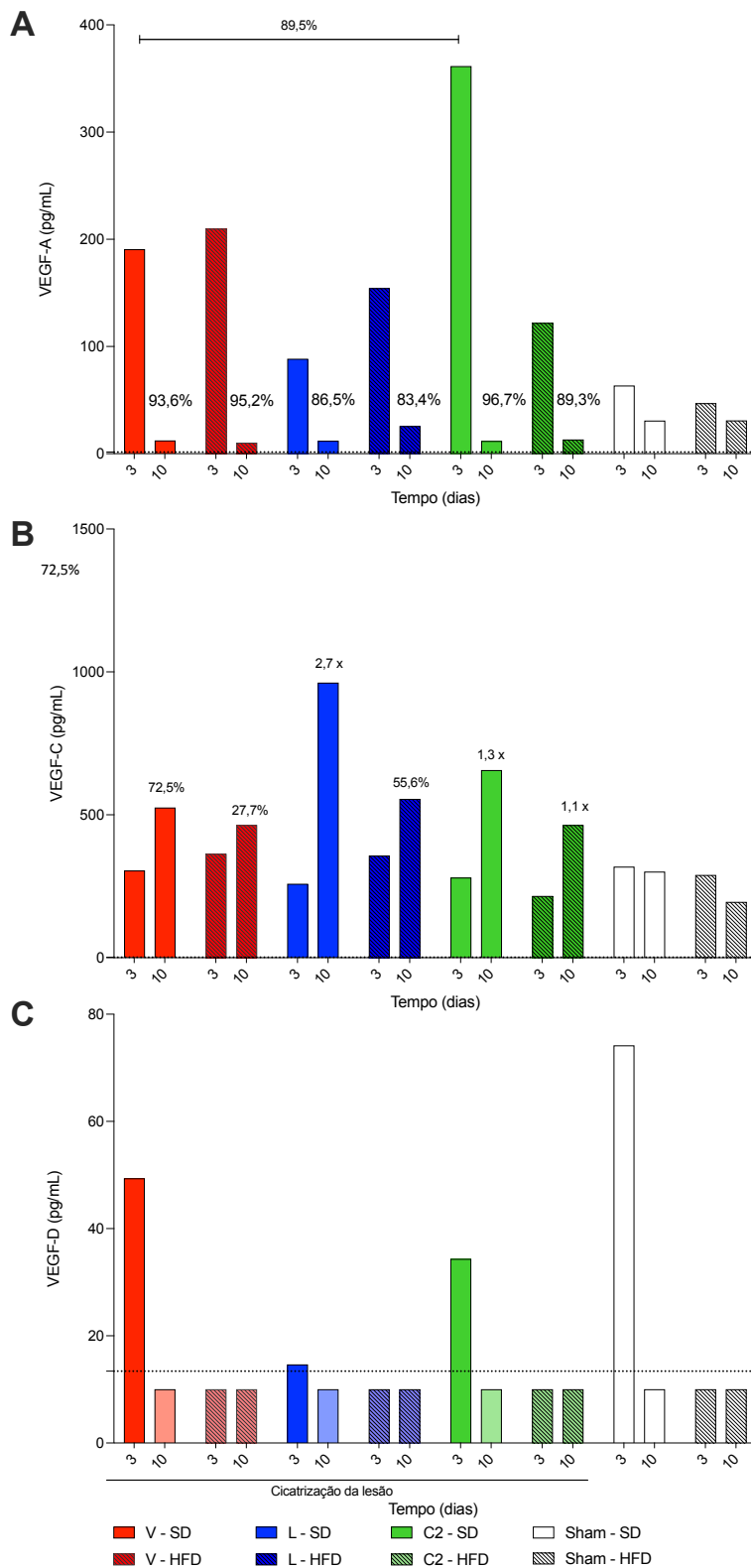


Figura 15 – Evolução temporal da concentração de VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D nas lesões dos animais alimentados com SD (dieta padrão) e HFD (dieta hiperlipídica). Análise descritiva das concentrações no décimo dia em relação ao terceiro dia pós indução de lesão dos animais tratados com V – Veículo, L – Lansoprazol e C2 – Citral (100 mg/kg); e comparação dos tratamentos com seus respectivos veículos. Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou redução.

