



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



AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO CITRAL NA DOENÇA
DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO EM CAMUNDONGOS
EUTRÓFICOS E OBESOS



ANA CAROLINA FIORETTO

BOTUCATU – SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Avaliação do efeito protetor do citral na doença do refluxo
gastroesofágico em camundongos eutróficos e obesos

ANA CAROLINA FIORETTO

PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA
PROF. DRA. LÚCIA REGINA MACHADO DA ROCHA

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

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: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Fioretto, Ana Carolina.

Avaliação do efeito protetor do citral na doença do refluxo gastroesofágico em camundongos eutróficos e obesos / Ana Carolina Fioretto. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima

Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha

Capes: 20700008

1. Camundongos. 2. Obesidade. 3. Citral. 4. Refluxo gastroesofágico. 5. Óleos voláteis.

Palavras-chave: Camundongo C57BL/J6; Citral; Obesidade; Refluxo gastroesofágico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais por me apoiarem na jornada acadêmica, as minhas irmãs gêmeas do meio, Nicolle e Manoella, por confiarem em mim até aqui e a minha irmã caçula Ana Luiza por, sem querer, me incentivar em todas as etapas.

Deixo aqui também, meus eternos agradecimentos à minha avó, que partiu no meio desse meu processo e infelizmente não pôde ver em vida a conclusão de todo meu progresso, mas que sempre foi a pessoa que mais me incentivou e me acompanhou desde o início, à senhora, todas as minhas conquistas.

Além disso, gostaria de agradecer a todos meus colegas de laboratório, pois sem eles a realização desse projeto não seria possível.

Ao Maycon, por me acompanhar e me dar a mão desde o início da minha iniciação científica até a finalização da minha dissertação, mesmo que de longe. Maycon, você me ensinou muito durante todo esse processo e se tornou um grande amigo, um exemplo para mim.

A Rie, por toda paciência em me acompanhar em cada experimento longo, desde meu início no laboratório até o final, obrigada por sempre estar disposta a me acompanhar aos sábados e domingos na faculdade, você me ensinou demais.

Ao Garboso por todas as incansáveis dúvidas que estive disposto a me ajudar e por todas as tarde e noites que estive disposto a me ajudar na faculdade.

A Renata e Gabriela, por sempre estarem dispostas a me ajudar desde o início, seja bem cedo ou de noite, obrigada por nunca medirem esforços, por sempre estarem de braços abertos nessa jornada, vocês foram muito importantes.

Gostaria também de agradecer a todos meus colegas de laboratório, que me deram as mãos, me incentivaram e me ajudaram em cada detalhe desse trabalho, Felipe, Priscila e Victória, vocês me apoiaram e me ajudaram demais nessa etapa. Obrigada por me ajudarem durante vários sábados e noites naquele departamento.

Gostaria de deixar um agradecimento especial a professora Clélia, que de braços abertos me recebeu, me acolheu, me orientou, me ensinou, foi paciente e extremamente atenciosa em cada detalhe. Obrigada, professora, por ser também compreensiva em todos os quesitos em que precisei. Obrigada por tanta paciência, tanta atenção e tanto cuidado que teve comigo até a conclusão desse trabalho. Eu não seria a mesma pessoa sem todos os ensinamentos que me proporcionou.

Obrigada, professora Lúcia, por me acompanhar do início ao fim, por ser cuidadosa e estar disposta a me ensinar em todos os detalhes, por ser todo aquele ensinamento essencial, seja na vida acadêmica e em todos os outros quesitos da vida.

Além disso, gostaria de deixar aqui meus agradecimentos a todos meus companheiros de vida Matheus, Bruna, Monique, Gustavo, Mariana, Giovana, Larissa, Romário, Háley e Filipe, que me acompanharam do início ao fim e foram fundamentais, cada um em seu modo particular, nesse meu percurso. Vocês são especiais, obrigada por me motivarem durante todo esse processo.

PRÓLOGO

A realização do presente projeto de mestrado possibilitou a elucidação da ação preventiva do citral na doença do refluxo gastroesofágico em animais eutróficos e obesos. Adicionalmente a execução desse projeto, realizei atividades complementares de cunho científico e também de extensão universitária e de popularização a ciência que enriqueceram minha formação científica e pessoal.

Publicações em eventos científicos:

- **Fioretto, A.C.**; Ohara, R.; Emílio-Silva, M.T.; Rodrigues, V.P.; Bueno, G.; Assunção, R.; Dario, F.L.; Gomes, V.G.; Raimundo, P.R.; Rocha, L.R.M.; Hiruma-Lima, C.A. Evaluation of protective effect of citral on gastroesophageal reflux disease in eutrophic and obese mice. 7th Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering.
- Bueno, G.; Rodrigues, V.P.; Ohara, R.; Emílio-Silva, M.T.; Assunção, R.; Gomes, V.G.; Dario, F.L.; Raimundo, P.R.; **Fioretto, A.C.**; Rocha, L.R.M.; Hiruma-Lima, C.A. Effect of *Baccharis trimera* Less (DC) essential oil in obese mice on a high-fat diet, part 1. adipose tissues evaluation. 7th Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering.
- Ohara, R.; Dario, F.L.; Bueno, G.; Rodrigues, V.P.; Emílio-Silva, M.T.; Assunção, 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. 7th Conference on Molecular, Biomedical & Computational Sciences and Engineering.

Participação em eventos científicos:

- Simpósio Anual da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, 2020.
- IV Simpósio de Farmácia da UnB, 2020.
- I Simpósio de Fisiologia e Farmacologia Experimental, 2020.
- Simpósio Anual da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, 2021.
- I Semana da Imunologia, UFC, Fortaleza, 2021

Extensão universitária:

- Monitora do curso “Reprodução de A a Z”, como parte das atividades do Programa 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, 2021. Duração de 48 horas.

Disciplinas cursadas:

- Tópicos especiais em biologia geral e aplicada. Conceito: A. (2 créditos).
- Interação entre a pós-graduação e o ensino básico de ciências e biologia. Conceito: A. (6 créditos).
- Imunomodulação por produtos naturais. Conceito: A. (6 créditos).
- Metabolismo de DNA: replicação, reparo e dinâmica telomérica. Conceito: A. (4 créditos).
- Tópicos especiais em biologia geral e aplicada: aplicações de óleos essenciais como antimicrobianos naturais. Conceito: A. (2 créditos).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Dieta hiperlipídica para indução de obesidade	25
3.3 Índice de Adiposidade.....	27
3.4 Ingestão Alimentar	27
3.5 Aporte Calórico.....	27
3.7 Cirurgia para indução de esofagite e coleta de materiais	28
3.8 Medida do pH esofágico.....	29
3.9 Determinação de parâmetros bioquímicos do esôfago.....	29
3.9.1. Determinação de Superóxido dismutase (SOD)	29
3.9.2. Determinação da atividade da Catalase (CAT)	30
3.9.3. Determinação de Glutathione Reduzida (GSH).....	30
3.9.4 Determinação da atividade da MPO	31
3.10 Quantificação Zimográfica das metaloproteinases 2 e 9	31
3.11 Quantificação de citocinas (Luminex)	31
3.12 Testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI).....	32
3.13 Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatório não esteroideal
ANOVA	Análise de variância
CT	Citral
DP	Dieta padrão
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HCl	Ácido clorídrico
HFD	<i>High fat-diet</i>
IBP	Inibidores da bomba de prótons
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
JGE	Junção gastroesofágica
LZ	Lansoprazol
IMC	Índice de massa corporal
MEC	Matrix extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
OMS	Organização Mundial da Saúde
TA	Tecido adiposo
TG	Triglicerídeos
TLR	Receptor do tipo toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TTG	Teste de tolerância à glicose
TTI	Teste de tolerância à insulina

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Técnicas disponíveis para o diagnóstico e compreensão da fisiopatologia da DRGE.

Adaptado de Vaezi *et al.*, 2018.

Figura 02. Diagrama representando a sequência inflamação-displasia-carcinoma do esôfago.

Adaptado de Kelleher *et al.*, 2009.

Figura 03. Apresentação esquemática da relação entre as formas de defesa antioxidantes com as fontes de radicais livres e seus efeitos no corpo humano. Adaptado de Sharifi-Rad *et al.*, 2020.

Figura 04. Estrutura dos dois isômeros cis e trans do Citral: geranial (isômero E) e neral (isômero Z). $C_{10}H_{16}O$, 3,7-dimetil-2,6-octadienal. Adaptado de C. Bailly, 2020.

Figura 05. Modelo de indução de esofagite: sob anestesia inalatória com isoflurano, foi realizada a ligadura do fundo do estômago e do piloro. Transcorrido 4 horas do procedimento, os animais foram eutanasiados e o esôfago foi removido para análise das lesões. Adaptado de Takeuchi e Nagahama, 2014.

Figura 06. Linha do tempo: representação do tratamento agudo dos animais por via oral na hora 0 (início do procedimento), seguido da indução da esofagite na hora 1 com duração de 4 horas e posteriormente a eutanásia na hora 5.

Figura 07. Evolução da massa corporal dos animais (DP – dieta padrão; HFD – dieta hiperlipídica) durante o período de 18 semanas de indução da obesidade. Os resultados foram expressos com média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Figura 08. Índice de adiposidade dos animais que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. **** $p < 0,0001$ ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Figura 09. (A) e (B) Ingestão alimentar e aporte calórico dos animais que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. *****p* < 0,0001 ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Figura 10. (A) e (B) Glicemia basal dos animais submetidos ao TTI e TTG. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. *****p* < 0,0001 ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Figura 11. (A) e (C) Glicemia dos animais no período de 120 minutos para avaliação da tolerância a insulina (TTI) ou glicose (TTG). (B) e (D) AUC dos animais submetidos ao TTI e TTG. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001 ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Figura 12. Análise da área total de lesão no esôfago de animais submetidos ao modelo agudo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Avaliação do efeito preventivo do citral (Citral 25, 100 ou 300 mg/kg). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey **p* < 0,5; ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001 ao comparar com o grupo controle negativo (Tween).

Figura 13. Esôfagos de animais eutróficos submetidos a esofagite induzida por dupla ligadura no estômago. (A) Esôfago de animal tratado com veículo (tween). (B) Esôfago de animal tratado com lansoprazol. (C) Esôfago de animal tratado com citral 25 mg/kg. (D) Esôfago de animal tratado com citral 100 mg/kg. (E) Esôfago de animal tratado com citral 300 mg/kg. (F) Esôfago de animal Sham.

Figura 14. Esôfagos de animais obesos submetidos a esofagite induzida por dupla ligadura no estômago. (A) Esôfago de animal tratado com veículo (tween). (B) Esôfago de animal tratado com

lansoprazol. (C) Esôfago de animal tratado com citral 25 mg/kg. (D) Esôfago de animal tratado com citral 100 mg/kg. (E) Esôfago de animal tratado com citral 300 mg/kg. (F) Esôfago de animal Sham.

Figura 15. Análise da medida do pH esofágico dos animais submetidos ao modelo agudo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD), respectivamente. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ ao comparar com o grupo controle negativo (Tween) e # $p < 0,01$ ao comparar com o grupo Sham.

Figura 16. Análise da medida do pH do esôfago de animais submetidos ao modelo agudo de esofagite com diferentes tratamentos que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). (A) Tween, (B) Lansoprazol, (C) Citral 25 mg/kg, (D) Citral 100 mg/kg, (E) Citral 300 mg/kg e (F) Sham. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste t de Student. * $p < 0,1$ e ** $p < 0,01$ ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Figura 17. (A), (B) e (C) Análise da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH no esôfago de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Avaliação do efeito preventivo do citral (Citral; 25, 100 ou 300 mg/kg). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ ao comparar com o grupo controle negativo (Tween) e # $p < 0,05$ ao comparar com o grupo Sham.

Figura 18. Análise da atividade da enzima antioxidante CAT no esôfago de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste t de Student. * $p < 0,1$ ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Figura 19. Análise da atividade da enzima MPO no esôfago de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Avaliação do efeito preventivo do citral (Citral; 25, 100 ou 300 mg/kg). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ ao comparar com o grupo Tween.