Quantificação de fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento hepático (HGF)

Ao quantificar EGF, observamos que os grupos tratados com veículo tiveram respostas semelhantes: as concentrações de EGF reduziram entre 3 e 10 dias de tratamento. Entretanto, nos grupos que receberam tratamento com Lansoprazol e citral as respostas foram diferentes de acordo com a dieta recebida pelos animais, as diferenças se mostraram tanto em relação ao tempo de tratamento, como em relação com o grupo veículo (Figura 16-A).

Ao avaliar as concentrações de EGF entre os períodos, observamos que as concentrações de EGF aumentaram 84,2% nos animais tratados com Lansoprazol e reduziram 87,5% nos animais tratados com citral dentre os animais alimentados com SD e, nos animais alimentados com HFD, o EGF diminuiu 92,1% nos animais tratados com Lansoprazol e aumentou 87,9% nos animais tratados com citral.

Quando comparamos os tratamentos em relação ao grupo veículo, podemos observar que entre animais alimentados com SD, o grupo tratado com Lansoprazol apresentou redução de 39,7% e o grupo tratado com citral, aumento de 90,2% na concentração de EGF. Já entre animais alimentados com HFD, o grupo tratado com Lansoprazol teve aumento de 84,2% e o grupo tratado com citral, redução de 83,1%.

O HGF também teve suas concentrações alteradas de acordo com a dieta e tratamento recebidos. Entre os animais alimentados com SD, as concentrações de HGF aumentaram entre 3 e 10 dias de tratamento. Porém, entre animais alimentados com HFD, o grupo tratado com veículo teve as concentrações de HGF reduzidas em 42,3% entre os dois períodos de tratamento; o grupo tratado com Lansoprazol apresentou aumento de 21,7% e o grupo tratado com citral apresentou redução de 2,2% entre os dois períodos de tratamento.

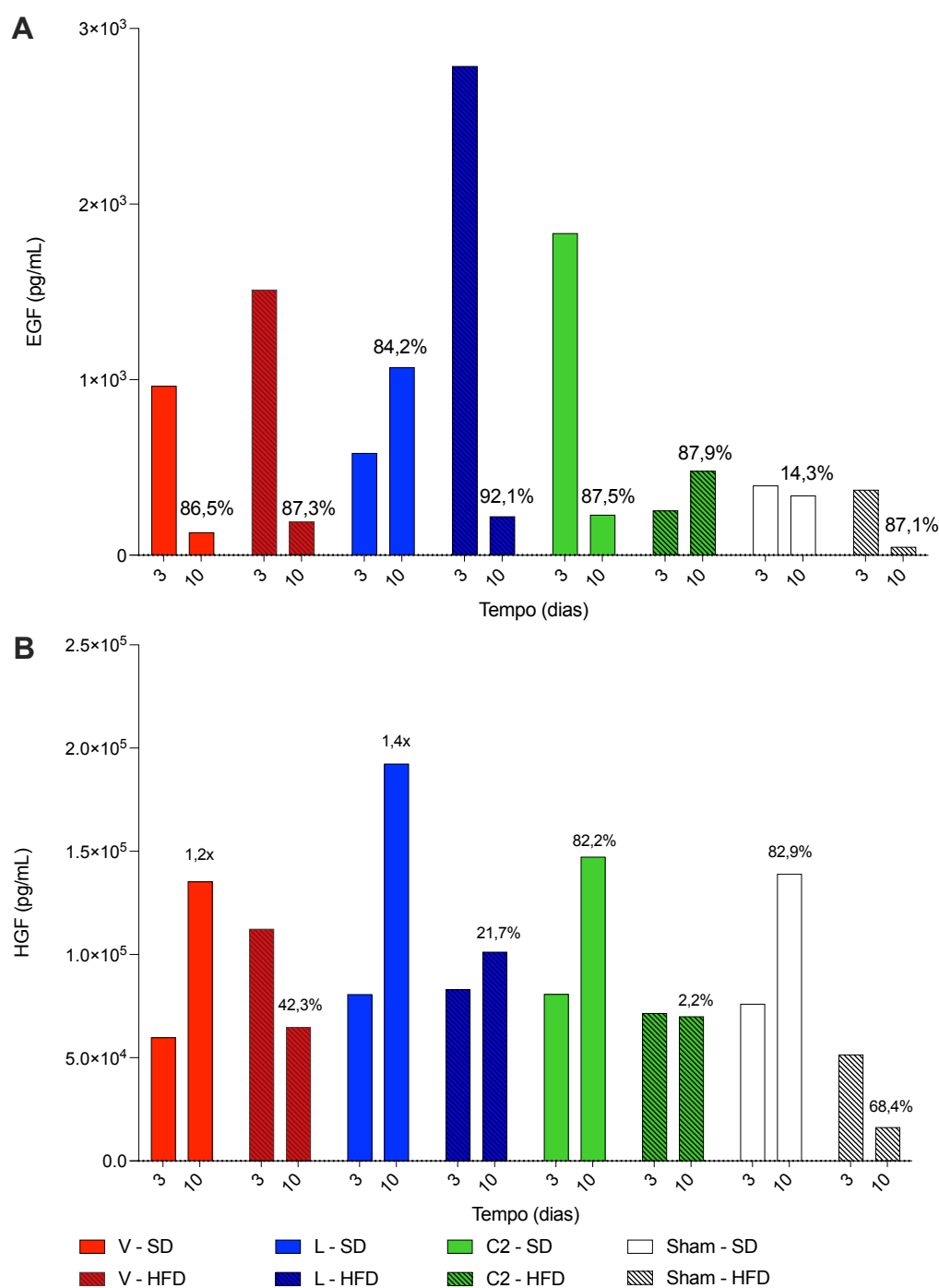


Figura 16 – Evolução temporal da concentração de EGF-A e HGF nas lesões dos animais alimentados com SD (dieta padrão) e HFD (dieta hiperlipídica). Análise descritiva das concentrações no décimo dia em relação ao terceiro dia pós indução de lesão dos animais tratados com V – Veículo, L – Lansoprazol e C2 – Citral (100 mg/kg); e comparação dos tratamentos com seus respectivos veículos. Os resultados estão expressos em porcentagem de aumento ou redução.

Discussão

Neste estudo fizemos comparações entre diferentes tratamentos em relação ao grupo veículo e as diferentes respostas em animais HFD e SD. A menor dose efetiva nesse estudo foi de 100 mg/kg de citral, portanto foi o grupo que selecionamos para quantificar os marcadores de inflamação e fatores de crescimento.

Os fatores inflamatórios, assim como no estudo realizado com camundongos Swiss, se mostraram em maior quantidade na fase inicial da cicatrização e diminuíram ao longo do tempo. Ao compararmos as concentrações de IL-1 β entre animais que receberam dietas diferentes e receberam veículo como tratamento, observamos concentração mais alta de IL-1 β no grupo alimentado com HFD em relação ao grupo SD, o que esperávamos como resultado de associação entre úlcera gástrica e o quadro inflamatório de baixo grau provocado pela ingestão de HFD. No entanto, os resultados observados dos parâmetros inflamatórios mostram que o citral tem ações diferentes em animais que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica. Entre animais alimentados com SD, na fase inicial da cicatrização, tanto o IL-1 β e TNF- α se mostram mais elevados nas lesões de animais tratados com citral quando comparamos com o grupo veículo. Apesar da redução ao longo do tempo, o grupo tratado com citral ainda apresentou concentração de IL-1 β maior em relação ao grupo veículo após 10 dias de tratamento. A concentração de TNF- α do grupo citral também se apresentou maior em relação ao grupo veículo na fase inicial de cicatrização. Com esses dois parâmetros, verificamos que a resposta inflamatória é mais intensa no grupo tratado com citral em relação ao grupo veículo. Em animais alimentados com HFD, podemos observar que o aumento das citocinas pró-inflamatórias no grupo tratado citral em relação ao grupo veículo não ocorreu, mostrando diferentes ações farmacológicas do citral em diferentes situações. Um estudo realizado em células endoteliais microvasculares cardíacas mostrou que a IL-1 β exerce papel na ativação de MMP-2⁵¹, o que se revela uma hipótese interessante para o resultado que obtivemos nesse experimento, em que o grupo que apresentou maior concentração de IL-1 β também apresentou aumento de 8x na ativação da MMP-2.