Figura 20. Níveis séricos de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α em animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Avaliação do efeito preventivo do citral (Citral; 25, 100 ou 300 mg/kg). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey. # $p < 0,1$ e ## $p < 0,01$ ao comparar os grupos controle negativo (Tween) e Citral na dose de 300 mg/kg ao grupo Sham na DP.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das rações utilizadas na dieta padrão e hiperlipídica (HFD).

Tabela 2. Análise da atividade de CCL2/MCP-1 no soro de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental. #p < 0,05 ao comparar o grupo CT 25 ao grupo Sham na HFD.

Tabela 3. Análise da atividade de IFN- γ no soro de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental. #p < 0,05 ao comparar o grupo CT 300 ao grupo Sham na HFD.

Tabela 4. Análise da atividade de MMP-2 no tecido esofágico de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental.

Tabela 5. Análise da atividade de MMP-9 no tecido esofágico de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental.

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde vem alertando sobre a epidemia de obesidade que tomou proporções globais. Estudos têm demonstrado a prevalência de doenças associadas à obesidade, dentre elas a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), uma condição crônica proveniente do refluxo do conteúdo estomacal, que ocasiona lesões teciduais e sintomas como azia e regurgitação ácida. A DRGE aumenta fatores de estresse oxidativo (EO), que produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) e causam danos ao tecido. O combate ao EO pode ocorrer através de enzimas, como o superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) ou de antioxidantes não enzimáticas como a glutatona reduzida (GSH). Células de defesa também estão presentes nesse processo, como os neutrófilos que secretam a enzima mieloperoxidase (MPO). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6, atuam na resposta inflamatória e induzem o agravo ocasionado pelo refluxo. Um ponto importante na recuperação do tecido esofágico é o processo de remodelagem, controlado pela atividade de metaloproteinases de matriz (MMP), que regulam a cicatrização dos danos teciduais. Atualmente, a terapia farmacológica utilizada para o tratamento da DRGE é o uso dos fármacos inibidores da bomba de prótons (IBPs), como o lansoprazol (LZ), que atuam na inibição da liberação de íons H⁺ para o lúmen gástrico. Na maioria das vezes, os IBPs são eficazes, mas seu tratamento a longo prazo pode gerar efeitos colaterais, como diarreia, náusea e complicações renais. Novos agentes terapêuticos, como produtos provenientes de plantas medicinais que são opções terapêuticas com eficácia. Dentre eles, encontra-se o citral (CT), um monoterpene presente em óleos essenciais de plantas, como o capim-limão. Esse monoterpene possui diversas propriedades farmacológicas comprovadas, como: anti-inflamatórias, anti-diabéticas, anti-adipogênicas e ação gastroprotetora no tratamento de úlceras induzidas por fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Contudo, não existem dados na literatura, que demonstrem a ação do CT no combate à DRGE. Em face a essa lacuna, esse estudo se propôs a avaliar o efeito do CT na DRGE em animais eutróficos e obesos. Foram utilizados camundongos machos (C57BL/J6) que receberam dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (HFD), por 18 semanas, para indução da obesidade. Posteriormente, avaliamos o efeito preventivo do citral (25, 100 ou 300 mg/kg) frente a DRGE. Os camundongos foram tratados oralmente por gavagem e, após uma hora, foram submetidos ao procedimento cirúrgico de indução do refluxo gastroesofágico, sendo eutanasiados após quatro horas para coleta do esôfago. Nossos resultados demonstram que o tratamento prévio com CT nos animais que receberam ambas as dietas foi efetivo na prevenção das lesões induzidas pelo refluxo gastroesofágico, em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Além disso, no grupo DP houve diminuição do pH esofágico dos animais que receberam a dose de 100 mg/kg de CT, quando comparado ao grupo Sham. No grupo HFD, houve um aumento significativo do pH esofágico nos grupos tratados com LZ e com CT (300 mg/kg) quando comparados aos grupos veículo ou Sham ($p < 0,01$). Observou-se uma diminuição significativa dos níveis de CAT nos animais tratados com LZ e CT do grupo DP (25, 100 ou 300 mg/kg), porém em comparação ao grupo Sham. Com relação aos níveis de SOD e GSH, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, em ambas as dietas. A atividade da enzima MPO foi quantificada e houve uma redução significativa em sua atividade nos animais tratados com CT na dose de 300 mg/kg, quando comparado ao grupo veículo no grupo DP ($p < 0,05$). No grupo HFD, a redução da atividade da MPO foi evidenciada nos grupos LZ e CT (100 ou 300 mg/kg) quando comparado ao grupo veículo DP ($p < 0,05$). Por outro lado, o tratamento com CT não promoveu alterações significativas nos níveis de MMP-2 e 9 do tecido esofágico. Também, observamos um aumento significativo da IL-6 no grupo tratado com CT (300 mg/kg) quando comparado ao grupo Sham, em ambas as dietas. Além disso, os resultados mostraram um aumento significativo de TNF- α nos animais tratados com CT (300 mg/kg) quando comparado ao grupo Sham que recebeu DP. Sendo assim, esse trabalho demonstrou que o CT apresentou uma ação protetora na DRGE nos grupos tratados com CT, porém observamos uma maior efetividade no grupo que recebeu HFD de acordo com os parâmetros avaliados.

Palavras chave: obesidade; refluxo gastroesofágico; citral; camundongo C57BL/J6.

ABSTRACT

The World Health Organization has been warning about the obesity epidemic that has taken global proportions. Studies have shown the prevalence of diseases associated with obesity, including gastroesophageal reflux disease (GERD), a chronic condition resulting from the reflux of stomach contents, which causes tissue damage and symptoms such as heartburn and acid regurgitation. GERD increases oxidative stress (OS) factors, which produce reactive oxygen species (ROS) and cause tissue damage. Combating EO can occur through enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) or non-enzymatic antioxidants such as reduced glutathione (GSH). Defense cells are also present in this process, such as neutrophils that secrete the enzyme myeloperoxidase (MPO). Elevated levels of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6, act on the inflammatory response and induce the harm caused by reflux. An important point in the recovery of esophageal tissue is the remodeling process, controlled by the activity of matrix metalloproteinases (MMP), proteases that regulate the healing of tissue damage. Currently, the pharmacological therapy used to treat GERD is the use of proton pump inhibitors (PPIs), such as lansoprazole (LZ), which act by inhibiting the release of H⁺ ions into the gastric lumen. Most of the time, PPIs are effective, but their long-term treatment can lead to side effects such as diarrhea, nausea and kidney complications. New therapeutic agents, such as products from medicinal plants that are effective therapeutic options. Among them is citral (CT), a monoterpene present in essential oils from plants, such as lemongrass. This monoterpene has several proven pharmacological properties, such as: anti-inflammatory, anti-diabetic, anti-adipogenic and gastroprotective action in the treatment of ulcers induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). However, there are no data in the literature that demonstrate the action of CT in the fight against GERD. In view of this shortcoming, this study aimed to evaluate the effect of CT on GERD in eutrophic and obese animals. Male mice (C57BL/J6) that received standard diet (SD) or high-fat diet (HFD) for 18 weeks were used to induce obesity. Subsequently, we evaluated the preventive effect of citral (25, 100 or 300 mg/kg) against GERD. The mice were treated orally by gavage and, after one hour, they were submitted to the surgical procedure to induce gastroesophageal reflux, being euthanized after four hours for collection of the esophagus. Our results demonstrate that previous treatment with CT in animals that received both diets was effective in preventing lesions induced by gastroesophageal reflux, in relation to the group treated with vehicle ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively). In addition, in the SD group there was a decrease in the esophageal pH of the animals that received a dose of 100 mg/kg of CT, when compared to the Sham group. In the HFD group, there was a significant increase in esophageal pH in the LZ and CT (300 mg/kg) treated groups when compared to the vehicle or Sham groups ($p < 0.01$). There was a significant decrease in CAT levels in animals treated with LZ and CT in the SD group (25, 100 or 300 mg/kg), but in comparison to the Sham group. Regarding the levels of SOD and GSH, no significant difference was observed between treatments, in both diets. The activity of the MPO enzyme was quantified and there was a significant reduction in its activity in the group of animals treated with CT at a dose of 300 mg/kg, when compared to the vehicle group in the DP group ($p < 0.05$). In the HFD group, the reduction of MPO activity was evidenced in the LZ and CT groups (100 or 300 mg/kg) when compared to the SD vehicle group ($p < 0.05$). On the other hand, treatment with CT did not promote significant changes in the levels of MMP-2 and 9 in the esophageal tissue. Also, we observed a significant increase in IL-6 in the group treated with CT (300 mg/kg) when compared to the Sham group, in both diets. Furthermore, the results showed a significant increase in TNF- α in the animals treated with CT (300 mg/kg) when compared to the Sham group that received SD. Thus, this study demonstrated that CT had a protective action on GERD in the groups treated with CT, but we observed greater effectiveness in the group that received HFD according to the evaluated parameters.

Keywords: obesity; gastroesophageal reflux; citral; C57BL/J6 mouse.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A obesidade é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode apresentar riscos para saúde¹. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é um problema de saúde pública que ganhou destaque nos últimos anos. Atualmente, no mundo há mais pessoas obesas do que abaixo do peso, exceto em locais como África subsariana e Ásia¹. O que antes era considerado um problema para países de alta renda, agora também acomete países de baixa e média renda, em particular nas áreas urbanas¹. Tal questão se agravou para proporções epidêmicas, ocasionando 4 milhões de mortes por ano em decorrência do excesso de peso¹.

Um importante parâmetro para avaliar o peso corporal em humanos é o índice de massa corporal (IMC), que considera valores acima de 25 como sobrepeso, e acima de 30 como obesidade¹. Avaliações epidemiológicas demonstraram um aumento na incidência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes¹. Em 2017, mais de 1,9 bilhões de pessoas (acima de 18 anos) no mundo se encontravam acima do peso (13% da população adulta), entre eles 650 milhões apresentavam obesidade, sendo 11% homens e 15% mulheres¹. No Brasil, segundo um estudo realizado pelo Ministério da Saúde em 2019, a frequência de adultos obesos foi de 20,3%, sendo semelhantes entre homens e mulheres².

A obesidade se desenvolve quando a quantidade de calorias ingeridas diariamente excede a quantidade de calorias gastas com os processos metabólicos do organismo, ocasionando um aumento do tecido adiposo (TA)³. O quadro obesogênico pode resultar de um acometimento multifatorial que envolve variáveis genéticas e ambientais³. Recentemente, o acúmulo de TA visceral têm sido associado ao desenvolvimento de várias outras doenças, como por exemplo, dislipidemia, resistência à insulina, doenças cardiovasculares e hipertensão, além de reduzir a expectativa de vida do paciente⁴.

Um dos parâmetros mais importantes ligados à obesidade é um quadro inflamatório crônico e sistêmico de baixo grau, devido ao excedente metabólico e acúmulo excessivo de gordura³. Porém, a resposta inflamatória encontrada na obesidade é diferente de inflamações clássicas, as quais apresentam os sinais de vermelhidão, dor, calor, edema e perda de função^{5,6}.

A inflamação crônica que ocorre na obesidade deriva de mudanças progressivas em células inflamatórias, destruição e reparação tecidual, devido ao desenvolvimento do processo inflamatório⁷. Além disso, as combinações de outros fatores também participam da manutenção desse quadro. Por exemplo, a dieta hiperlipídica (HFD) que ocasiona a inflamação do TA logo no começo de sua ingestão. A expansão rápida do TA que ocorre subsequentemente a ingestão da HFD, não possibilita que a vascularização aconteça de forma concomitante, fazendo com que o aporte sanguíneo do tecido não seja adequado, resultando num quadro de hipóxia⁸. Isso resulta no aumento das concentrações plasmáticas de mediadores e células inflamatórias ativadas na corrente sanguínea⁷. Com isso, essa inflamação crônica e sistêmica de baixo grau que ocorre no TA, é transferida para outros tecidos⁹.

Os adipócitos, células que compõem o TA, são sensíveis a sinais inflamatórios mediados por citocinas, e através de seus receptores, ativam cascatas de transdução de sinal, promovendo a inflamação através da produção de citocinas pró-inflamatórias; tais como interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α e proteínas da matriz extracelular que desencadeiam a infiltração de células imunes tornando o ambiente propício para que a inflamação se propague^{10,11}.

Esse quadro de inflamação crônica de baixo grau característico na obesidade têm sido associado à outras doenças inflamatórias como a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE)¹², condição que se desenvolve quando há refluxo do conteúdo estomacal e regurgitação ácida, lesionando a mucosa esofágica e causando complicações como esofagite erosiva, estenose esofágica, esôfago de *Barret* e câncer de esôfago¹³. A DRGE é um distúrbio comum em todas as

faixas etárias e decorre da exposição excessiva ao conteúdo estomacal regurgitado, ocasionando lesões teciduais e desequilíbrio nos fatores de defesa da mucosa, como o bicarbonato e muco¹⁴. Atualmente, existem diversos testes de diagnósticos e avaliações no âmbito médico-científico para a caracterização da doença, como mostra a Figura 01.

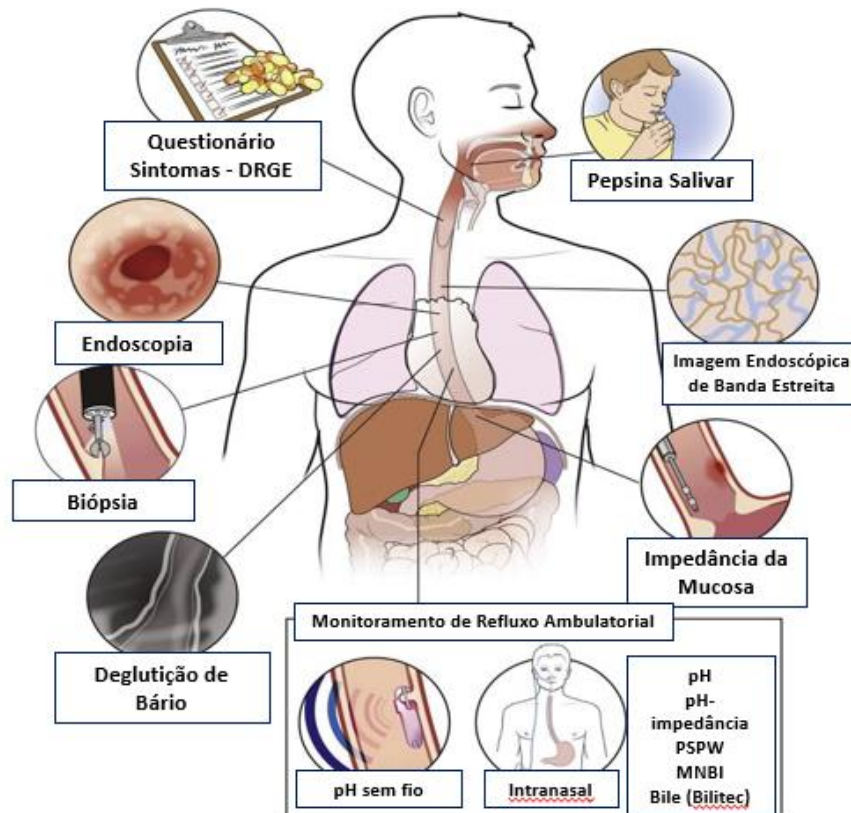


Figura 01. Técnicas disponíveis para o diagnóstico e compreensão da fisiopatologia da DRGE. Adaptado de Vaezi *et al.*, 2018¹⁵.

Na obesidade, o risco de desenvolvimento de DRGE aumenta, e diferentes fatores podem estar envolvidos, como o aumento da pressão intra-abdominal, hérnia hiatal, além de uma dieta exclusivamente rica em lipídeos^{12,16}. Estudos demonstraram que o quadro obesogênico altera a pressão na junção gastroesofágica (JGE), de maneira a favorecer o refluxo¹⁷. Além disso, os níveis elevados de IMC podem estar intimamente relacionados com o aumento da pressão intragástrica e o gradiente de pressão na JGE. Esses fatores corroboram ainda mais com a hipótese de que o aumento da massa corporal facilita o desenvolvimento da DRGE¹⁷. O TA visceral abdominal é

também, responsável por romper a integridade da barreira da junção gastroesofágica e levar ao aumento do refluxo esofágico¹⁸. Além disso, a gordura visceral é metabolicamente ativa e aumenta a quantidade de citocinas pró-inflamatórias circulantes¹⁹.

A fisiologia da mucosa esofágica envolve uma manutenção eficiente da barreira do esôfago, evitando o refluxo do conteúdo gástrico para o lúmen esofágico²⁰. Dessa forma, a manutenção da integridade da barreira da mucosa esofágica é fundamental para minimizar os efeitos da DRGE²¹. Para que a mucosa esofágica exerça a sua função de barreira, é de suma importância que ocorra a regulação da remodelação tecidual²². As metaloproteinases de matriz (MMP) são proteases de matriz extracelular (MEC) que regulam a cicatrização envolvendo os danos teciduais e facilitam o processo de migração de diferentes tipos celulares durante o processo de colagenização^{23,24,25}. Dois membros-chave da família MMP são a matriz metaloproteinase-2 (MMP-2, gelatinase de 72 kDa, chamada colagenase tipo IV) e a matriz metaloproteinase-9 (MMP-9, gelatinase de 92 kDa, chamada colagenase tipo IV)²⁶. A MMP-2 é secretada através de células intersticiais na forma de zimogênio, e pode degradar o colágeno do tipo IV quando ativada e hidrolisada. Já a MMP-9 é capaz de degradar as proteínas de colágeno presentes na MEC, depois de ser ativada pelas proteases extracelulares em diferentes condições fisiológicas e patológicas²⁷. Portanto, o papel das MMP-2 e MMP-9 têm sido cada vez mais investigado devido à sua capacidade em quebrar o colágeno das membranas basais²⁸. Sua expressão é regulada a nível transcricional através de citocinas e fatores de crescimento, além disso, sua atividade também pode ser regulada por ativação de proenzimas após sua secreção ou bloqueada por seus inibidores endógenos²⁹.

Na DRGE os processos inflamatórios podem mobilizar importantes marcadores do processo lesivo local³⁰. A mieloperoxidase (MPO) faz parte da superfamília de peroxidases e desempenha um papel fundamental na resposta imune inata, sendo secretada por neutrófilos e também por células endoteliais^{31,32}. Embora sua função principal seja essencial para a resposta

imune inata, a liberação aumentada da MPO, pode ocasionar danos teciduais e seus níveis elevados estão intimamente relacionados com o aumento da inflamação^{30,33}.

Os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, sinalizam uma resposta inflamatória e também são responsáveis por induzir o dano esofágico ocasionado pelo refluxo³⁴. Além disso, tais citocinas que também são liberadas pelo TA podem aumentar o risco de complicações e induzir a inflamação esofágica e esôfago de Barret³⁵.

Como consequência da inflamação esofágica ocorrer antes do surgimento de sinais inflamatórios sistêmicos ou até mesmo antes dos sinais microscópicos de lesão na mucosa na DRGE. Estudos demonstraram que os próprios estímulos do reflexo intraluminal levam a lesão da mucosa esofágica através das citocinas, ao invés de serem mediadas em decorrência do ácido³⁶. As células epiteliais esofágicas, é o local onde ocorre o início da exposição a diversos estímulos intraluminais e funcionam como um tipo de célula iniciadora da inflamação esofágica, desempenhando um papel fundamental na patogênese da DRGE³⁷. Dessa forma, essa inflamação causada na mucosa esofágica devido a DRGE, pode levar a ruptura da mucosa, a uma motilidade anormal, fibrose e até mesmo desencadear o processo de carcinogênese³⁸. Estudos indicam que em pacientes com DRGE, os níveis de citocinas e quimiocinas podem se elevar em amostras provenientes de biópsias de tecido esofágico, incluindo, IL-1 β , IL-6, bem como Interferon- γ (IFN- γ) e a Proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1), pertencente ao grupo das quimiocinas³⁹⁻⁴¹.

A Figura 02 mostra as consequências do refluxo ácido e como a esofagite pode levar a um processo lesivo diante da ação de células inflamatórias.

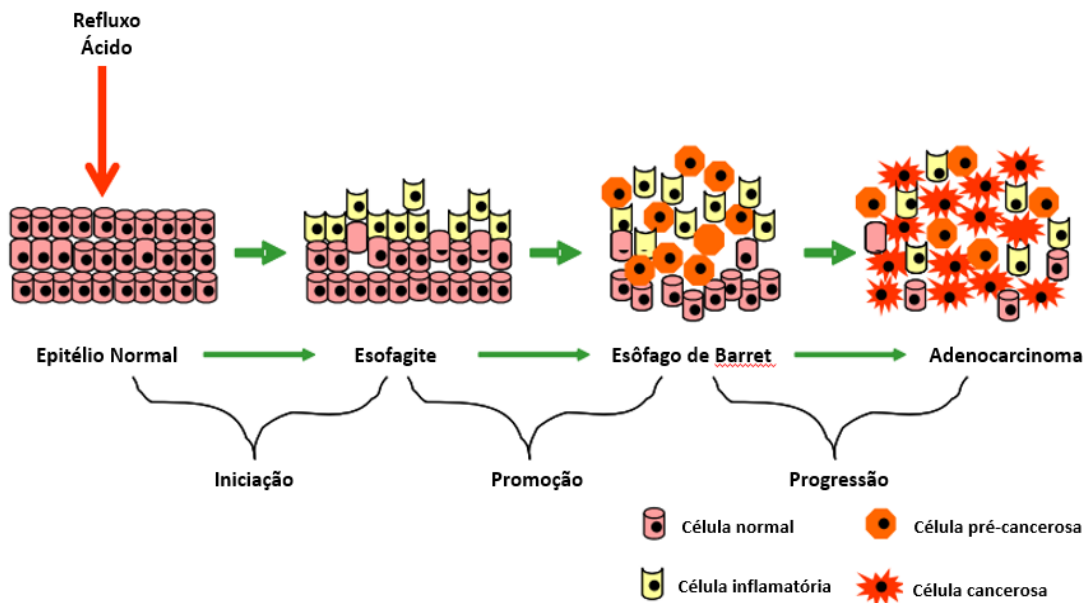


Figura 02. Diagrama representando a sequência inflamação-displasia-carcinoma do esôfago. Adaptado de Kelleher et al., 2009⁴².

Além dos danos ocasionados em decorrência da ação de células inflamatórias, ocorrem efeitos adversos nas células epiteliais devido a injúria causada pelo conteúdo do refluxo gástrico, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) e ativando fatores de estresse oxidativo (EO)⁴³. O EO ocorre quando a produção de EROs é superior à quantidade de agentes antioxidantes (AOs) capazes de neutralizar esta alta exposição, resultando na interrupção da sinalização *redox* e causando danos^{44,45}.

O EO está associado a algumas doenças, que apresentam mecanismos inflamatórios, no qual as EROs podem atacar componentes vitais das células, como ácidos graxos poli-insaturados, proteínas e ácidos nucleicos⁴⁶. Esses danos também são chamados de danos oxidativos^{47,48}, e quando afetam macromoléculas, como por exemplo lipídeos, proteínas e DNA, resultam em produtos que frequentemente são medidos com biomarcadores de EO^{49,50}.

A exposição a radicais livres leva o organismo a desenvolver uma série de mecanismos de defesa⁵¹, e um deles é a defesa por antioxidantes, que incluem as enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx)⁵². Nesse processo, a SOD

catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que posteriormente é desintoxicado pela ação da CAT ou da GPx, através da glutathione reduzida (GSH)⁵³. Os mecanismos que regulam o EO são de extrema importância para a homeostase celular, e possui a capacidade de controlar a formação de EROs reparando e prevenindo o dano oxidativo⁵⁴.