No estudo realizado com camundongos Swiss, vimos que os VEGF-A, C e D apresentam concentrações diferentes nos períodos avaliados. O pico de VEGF-A ocorre no primeiro dia de cicatrização e diminui ao longo do tempo, enquanto o VEGF-C tem seu pico na fase intermediária da cicatrização e o VEGF-D se apresentou em maiores concentrações no grupo SD em relação ao grupo HFD até o sétimo dia de cicatrização.

Na avaliação do citral sobre a concentração de VEGF-A, podemos observar que o grupo que apresentou maior concentração de IL-1 β também foi o que apresentou maior concentração de VEGF-A, tanto com 3 dias de tratamento, como aos 10 dias de tratamento. Desta forma, podemos confirmar que as concentrações de VEGF-A, principalmente nos grupos alimentados com SD, respondem à resposta inflamatória, assim como visto no estudo realizado com camundongos Swiss.

As concentrações de VEGF-C aumentaram entre três e dez dias de tratamento em todos os grupos. O VEGF-C já foi associado à cronicidade e agravamento da lesão na fase tardia de cicatrização ⁴⁵, e o grupo tratado com Lansoprazol apresentou maior concentração deste marcador aos 10 dias de tratamento, porém esse aumento não foi acompanhado de alterações morfológicas ou de outros parâmetros avaliados.

O VEGF-D foi detectável apenas nos grupos alimentados com SD tratados por três dias. Este resultado está em conformidade com o resultado encontrado no experimento de caracterização do perfil deste marcador realizado em camundongos Swiss, em que até o sétimo dia de cicatrização, o grupo alimentado com SD apresentou concentrações de VEGF-D significativamente maiores que o grupo HFD, sugerindo a influência do tipo de dieta ingerida sobre a resposta desse fator de crescimento. Estudos indicam que a expressão de VEGF-D no tecido adiposo aumenta em resposta à indução de obesidade por HFD ⁵², porém nesse estudo foi possível observar que no processo de cicatrização de úlceras gástricas, esse fator de crescimento apresenta menores concentrações em animais alimentados com HFD.

O EGF é um dos fatores de crescimento mais importantes para o processo de cicatrização e sua atividade está diretamente ligada à ativação de receptores de VEGF ⁵³ além de agir na migração celular e proliferação de fibroblastos para cicatrização ⁹. Quando quantificamos o EGF ao longo do período de cicatrização no experimento do capítulo I do presente trabalho, vimos que os perfis entre animais que receberam SD e HFD foram diferentes. Os animais alimentados com SD apresentaram pico de concentração de EGF no primeiro dia de cicatrização e essa concentração diminuiu ao longo do tempo. Já os animais alimentados com HFD apresentaram um pico de concentração de EGF no terceiro dia de cicatrização. Na avaliação do efeito do citral sobre as concentrações deste marcador, vimos que entre os animais que receberam veículo, tanto no grupo SD como no grupo HFD, tiveram as concentrações de EGF reduzidas ao longo do tempo. Porém, o Lansoprazol e o citral tiveram respostas aos tratamentos administrados que mudaram de acordo com o tipo de dieta ingerida. Entre os animais que receberam SD, os animais tratados com Lansoprazol tiveram a concentração de EGF aumentada entre três e dez dias de tratamento, e no grupo HFD, a concentração de EGF

diminuiu. Já no grupo tratado com citral, a concentração de EGF diminuiu ao longo do tempo de tratamento em animais SD e aumentou nos animais HFD. Existem algumas hipóteses para explicar as diferentes respostas observadas em um mesmo tratamento: a interação direta do tratamento administrado com o alimento ingerido, que pode ocorrer por reações fisiológicas, incluindo alterações no pH, motilidade do trato gastrointestinal ou secreção de ácidos biliares. Além disso, a composição corporal também influencia a farmacocinética do fármaco no que diz respeito à absorção, distribuição e metabolismo do medicamento ⁵⁴.