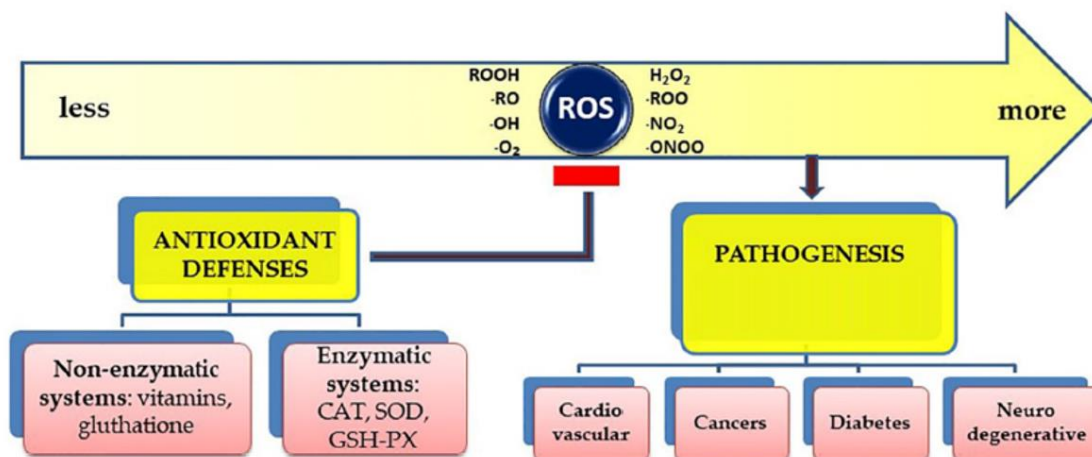


Figura 03. Apresentação esquemática da relação entre as formas de defesa antioxidantes com as fontes de radicais livres e seus efeitos no corpo humano. Adaptado de Sharifi-Rad *et al.*, 2020⁵⁵.

Alternativas terapêuticas a longo prazo são necessárias para o tratamento da DRGE em indivíduos obesos e não obesos. Mesmo sendo considerado o fármaco de primeira linha para o tratamento efetivo da DRGE, até o presente, o uso prolongado dos anti-secretores, como ranitidina (antagonista de receptores H₂) e inibidores da bomba de prótons (IBPs), se associam a vários efeitos colaterais e má cicatrização da mucosa gástrica⁵⁶. O tratamento com IBPs na DRGE requer o uso prolongado de sua administração para uma eficácia no combate a doença⁵⁷. Esses medicamentos atuam ligando-se a enzimas H⁺/K⁺ATPase, localizadas na membrana da célula parietal, inibindo a liberação de íons H⁺ para o lúmen gástrico, como por exemplo o lansoprazol (LZ), que exigem ativação no ambiente ácido do canalículo da célula parietal⁵⁸.

No entanto, o uso indiscriminado e a longo prazo dos IBPs pode causar efeitos colaterais duradouros e prejudiciais para o usuário como dor abdominal, diarreia, constipação, náusea e vômitos, e até mesmo causar deficiências nutricionais, hipersecreção rebote do ácido clorídrico,

enfraquecimento ósseo, complicações renais, anemia e trombocitopenia⁵⁹. Além disso, é válido considerar que existem pacientes que apresentam DRGE refratária, ou seja, mesmo com o tratamento com IBPs, os sintomas e incômodos causados pela doença são persistentes, apesar da otimização do tratamento⁶⁰. Uma vez que as terapias convencionais geralmente apresentam os efeitos anteriormente citados, surge a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento, como por exemplo, os produtos de fonte de plantas medicinais, que apresentam vantagens devido a sua grande variedade de moléculas com atividades farmacológicas importantes e em alguns casos, menor toxicidade^{61,62}.

Dentre esses compostos, destacam-se os monoterpenos pertencentes a classe de terpenos que contém dois isoprenos em suas moléculas e são componentes importantes da interação entre planta e meio ambiente^{63,64}. São considerados importantes pois estão presentes em muitos óleos essenciais de espécies vegetais utilizados na indústria alimentícia como aditivos e aromatizantes⁶⁵.

Diante disso, chama atenção o citral, (CT, 3,7-dimetil-2,6-octadienal), uma mistura de isômeros cis e trans (geranial e neral) de monoterpenóides, um aldeído alifático natural. Esse monoterpeno está presente em óleos voláteis de várias plantas, como *Cymbopogon citratus*, conhecida popularmente como erva cidreira⁶⁶. O CT apresenta diferentes propriedades farmacológicas como ação anti-inflamatória, antipirética, anti-diabética, além de apresentar efeitos anti-adipogênicos^{67,68}. Recentemente, Gonçalves e colaboradores (2020)⁶⁹ demonstraram que o CT atua reduzindo a resposta inflamatória através da redução da sinalização via receptor do tipo Toll (TLR)-4 e 2. O CT apresenta efetiva ação antiobesogênica, através da redução do peso corporal de camundongos alimentados com HFD, além de atuar na redução da expressão de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α no fígado de animais obesos e ação gastroprotetora contra úlceras induzidas por AINEs^{70,71}. Acredita-se que os monoterpenos, como

o CT, também sejam capazes de modificar o efeito prejudicial, como o excesso de EO e injúria gástrica, causados por AINEs.

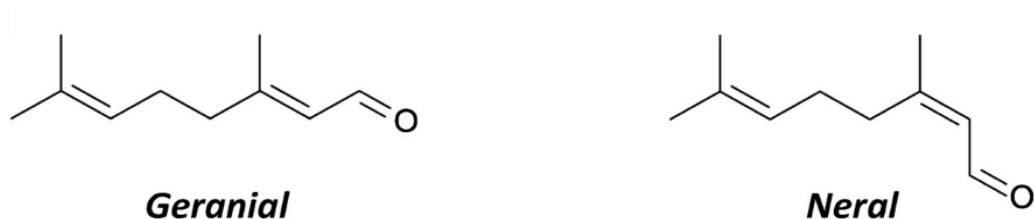


Figura 04. Estrutura dos dois isômeros cis e trans do Citral: geranial (isômero E) e neral (isômero Z). $C_{10}H_{16}O$, 3,7-dimetil-2,6-octadienal. Adaptado de C. Bailly, 2020⁷².

Entretanto, apesar da ação anti-inflamatória, gastroprotetora e antiobesogênica, ainda não existem dados na literatura que demonstrem a efetividade da ação do CT no combate a DRGE no modelo experimental utilizando camundongos obesos quando comparados aos animais eutróficos, o qual demonstra a originalidade da proposta estudada.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliação da ação citral em camundongos machos C57BL/J6 eutróficos e obesos submetidos a DRGE induzida experimentalmente.

Objetivos Específicos:

- (1) Analisar macroscopicamente o efeito protetor do CT na mucosa esofágica de camundongos eutróficos e obesos submetidos experimentalmente a DRGE;
- (2) Analisar e comparar os parâmetros envolvidos no mecanismo de estresse oxidativo e antioxidante (SOD, CAT e GSH) de animais eutróficos e obesos tratados com CT e submetidos a DRGE;

- (3) Analisar e comparar os parâmetros envolvidos na infiltração de neutrófilos (MPO) como marcador do processo inflamatório de animais eutróficos e obesos tratados com CT e submetidos a DRGE;
- (4) Avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) envolvidas na ação do CT em animais eutróficos e obesos submetidos a DRGE e
- (5) Analisar a remodelação tecidual da mucosa esofágica através do complexo de atividade de metaloproteinases (MMP) em animais eutróficos e obesos tratados com CT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/J6 machos, livre de patógenos (com idade de cinco a seis semanas), adquiridos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA), UNESP-Botucatu. Os animais foram mantidos em caixas de fundo sólido forradas com maravalha no biotério de camundongos do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Setor Fisiologia) do Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu, sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água. O protocolo experimental desse projeto foi submetido e aprovado após análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências, UNESP – Campus de Botucatu (protocolo n° 7707010620) (anexo 1).

3.2 Dieta hiperlipídica para indução de obesidade

Após a chegada dos animais ao biotério setorial, os mesmos foram submetidos ao processo de aclimação durante o período de sete dias. Posteriormente, foram ofertados para dois grupos de animais: uma dieta padrão (DP, composta de 15% de lipídeos, Presence Nutrição Animal, Paulínia, SP, Brasil); e outro recebeu a dieta com alto teor de lipídeos denominada de HFD (*High-fat diet*, 60% de lipídios, PragSoluções Biociências, Jaú, SP, Brasil). Ambos grupos foram alimentados no período de 18 semanas. A composição da dieta hiperlipídica utilizada é

apresentada na Tabela 1, que apresenta grande eficiência como descrito por Arçari e colaboradores (2013)⁷³.

Tabela 1 – Composição das rações utilizadas na dieta padrão e hiperlipídica (HFD).

Componente	Dieta Padrão		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	528
Óleo de soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mix de minerais	35	-	35	-
Mix de vitaminas	10	-	10	-
L-Cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1000	3948	1000	5358

3.3 Índice de Adiposidade

O índice de adiposidade dos animais foi calculado a partir da soma dos tecidos adiposos visceral, retroperitoneal e epididimal, dividido pelo peso da massa corporal. Os resultados foram expressos em porcentagem % de índice de adiposidade em relação a massa corporal total.

$$(\textit{visceral} + \textit{retroperitoneal} + \textit{epididimal}) \div \textit{massa corporal total}$$

3.4 Ingestão Alimentar

A ingestão alimentar dos animais foi medida duas vezes por semana durante o período de 18 semanas de indução da obesidade. Posteriormente, o cálculo foi feito a partir da quantidade em gramas das respectivas dietas, ingerida pelos animais por dia. Os resultados foram expressos em g/animal⁻¹/ dia.

3.5 Aporte Calórico

O aporte calórico dos animais foi determinado de acordo com a quantidade gramas de dieta ingerida por dia x a quantidade de calorias presente nas diferentes dietas. Os resultados foram expressos em kcal/dia.

3.6 Tratamentos

Os animais foram submetidos a um jejum de 12 horas e posteriormente, ambos os grupos, eutróficos e obesos foram subdivididos em seis grupos e receberam seus respectivos tratamentos (Tween 80 a 1%, Lansoprazol, Citral em 25, 100 e 300 mg/kg e Sham). O CT (adquirido por Sigma, St.Louis , MO, EUA) foi diluído em solução Tween 80 a 1%⁶⁵ (Vetec, RJ, Brasil) e foram realizadas administrações pela via oral (p.o.), na dose de 25, 100 ou 300 mg/kg de peso corporal. O lansoprazol (farmácia Cruz Vermelha, Botucatu, Brasil) foi diluído em solução Tween 80 a 1% (10 mL/kg) e foram realizadas administrações pela via oral (p.o.), na dose de 30 mg/kg de peso corporal. Ambos foram administrados em forma de tratamento agudo 1 hora antes do

procedimento cirúrgico. Os animais do grupo Sham (submetidos ao estresse cirúrgico) não receberam nenhum tipo de tratamento.

3.7 Cirurgia para indução de esofagite e coleta de materiais

Os procedimentos cirúrgicos aconteceram sob anestesia inalatória de isoflurano (Adquirido de Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda – Itapira, São Paulo, Brasil), com a concentração inicial de 3% a 3,5% e durante a cirurgia, os animais foram mantidos com doses ministradas entre 2% a 2,5%. Foi realizada laparotomia mediana para realizar a dupla ligadura no fundo do estômago e piloro, conforme mostra a Figura 05. Os animais foram eutanasiados após 4 horas do procedimento cirúrgico para remoção do esôfago e estômago (Figura 06).

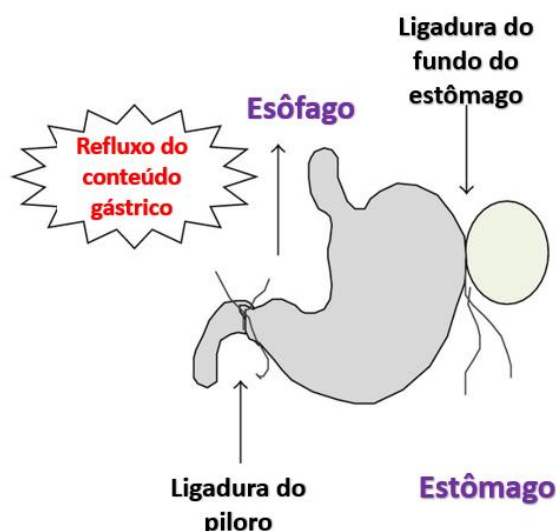


Figura 05. Modelo de indução de esofagite: sob anestesia inalatória com isoflurano, foi realizada a ligadura do fundo do estômago e do piloro. Transcorrido 4 horas, os animais foram eutanasiados e o esôfago foi removido para análise das lesões. Adaptado de Takeuchi e Nagahama, 2014⁷⁴.

O esôfago foi retirado por um corte na altura da traqueia, juntamente com o estômago que foi removido por um corte no piloro. Além disso, foram coletados e pesados o tecido adiposo (abdominal, retroperitoneal e epididimal), fígado e soro e armazenados a -80 °C até a utilização. A área total das lesões esofágicas e gástricas foram escaneadas para análise através do programa

Image J. Os tecidos e o soro foram coletados e armazenados para análises microscópicas e bioquímicas descritas a seguir.

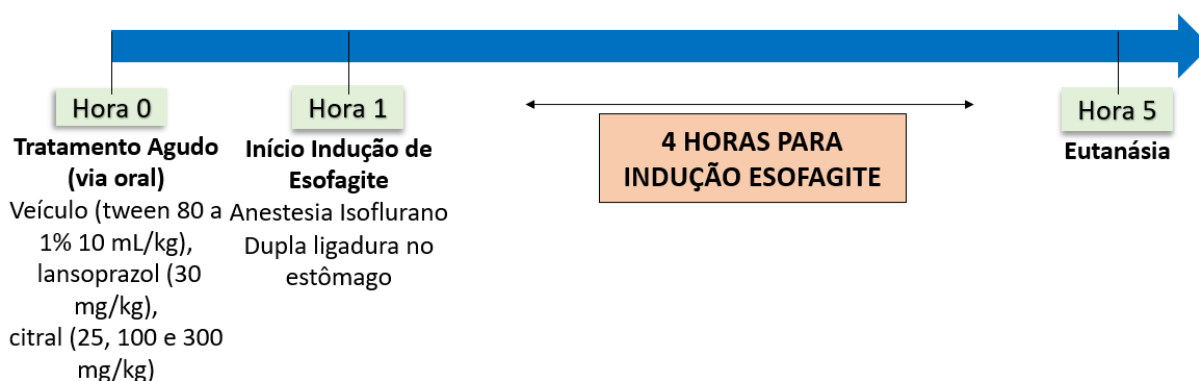


Figura 06. Linha do tempo: representação do tratamento agudo dos animais por via oral na hora 0 (início do procedimento), seguido da indução da esofagite na hora 1 com duração de 4 horas e posteriormente a eutanásia na hora 5.

3.8 Medida do pH esofágico

Após a retirada do estômago e do esôfago, foi realizada a medição do pH esofágico por fitas que indicam o valor do pH (Fitas para teste de pH 0-14 MQuant® - Merck).

3.9 Determinação de parâmetros bioquímicos do esôfago

Ao término do experimento, o tecido dos animais foi processado para determinação bioquímica de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reduzida (GSH), catalase (CAT) e mieloperoxidase (MPO), como descrito a seguir, para caracterização do EO e do processo inflamatório local.

3.9.1. Determinação de Superoxido dismutase (SOD)

Os fragmentos do esôfago foram homogeneizados com tampão RIPA e coquetel inibidor de protease. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13680 g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi diluído em tampão fosfato (0,1M; pH 7,4) na proporção de 1:20 (w/v). Em 100 µL do homogenato foram adicionados 150 µL de coquetel contendo: hipoxantina, xantina oxidase de nitobluetetrazólio (NBT), em proporção 1:1:1. A absorbância foi lida a cada minuto por

10 minutos, a 37°C e 560 nm. A integral foi multiplicada por 800 e os resultados foram expressos em u/g de tecido⁷⁵.

3.9.2. Determinação da atividade da Catalase (CAT)

Os fragmentos do esôfago foram homogeneizados com tampão RIPA e coquetel inibidor de protease. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 13680 g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi diluído em solução tampão [KH_2PO_4 ; fosfato diidrogênio potássio], 25mM, pH 7,5; EDTA 1mM; BSA 1%], na proporção de 1:20 (w/g). A placa continha 2 poços com catalase para controle positivo. 20 μL do homogenato foram colocados em uma placa com 96 poços, contendo 100 μL de tampão (KH_2PO_4 , 250 mM, pH 7,0), 30 μL de metanol e 20 μL de peróxido de hidrogênio.

A placa foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, 30 μL de hidróxido de potássio (10 mM) e 45 μL de Purpald foram adicionados e a placa foi incubada por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Após isso, 15 μL de de periodato de potássio (65,2 mM) foram adicionados e a placa foi incubada por mais 5 minutos. Por fim, a determinação da absorbância foi realizada a 540 nm. A concentração foi multiplicada por 4000 e os resultados foram expressos em u/g de tecido⁷⁶.

3.9.3. Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH)

O conteúdo de glutathiona reduzida foi determinado utilizando a substância 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). A reação enzimática foi constituída de 20 μl da amostra, 140 μl de NADPH, 5 μl de PBS e 20 μl DTNB. A absorbância foi determinada em 412 nm, utilizando um espectrofotômetro (Espectrofotômetro de microplaca Eon da Biotek Instrumentos – Winnoski, VT, EUA). Os resultados foram expressos como nmol/g de tecido⁷⁷.

3.9.4 Determinação da atividade da MPO

A determinação da atividade da MPO, um importante marcador da infiltração de neutrófilo, foi realizada pelo método de Krawisz et al. (1984)⁷⁸, Amostras de tecido mantidas a -80°C foram utilizadas para a análise da atividade da MPO. Foram solubilizadas com brometo hexadeciltrimetilamônio e sua atividade foi medida através de um ensaio com O-dianisidina. A absorbância foi determinada em 450 nm a 37°C utilizando um espectrofotômetro (Espectrofotômetro de microplaca Eon da Biotek Instrumentos – Winnoski, VT, EUA). Os resultados foram expressos em µg de tecido.

3.10 Quantificação Zimográfica das metaloproteinases 2 e 9

O tecido esofágico foi 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 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 seguido de descoloração. As zonas de atividade gelatinolítica são identificadas com coloração negativa. A quantificação das bandas zimográficas foi feita por meio da densitometria óptica ligada ao software Image J⁷⁹. Os resultados foram expressos em intensidade da densitometria óptica (DOI).

3.11 Quantificação de citocinas (Luminex)

Para determinar os níveis séricos de citocinas TNF-α, IL-1β e IL-6 se utilizou o kit para ensaio de Multiplex (*Magnetic Luminex Assay, mouse premixed Multi-Analyte Kit*, N° CAT LXSAMSM-03, LOT L128468; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções de uso do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.12 Testes de tolerância à glicose (TTG) e à insulina (TTI)

Os testes foram realizados na última semana de oferta da dieta hiperlipídica, com os animais em jejum de seis horas, sem a administração de anestesia. Uma amostra de sangue foi coletada a partir da cauda do animal. No TTI, após a determinação da glicemia basal, os animais receberam injeção intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg) e em seguida foram repetidas as leituras de glicemia 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de insulina⁸⁰ com um monitor de glicemia (Accu-chek Active Roche, Mannheim, Alemanha). Para o TTG, após a determinação da glicemia basal os camundongos receberam uma solução de glicose (2 g/kg) via oral, em seguida as medidas de glicemia foram repetidas 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração⁸¹. Ao final dos experimentos, a resposta glicêmica foi calculada a partir da área sob a curva (AUC) durante o período de 0 a 120 minutos nos animais que receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica.

3.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student não pareado para comparação entre dois grupos e por análise de variância (ANOVA) de uma via para comparação entre três grupos ou mais, seguida pelo teste de Tukey. Para as análises de resultados com mais de duas variáveis foi utilizado ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey ou Bonferroni. O valor mínimo de significância estatística considerado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença decorrente do acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode resultar em riscos à saúde ocasionando complicações como doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão e câncer⁸². Dessa forma, associar as consequências da obesidade nos tecidos e órgãos é essencial para a compreensão da fisiopatologia do sistema digestório, com foco no esôfago e estômago.

Atualmente, modelos em animais experimentais envolvendo a indução da obesidade através da dieta hiperlipídica, são comumente utilizados em estudos sobre alterações metabólicas ligadas às várias doenças^{83,84}. Além disso, Nagy e Einwalner (2018), demonstraram, em camundongos, que obesidade induzida através da dieta hiperlipídica, ocasiona um rápido ganho de peso⁸¹. Sharma e colaboradores (2017), demonstraram que a oferta da dieta hiperlipídica, a mesma utilizada em nosso estudo, foi efetiva no aumento da massa corporal em camundongos C57BL/J6, comprovando a eficácia dessa dieta na indução da obesidade⁸⁴.

De acordo com esses dados prévios encontrados na literatura, nosso estudo foi realizado com a oferta da dieta hiperlipídica contendo 60% (HFD) de lipídeos em sua composição para a indução da obesidade durante um período de 18 semanas. Observamos que os animais que receberam HFD apresentaram um aumento significativo de sua massa corporal (16%), a partir do 17º dia de indução da obesidade, quando comparado aos animais que receberam DP. Na figura 7 é possível observar que, a partir da terceira semana, essas diferenças da massa corporal entre os dois grupos permanecem diárias até o final das 18 semanas.

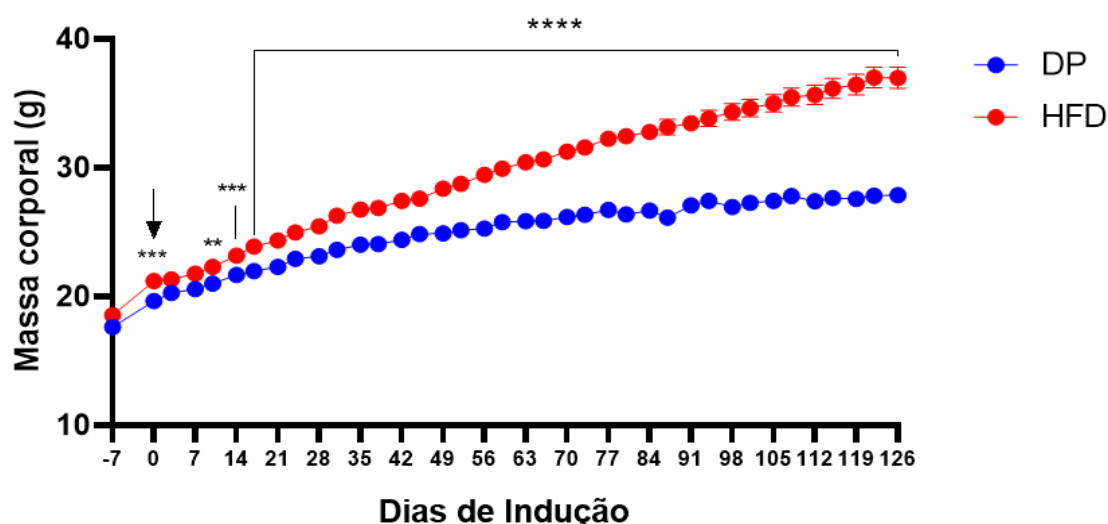


Figura 07. Evolução da massa corporal dos animais (DP – dieta padrão; HFD – dieta hiperlipídica) durante o período de 18 semanas de indução da obesidade. Os resultados foram expressos com média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ ao comparar o grupo HFD com o grupo DP.