Nos estudos de cicatrização de úlceras gástricas, é reportado o aumento de HGF na fase tardia da cicatrização ¹⁴, esse aumento também foi observado no experimento realizado com os camundongos Swiss do capítulo I deste trabalho, tanto em animais alimentados com SD, como nos alimentados com HFD. Ao avaliar suas concentrações nas lesões em resposta a diferentes tratamentos, observamos que em todos os grupos alimentados com SD, houve aumento das concentrações de HGF, assim como esperado, e o grupo tratado com Lansoprazol apresentou maiores concentrações deste marcador. Porém, ao avaliar os animais alimentados com HFD, observamos aumento de HGF entre três e dez dias de tratamento apenas no grupo tratado com Lansoprazol. O HGF atua na proliferação, migração e sobrevivência de células epiteliais e endoteliais envolvidas no reparo tecidual ⁴⁸. Apesar de outros marcadores indicarem melhor recuperação da lesão nos animais alimentados com HFD e tratados com citral na dose de 100 mg/kg, vimos que em relação às concentrações de HGF, o citral respondeu de forma oposta à esperada, pois a concentração deste marcador se manteve entre os dois períodos de tratamento avaliados.

Ao avaliar a ação do citral frente à úlcera gástrica associada à obesidade, constatamos que o citral promove diferentes respostas em animais que recebem diferentes dietas. A hipótese inicial desse estudo era de que a condição inflamatória de baixo grau provocada pela obesidade dificultaria a resposta à tratamentos farmacológicos, porém os resultados obtidos até o momento mostraram o contrário.

A variação da resposta farmacológica em animais alimentados com SD e HFD pode ser devido ao aumento do tecido adiposo, que gera o aumento do peso corporal e altera funções fisiológicas como a distribuição do fluxo sanguíneo, modificando a farmacocinética dos medicamentos em indivíduos obesos. Além disso, alguns medicamentos são afetados pela ingestão de alimentos em geral, e sugere-se que dietas com alto teor calórico e lipídico são as que exercem maior efeito sobre as propriedades farmacocinéticas ⁵⁴. Portanto, os resultados observados no presente estudo reiteram a importância de avaliar particularmente a atividade farmacológica em organismos com diferentes condições nutricionais.

Conclusão

Em animais alimentados com SD, o tratamento com citral agravou o processo inflamatório nas lesões, o que não ocorreu nos animais alimentados com HFD. Além disso, os fatores de crescimento apresentaram diferentes respostas de acordo com a dieta recebida. Nos animais alimentados com HFD, o tratamento com citral favoreceu a aceleração da cicatrização por meio da modulação de metaloproteinases de matriz.

Conclusões finais

A partir da caracterização do perfil de cicatrização, constatamos que os fatores envolvidos no processo de cicatrização de úlceras gástricas atuam de diferentes formas em organismos que receberam dietas com composições diferentes. Além disso as respostas à tratamentos também são alteradas de acordo com a dieta ingerida.

- Animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram retardo no processo de cicatrização em relação a animais alimentados com dieta padrão.
- O processo inflamatório presente na fase tardia de cicatrização de animais alimentados com dieta hiperlipídica interferiu na dinâmica entre matriz extracelular e fatores de crescimento.
- A dieta hiperlipídica alterou respostas farmacológicas diante do mesmo tratamento oral.
- O Citral não mostrou ação cicatrizante nas úlceras gástricas de animais alimentados com dieta padrão, porém favoreceu a cicatrização em animais alimentados com dieta hiperlipídica na dose de 100 mg/kg.

Referências bibliográficas

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. *Pesquisa Nacional de Saúde*. (2019).
2. WHO. WHO | Overweight and obesity. *WHO* (2018).
3. Kim, J. *et al.* The Roles and Associated Mechanisms of Adipokines in Development of Metabolic Syndrome. 1–19 (2022).
4. Wu, H. & Ballantyne, C. M. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ. Res.* 1549–1564 (2020).
5. Sampath, C., Wilus, D., Tabatabai, M., Freeman, M. L. & Gangula, P. R. Mechanistic role of antioxidants in rescuing delayed gastric emptying in high fat diet induced diabetic female mice. *Biomed. Pharmacother.* **137**, 111370 (2021).
6. Sogabe, M. *et al.* Influence of metabolic syndrome on upper gastrointestinal disease. *Clin. J. Gastroenterol.* **9**, 191–202 (2016).
7. Boylan, M. R., Khalili, H., Huang, E. S. & Chan, A. T. Measures of Adiposity Are Associated With Increased Risk of Peptic Ulcer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 1688–1694 (2014).
8. Pyo, J. H. *et al.* Obesity and risk of peptic ulcer disease: A large-scale health check-up cohort study. *Nutrients* **11**, 1–10 (2019).
9. Xing, M. *et al.* Human-like collagen promotes the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats by regulating NOS and growth factors. *Food Funct.* **11**, 4123–4137 (2020).
10. DATASUS. Morbidade Hospitalar do SUS - Internações por região segundo ano de atendimento - CID-10: Úlcera gástrica e duodenal. Período: Janeiro de 2018 à Novembro de 2021. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/>. (Acesso em: 16 de janeiro de 2022).
11. Sharifi-Rad, M. *et al.* Antiulcer agents: From plant extracts to phytochemicals in healing promotion. *Molecules* **23**, (2018).
12. Dunlap, J. J. & Patterson, S. Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterol. Nurs.* **42**, 451–454 (2019).
13. Takeuchi, K. & Amagase, K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 2002–2011 (2018).
14. Tarnawski, A. S. & Ahluwalia, A. The critical role of growth factors in gastric ulcer healing: The cellular and molecular mechanisms and potential clinical implications.