A obesidade consiste na proliferação do TA, que apresenta em sua estrutura adipócitos e pré-adipócitos. O TA é o principal local de armazenamento de lipídeos (triglicerídeos) e é considerado essencial no tamponamento do influxo diário de gordura proveniente de dietas que entram na circulação, além de ser um órgão que secreta diversos fatores importantes para a homeostasia sistêmica⁸⁵.

O TA é classificado como um tecido endócrino de alto dinamismo e com diversas funções fisiológicas⁸⁶. O TA é responsável por mediar a regulação de diversos órgãos e tecidos através da atividade de adipocinas (ou adipocitocinas), que são moléculas bioativas que realizam a modulação do metabolismo e da inflamação⁸⁷.

A distribuição da gordura corporal é essencial para prevenir e tratar os distúrbios metabólicos associados à obesidade. O TA atuando como reserva energética nos adipócitos na forma de triglicerídeos (TG), é capaz de controlar o metabolismo lipídico e a homeostase da glicose⁸⁸. Esse acúmulo de TG nos adipócitos, resulta no aumento de tamanho das gotículas de lipídeos, ocasionando a expansão do TA e consequentemente na obesidade, além de desregular a produção de adipocinas, ocasionar a inflamação pela obesidade e também a resistência à insulina⁸⁹.

O risco do distúrbio metabólico associado ao acúmulo de gordura, é altamente dependente de sua distribuição. A obesidade central e o acúmulo de gordura ectópica, são considerados fatores chaves para o desenvolvimento de riscos metabólicos^{90,91}. Dentro disso, o TA visceral em grandes quantidades, está intimamente relacionado com o aumento de desenvolvimento de diabetes^{92,93}.

No presente estudo, calculamos o índice de adiposidade dos animais, levando em consideração a massa total dos tecidos adiposos (visceral, retroperitoneal e epididimal) em relação a massa corporal. Em nosso estudo observamos que houve um aumento significativo (três vezes

maior, 68%) no índice de adiposidade dos animais que receberam HFD durante 18 semanas em relação aos animais que receberam DP ($p < 0,05$) (Figura 08).

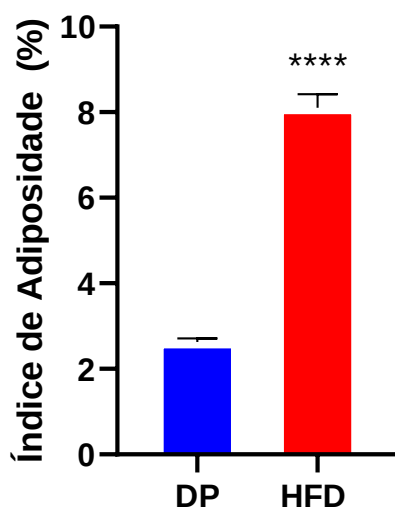


Figura 08. Índice de adiposidade dos animais que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste t de Student. **** $p < 0,0001$ ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Em geral, a obesidade é caracterizada pelo aumento da massa corporal e do índice de adiposidade em decorrência do aumento da ingestão da HFD. Entretanto, Townsend e colaboradores (2018) demonstraram que a obesidade pode ser instalada mesmo sem o aumento da ingestão da dieta rica em gorduras ou hipercalórica⁹⁴. Nossos resultados demonstraram um aumento da massa corporal e do índice de adiposidade, entretanto ao compararmos a ingestão alimentar com ambas as dietas, os animais que receberam HFD apresentaram uma diminuição significativa no consumo da HFD quando comparados aos do grupo DP (40%) (Figura 07 - A). Nossa hipótese para essa redução na ingestão alimentar da HFD é provavelmente devido tamanho da gota de gordura (lipídeos) que é responsável por determinar a velocidade em que ocorre a

ingestão da gordura e na sequência a liberação de ácidos graxos, que possuem efeitos na supressão da ingestão de energia⁹⁵.

A leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos, atua na supressão da ingestão alimentar e no aumento do gasto energético através de seu receptor hipotalâmico, seus níveis circulantes se encontram aumentados no quadro obesogênico⁹⁶. A resistência a leptina tem sido considerada um dos principais fatores de gênese e desenvolvimento da obesidade. A deposição de gordura do organismo funciona como um regulador de ingestão e do controle do apetite a longo prazo, sendo a leptina um fator fundamental na influência inibitória nos mecanismos cerebrais de controle de depósito de gordura no organismo. Essa demanda metabólica de energia, é decorrente de necessidades energéticas que são produzidas pelos principais órgãos, como coração, fígado, cérebro, trato gastrointestinal e músculo esquelético. Sendo assim, acredita-se que conforme a gordura nos adipócitos do TA se acumula o seu efeito inibitório sobre a ingestão alimentar se torna mais fraco, além do aumento na resistência à insulina e leptina⁹⁷. Com relação a oferta da HFD, um estudo com camundongos C57BJ/6J machos e fêmeas demonstrou que após a transição da DP para HFD, houve uma diminuição significativa da ingestão calórica em ambos os sexos⁹⁸. Uma outra possível influência sobre a diminuição da ingestão alimentar e gasto energético nos animais obesos, seria a diminuição da atividade motora desses animais. Adicionalmente, um estudo demonstrou que camundongos C57BL/6J alimentados com HFD apresentaram uma diminuição significativa da atividade motora quando comparados aos animais que receberam a dieta controle, com isso o gasto energético desses animais se torna reduzido⁹⁹.

Em nossos resultados, observamos que ocorreu uma diminuição significativa da ingestão alimentar e do aporte calórico em animais que receberam HFD, quando comparado ao grupo que recebeu DP, levantando a hipótese da atuação da leptina nesse sistema bem como da diminuição da atividade motora dos animais que receberam HFD (Figura 09).

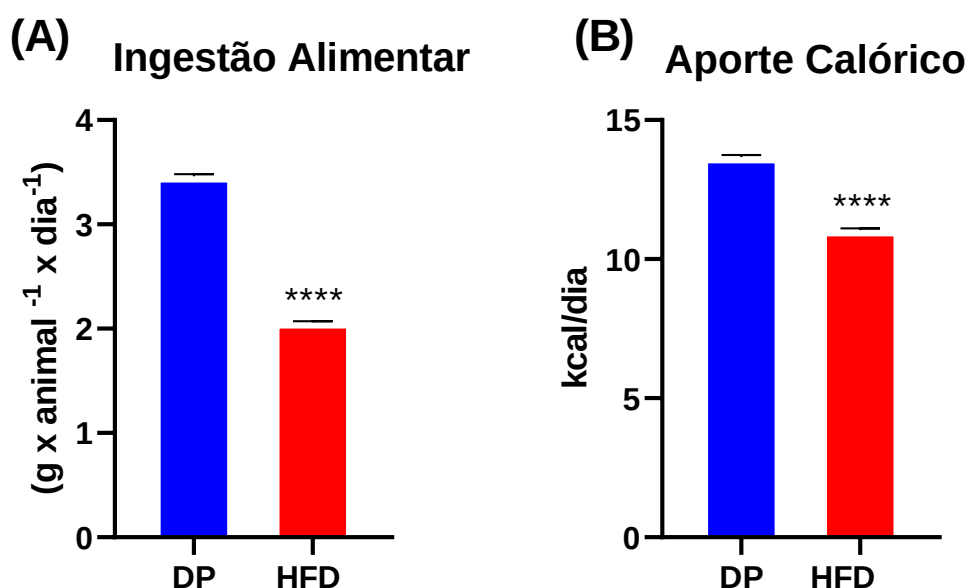


Figura 09. (A) e (B) Ingestão alimentar e aporte calórico dos animais que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. *****p* < 0,0001 ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

A disfunção do TA e a distribuição da gordura corporal, são considerados elementos essenciais no desenvolvimento de resistência à insulina. A relação exacerbada que ocorre entre a sensibilidade à insulina e a secreção de insulina, explica o aumento evidente da resposta à insulina em indivíduos resistentes a ela, quando comparado aos que são sensíveis¹⁰⁰. A glicemia normal é mantida em situações nas quais o aumento compensatório da secreção de insulina é suficiente, mas na ocorrência de uma falha dessa resposta compensatória, pode haver um comprometimento do metabolismo da glicose, e como resultado, o desenvolvimento da diabetes¹⁰¹. Atualmente, a obesidade e a diabetes tomaram proporções epidêmicas em decorrência da falta de atividade física e do excesso no consumo de alimentos industrializados¹⁰². Embora os estudos que envolvam a resistência à insulina e suas complicações, como a hiperlipidemia, tenham se destacado nos últimos anos, os mecanismos que regulam a doença ainda necessitam ser melhor elucidados¹⁰². Estudos em modelos animais com indução de obesidade, têm se apresentado como ótima ferramenta para melhor entender e estudar os mecanismos de resistência à insulina¹⁰³.

Assim como em humanos, modelos experimentais para estudo de obesidade em animais, demonstram aumento dos níveis de insulina e glicose no sangue no estado de jejum. Nesses animais se observa menor tolerância à administração da glicose e eles são comumente utilizados para indicar a resistência à insulina e suas alterações sistêmicas⁸¹. Uma dieta desbalanceada pode acarretar alterações metabólicas significativas, como a resistência à insulina, que pode indicar o desenvolvimento de diabetes *mellitus*.

O TTI e o TTG são considerados ferramentas importantes para a avaliação de alterações metabólicas, como por exemplo, a resistência à insulina, e para monitorar os níveis de glicose após a administração de insulina ou glicose. Portanto, o monitoramento dos níveis de insulina e glicose no sangue, é um tipo de leitura acessível e muito utilizado em diversos estudos⁸¹.

Nesse estudo comparamos primeiramente os níveis glicêmicos dos animais em jejum submetidos a ambas as dietas e observamos que os animais que receberam HFD apresentaram um aumento significativo da glicemia basal quando comparado ao grupo que recebeu DP (Figura 10).

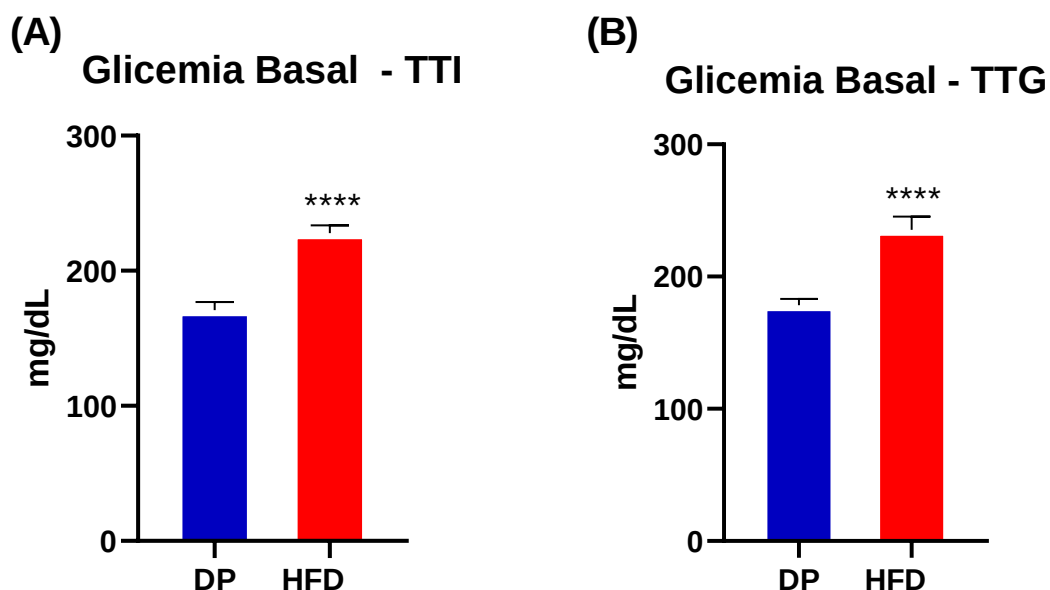


Figura 10. (A) e (B) Glicemia basal dos animais submetidos ao TTI e TTG. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. **** $p < 0,0001$ ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Posteriormente, observamos que a administração da insulina (TTI), ocasionou um aumento significativo da glicemia 15 e 120 minutos após sua administração, no grupo que recebeu HFD quando comparado ao grupo DP (Figura 11-A). Com relação ao TTG, houve um aumento significativo nos controles glicêmicos basais 15 minutos após a administração de glicose, no grupo que recebeu HFD quando comparado ao grupo DP (Figura 11-C). Apesar de termos observado um aumento da glicemia após 15 e 120 minutos da administração de insulina, e um aumento após 15 minutos da administração de glicose no grupo HFD em relação ao DP, esses resultados não se confirmaram quando realizamos a determinação da área sob a curva, que leva em consideração a variação da glicemia durante todo o período analisado. Observamos apenas um aumento significativo no TTI no grupo que recebeu HFD quando comparado ao grupo DP. Com relação ao TTG não foi observado o aumento significativo do controle glicêmico no grupo HFD quando comparado ao DP (Figura 11-B e D).

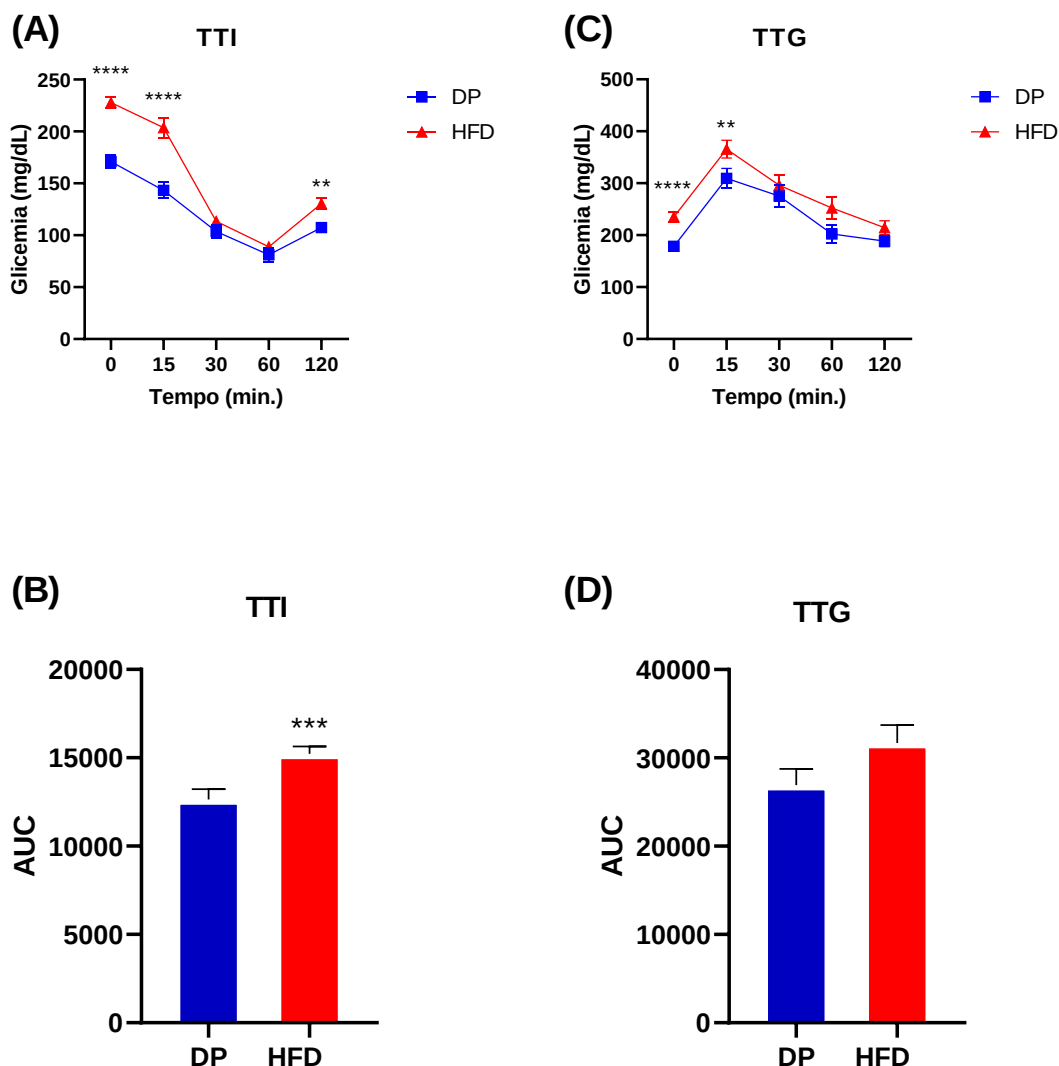


Figura 11. (A) e (C) Glicemia dos animais no período de 120 minutos para avaliação da tolerância a insulina (TTI) ou glicose (TTG). (B) e (D) AUC dos animais submetidos ao TTI e TTG. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.**

A obesidade está intimamente relacionada à DRGE e estudos demonstraram que indivíduos obesos possuem maior probabilidade de apresentar sintomas de refluxo, quando comparado com indivíduos de peso normal¹⁰⁴. Dessa forma, mesmo quando o ganho de peso ocorre de forma moderada, pode ocasionar ou até exacerbar os sintomas de refluxo. Vários estudos mostraram a correlação entre a perda de peso e a redução do IMC, associado a redução dos sintomas ocasionados pela DRGE, bem como a diminuição a exposição ao ácido que ocorre no esôfago em decorrência do refluxo estomacal¹⁰⁵.

Normalmente, a DRGE é chamada de refluxo ácido e é considerada como uma doença quando o refluxo ácido presente no estômago, chega até o esôfago. O ácido clorídrico (HCl), componente do suco gástrico é considerado nocivo, sendo a principal causa de injúrias gástricas e esofágicas, e de sintomas de refluxo¹⁰⁶. A nível celular, o que ocorre é que o dano ocasionado pelo HCl na mucosa esofágica, em parte acontece por causa de seus efeitos na diferença de potencial na mucosa esofágica. Na maioria das vezes, o epitélio do esôfago mantém um gradiente eletroquímico constante, quando se avalia a diferença de potencial em modelo *in vitro*. Porém, como estudos já mostraram em modelos animais, o aumento de HCl no lúmen, leva a um aumento significativo na diferença de potencial. Em consequência disso, a regulação entre célula e volume, se torna cada vez menos eficiente, acarretando na perda na integridade celular, gerando edema celular e necrose do revestimento epitelial esofágico¹⁰⁷. Além disso, estudos recentes demonstraram efeitos inflamatórios no epitélio, indiretamente causados pelo HCl, que resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e também em danos celulares^{108,109}.

Modelos animais, como coelhos e ratos, têm sido utilizados no estudo da fisiopatologia da DRGE. Recentemente, ratos são os principais animais utilizados nos modelos. Isso porque seu esôfago revestido com epitélio escamoso estratificado é semelhante ao esôfago humano. Dentre os modelos experimentais utilizados para o estudo da DRGE, encontram-se o modelo agudo e o crônico, ambos estabelecidos cirurgicamente. O modelo agudo utilizado em nosso estudo, se propõem a avaliar o mecanismo preventivo no tratamento de determinados medicamentos (como os IBPs) em um curto período, enquanto o modelo crônico se dá pela avaliação curativa e comumente utilizado para estudos de investigação da eficácia de medicamentos, em um longo período de tempo. Desse modo, consideramos avaliar o modelo agudo para induzir experimentalmente a DRGE a fim de avaliar o efeito preventivo do CT na doença. Nosso modelo foi validado com base na literatura, quando observamos que o lansoprazol, comumente utilizado

em estudos envolvendo a DRGE, exerceu a redução da área de lesão e promoveu a prevenção das lesões teciduais¹¹⁰⁻¹¹².

Observamos através da análise das áreas de lesões esofágicas (mm^2), que o tratamento prévio com CT na dose de 100 mg/kg não foi efetivo na redução das lesões, comparado ao grupo tratado com veículo (tween) no grupo que recebeu DP (CT 100 vs. Veículo, 3.91 ± 0.910 vs. 4.55 ± 0.60) e no grupo que recebeu HFD (CT 100 vs. Veículo, 3.44 ± 0.80 vs. 3.84 ± 0.35), como representa a Figura 12. Entretanto, nossos resultados mostraram também que as duas doses de CT, a dose mínima e máxima (25 e 300 mg/kg) agiram de modo efetivo na prevenção de lesões esofágicas quando comparado ao grupo tratado com veículo que recebeu dieta DP (CT 25 vs. Veículo, 1.89 ± 0.41 vs. 4.55 ± 0.91 ; CT 300 vs. Veículo, 1.11 ± 0.32 vs. 4.55 ± 0.91) e também HFD (CT 25 vs. Veículo, 2.09 ± 0.29 vs. 3.84 ± 0.35 ; CT 300 vs. Veículo, 0.71 ± 0.07 vs. 3.84 ± 0.35). Desse modo, observamos que houve aumento significativo da área total das lesões esofágicas nos grupos que foram tratados com veículo quando comparados aos grupos de animais que receberam lansoprazol (controle positivo), CT na dose 25 e 300 mg/kg nas duas dietas (Figura 12), demonstrando que o tratamento com CT foi efetivo na prevenção das lesões induzidas pelo refluxo gastroesofágico.

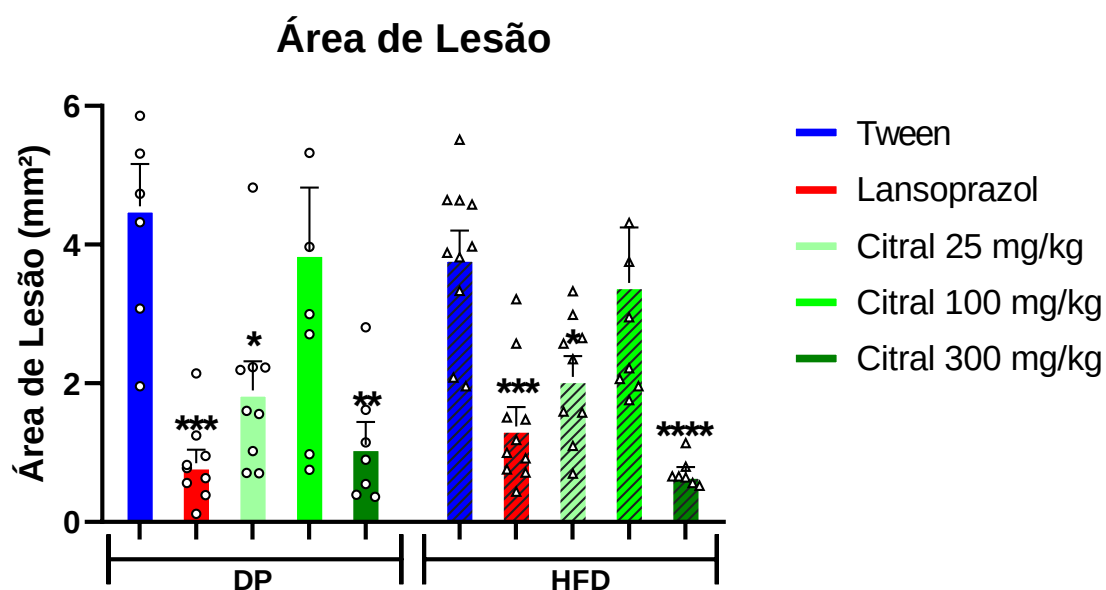


Figura 12. Análise da área total de lesão no esôfago de animais submetidos ao modelo agudo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Avaliação do efeito preventivo do citral (Citral 25, 100 ou 300 mg/kg). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ ao comparar com o grupo controle negativo (Tween).