- Cells* **10**, (2021).
15. Ito, T. & Jensen, R. T. Association of Long-Term Proton Pump Inhibitor Therapy with Bone Fractures and Effects on Absorption of Calcium, Vitamin B12, Iron, and Magnesium. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **12**, 448–457 (2010).
 16. Kangwan, N. Quality of healing of gastric ulcers: Natural products beyond acid suppression. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **5**, 40 (2014).
 17. Magierowska, K. *et al.* Time-dependent course of gastric ulcer healing and molecular markers profile modulated by increased gastric mucosal content of carbon monoxide released from its pharmacological donor. *Biochem. Pharmacol.* **163**, 71–83 (2019).
 18. Berg, G., Barchuk, M. & Miksztowicz, V. Behavior of Metalloproteinases in Adipose Tissue, Liver and Arterial Wall: An Update of Extracellular Matrix Remodeling. *Cells* **8**, 158 (2019).
 19. Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., Do, L. D. & Hritz, B. G. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells* **9**, 1–34 (2020).
 20. Caley, M. P., Martins, V. L. C. & O'Toole, E. A. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv. Wound Care* **4**, 225–234 (2015).
 21. Li, S. L. *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinase-9 associated with gastric ulcer recurrence. *World J. Gastroenterol.* **19**, 4590–4595 (2013).
 22. Kanno, E. *et al.* Defect of interferon γ leads to impaired wound healing through prolonged neutrophilic inflammatory response and enhanced MMP-2 activation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 23. Derosa, G. *et al.* Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Levels in Obese Patients. *Endothel. J. Endothel. Cell Res.* **15**, 219–224 (2008).
 24. Setzer, W. N. & Byler, K. G. *In-silico Approaches to Natural Products Drug Discovery: A Review of the Recent Literature. Natural Products and Drug Discovery: From Pharmacochemistry to Pharmacological Approaches* (2018).
 25. Bailly, C. Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereoisomers. *Eur. J. Pharmacol.* **871**, 172945 (2020).
 26. Citral | $C_{10}H_{16}O$ - PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638011>. (Acesso em: 26 de janeiro de 2022).
 27. Nishijima, C. M. *et al.* Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic antinociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **736**, 16–25 (2014).

28. Périco, L. L. *et al.* Systematic analysis of monoterpenes: Advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. *Biomolecules* **10**, 265 (2020).
29. Gotardo, É. M. F. *et al.* Mice that are fed a high-fat diet display increased hepcidin expression in adipose tissue. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **59**, 454–461 (2013).
30. Resources, A. Veterinary Recommended Anesthetic Plans for Rodents. 2–3 (2019).
31. Okabe, S., Roth, J. L. A. & Pfeiffer, C. J. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats - Observations on normal healing. *Am. J. Dig. Dis.* **16**, 277–284 (1971).
32. Steffensen, B., Häkkinen, L. & Larjava, H. Proteolytic Events of Wound-Healing — Coordinated Interactions Among Matrix Metalloproteinases (MMPs), Integrins, and Extracellular Matrix Molecules. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **12**, 373–398 (2001).
33. Camilleri, M., Malhi, H. & Acosta, A. Gastrointestinal Complications of Obesity. *Gastroenterology* **152**, 1656–1670 (2017).
34. Wang, F.-W. Prevalence and risk factors of asymptomatic peptic ulcer disease in Taiwan. *World J. Gastroenterol.* **17**, 1199 (2011).
35. Lee, B. J., Kim, J. & Kim, K. H. Association of gastric and duodenal ulcers with anthropometry and nutrients: Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES II-IV) 2001-2009. *PLoS One* **13**, e0207373 (2018).
36. Jaoude, J. & Koh, Y. Matrix metalloproteinases in exercise and obesity. *Vasc. Health Risk Manag.* **12**, 287–295 (2016).
37. Kleinert, M. *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 140–162 (2018).
38. Arita, S., Kinoshita, Y., Ushida, K., Enomoto, A. & Inagaki-Ohara, K. High-fat diet feeding promotes stemness and precancerous changes in murine gastric mucosa mediated by leptin receptor signaling pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **610**, 16–24 (2016).
39. Mirza, R. E., Fang, M. M., Ennis, W. J. & Koh, T. J. Blocking Interleukin-1 β Induces a Healing-Associated Wound Macrophage Phenotype and Improves Healing in Type 2 Diabetes. *Diabetes* **62**, 2579–2587 (2013).
40. Dai, J., Shen, J., Chai, Y. & Chen, H. IL-1 β Impaired Diabetic Wound Healing by Regulating MMP-2 and MMP-9 through the p38 Pathway. *Mediators Inflamm.* **2021**, 1–10 (2021).
41. Maquart, F. X. & Monboisse, J. C. Extracellular matrix and wound healing. *Pathol. Biol.* **62**, 91–95 (2014).

42. Mushimiyimana, I. *et al.* Genomic Landscapes of Noncoding RNAs Regulating VEGFA and VEGFC Expression in Endothelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* **41**, (2021).
43. Regenfuss, B. & Cursiefen, C. Concept of Angiogenic Privilege. in *Encyclopedia of the Eye* 334–338 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-12-374203-2.00121-4
44. Rauniyar, K., Jha, S. K. & Jeltsch, M. Biology of Vascular Endothelial Growth Factor C in the Morphogenesis of Lymphatic Vessels. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **6**, (2018).
45. Taghizadeh, S. *et al.* Expression Levels of Vascular Endothelial Growth Factors A and C in Patients with Peptic Ulcers and Gastric Cancer. *J. Gastric Cancer* **14**, 196 (2014).
46. Gangadaran, P. *et al.* Identification of Angiogenic Cargoes in Human Fibroblasts-Derived Extracellular Vesicles and Induction of Wound Healing. *Pharmaceuticals* **15**, 702 (2022).
47. Rissanen, T. T. *et al.* VEGF-D Is the Strongest Angiogenic and Lymphangiogenic Effector Among VEGFs Delivered Into Skeletal Muscle via Adenoviruses. *Circ. Res.* **92**, 1098–1106 (2003).
48. Mungunsukh, O., McCart, E. & Day, R. Hepatocyte Growth Factor Isoforms in Tissue Repair, Cancer, and Fibrotic Remodeling. *Biomedicines* **2**, 301–326 (2014).
49. Chmielowiec, J. *et al.* c-Met is essential for wound healing in the skin. *J. Cell Biol.* **177**, 151–162 (2007).
50. Brzozowski, T. *et al.* Effect of Local Application of Growth Factors on Gastric Ulcer Healing and Mucosal Expression of Cyclooxygenase-1 and -2. *Digestion* **64**, 15–29 (2001).
51. Mountain, D. J. H., Singh, M., Menon, B. & Singh, K. Interleukin-1 β increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells: role of PKC α/β 1 and MAPKs. *Am. J. Physiol. Physiol.* **292**, C867–C875 (2007).
52. Chakraborty, A., Scogin, C. K., Rizwan, K., Morley, T. S. & Rutkowski, J. M. Characterizing Lymphangiogenesis and Concurrent Inflammation in Adipose Tissue in Response to VEGF-D. *Front. Physiol.* **11**, (2020).
53. Sato, T. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling facilitates gastric ulcer healing and angiogenesis through the upregulation of epidermal growth factor expression on VEGFR1+CXCR4+ cells recruited from bone marrow. *J. Gastroenterol.* **49**, 455–469 (2014).
54. Niederberger, E. & Parnham, M. J. The Impact of Diet and Exercise on Drug Responses. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7692 (2021).