As figuras 13 e 14 demonstram as imagens representativas dos esôfagos dos camundongos submetidos ao modelo agudo de esofagite. No grupo que recebeu DP (Figura 13), observamos a ocorrência de lesão esofágica de forma mais evidente no grupo controle (tween) e no grupo tratado com CT na dose de 100 mg/kg (A e D). Além disso, observamos que os animais tratados com CT na dose de 25 e 300 mg/kg (C e E), apresentaram uma redução das lesões quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas veículo (B). No grupo que recebeu HFD (Figura 14), observamos as lesões de forma evidenciada nos animais que receberam veículo e nos animais tratados com CT na dose de 25 e 100 mg/kg (A, C e D). Também no grupo que recebeu HFD, observamos a redução de lesões esofágicas nos grupos tratados com LZ e CT na dose de 300 mg/kg (B e E) ao comparar com esôfagos de animais que receberam apenas veículo (A).

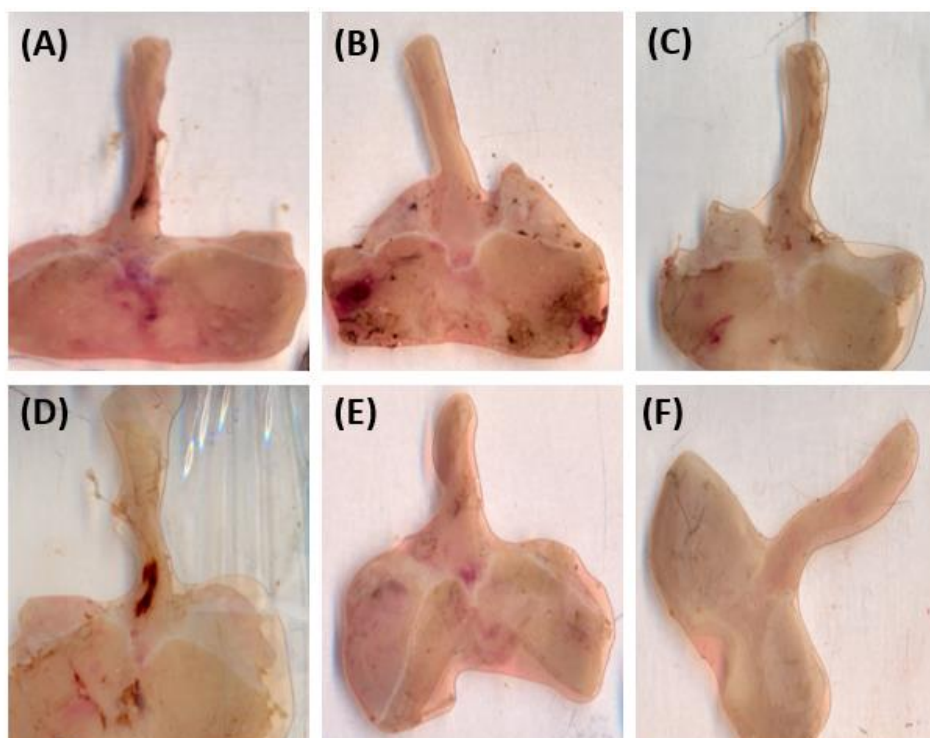


Figura 13. Esôfagos de animais eutróficos submetidos a esofagite induzida por dupla ligadura no estômago. (A) Esôfago de animal tratado com veículo (tween). (B) Esôfago de animal tratado com lansoprazol. (C) Esôfago de animal tratado com citral 25 mg/kg. (D) Esôfago de animal tratado com citral 100 mg/kg. (E) Esôfago de animal tratado com citral 300 mg/kg. (F) Esôfago de animal Sham.

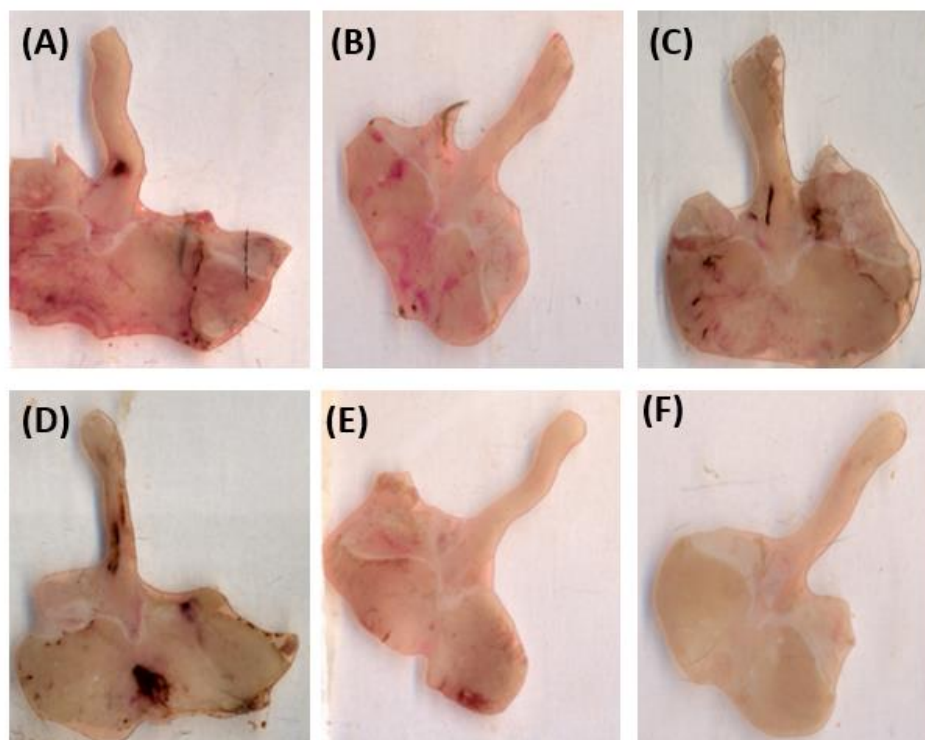


Figura 14. Esôfagos de animais obesos submetidos a esofagite induzida por dupla ligadura no estômago. (A) Esôfago de animal tratado com veículo (tween). (B) Esôfago de animal tratado com lansoprazol. (C) Esôfago de animal tratado com citral 25 mg/kg. (D) Esôfago de animal tratado com citral 100 mg/kg. (E) Esôfago de animal tratado com citral 300 mg/kg. (F) Esôfago de animal Sham.

Até o momento, a base da terapia para a DRGE, têm sido os IBPs, devido ao seu efeito anti-secretor e ação no controle das complicações esofágicas ocasionadas pela doença, como úlcera e sangramento. Porém, esses medicamentos requerem seu uso a longo prazo e o tratamento crônico têm sido associados a uma variedade de efeitos adversos, como complicações renais, por exemplo, alertando sobre seu perfil de segurança¹¹³. Uma vez que o refluxo ácido é a principal causa da DRGE, a melhor maneira de controlar a doença é a supressão de sua secreção e/ou neutralização ácida. Dessa forma, a supressão ácida se tornou um dos principais alvos terapêuticos contra a DRGE^{114,115}.

O monitoramento do pH é considerado um parâmetro essencial para o diagnóstico do refluxo ácido¹¹⁶. Estudos demonstraram que monitorar o pH é uma ferramenta eficaz na DRGE, e que o tempo de exposição ao ácido está relacionado com um maior grau de esofagite¹¹⁷.

Diante desse fato, a análise do pH esofágico (Figura 15) em nossos resultados demonstrou que os grupos que receberam DP e foram submetidos ao tratamento com CT e lansoprazol não apresentaram nenhuma diferença significativa em relação ao grupo veículo (Tween). Entretanto, houve diminuição significativa no valor do pH esofágico dos animais que receberam o tratamento com CT na dose de 100 mg/kg, quando comparado ao grupo Sham (CT 100 vs. Sham, 4.70 ± 0.15 vs. 5.60 ± 0.21). Por outro lado, com relação ao grupo HFD, observamos que os animais tratados com lansoprazol e com CT na dose 300 mg/kg, apresentaram aumento significativo no pH esofágico, quando comparados ao grupo veículo (Tween) (CT 300 vs. Veículo, 5.80 ± 0.12 vs. 5.10 ± 0.22 ; LZ vs. Veículo, 5.80 ± 0.12 vs. 5.10 ± 0.22). Além disso, observamos também que a mesma diferença significativa aconteceu quando comparamos os tratamentos com o grupo Sham (CT 300 vs. Sham, 5.80 ± 0.12 vs. 4.80 ± 0.16 ; LZ vs. Sham, 5.80 ± 0.12 vs. 4.8 ± 0.16).

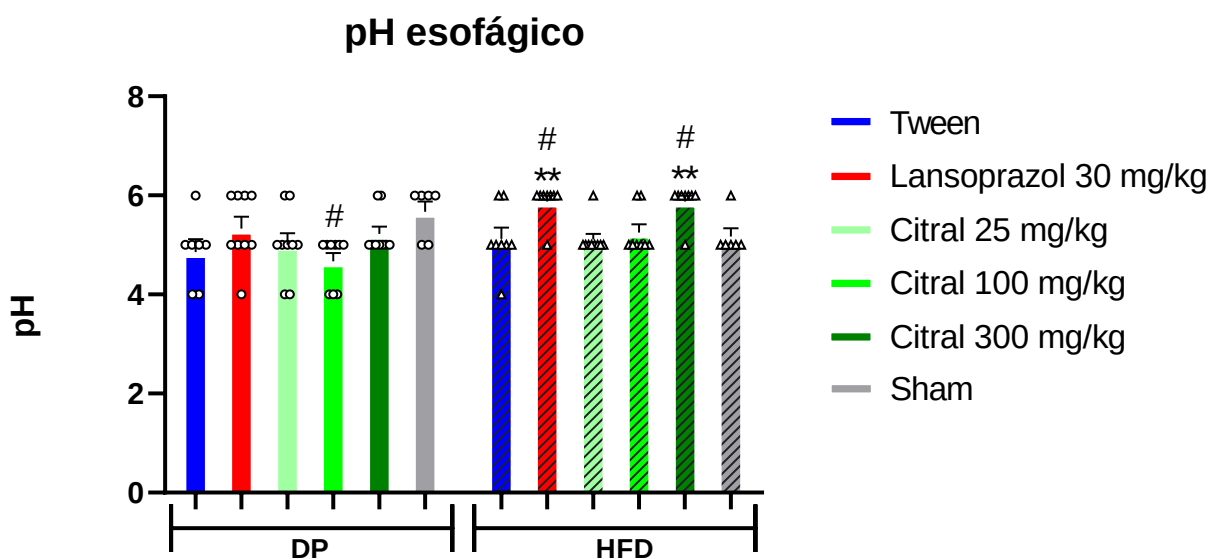


Figura 15. Análise da medida do pH esofágico dos animais submetidos ao modelo agudo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD), respectivamente. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey. *p < 0,05 e **p < 0,01 ao comparar com o grupo controle negativo (Tween) e #p < 0,01 ao comparar com o grupo Sham.

Ao compararmos os diferentes tratamentos entre as duas dietas ofertadas, observamos que os animais que receberam as doses de CT de 100 e 300 mg/kg, apresentaram um aumento

significativo no pH ao comparar o grupo tratado com HFD ao grupo DP (CT 100: 5.33 ± 0.166 vs. 4.70 ± 0.15 ; CT 300: 5.87 ± 0.12 vs. 5.25 ± 0.16). Mas por outro lado, também podemos observar que o contrário ocorreu com o grupo Sham, onde houve uma diminuição significativa do pH do grupo Sham ao comparar o grupo HFD com grupo DP (Sham: 4.85 ± 0.16 vs. 5.66 ± 0.21). Podemos observar em nossos resultados, a efetividade da ação do CT nas doses de 100 e 300 mg/kg nos animais que receberam HFD quando comparados ao grupo DP, onde os níveis de pH esofágico se mostraram significativamente elevados (Figura 16), mostrando que quando a esofagite está associada ao quadro de obesidade, o CT exibe uma melhor resposta quando comparamos com o grupo tratado com lansoprazol (fármaco padrão). Além disso, pudemos observar (Figura 16 - F) que uma dieta com alto teor de lipídios (HFD) por si só, sem o quadro de esofagite, é capaz de reduzir significativamente o pH esofágico quando comparado a uma dieta com teor de lipídios reduzidos (DP), favorecendo um meio mais lesivo para mucosa esofágica.

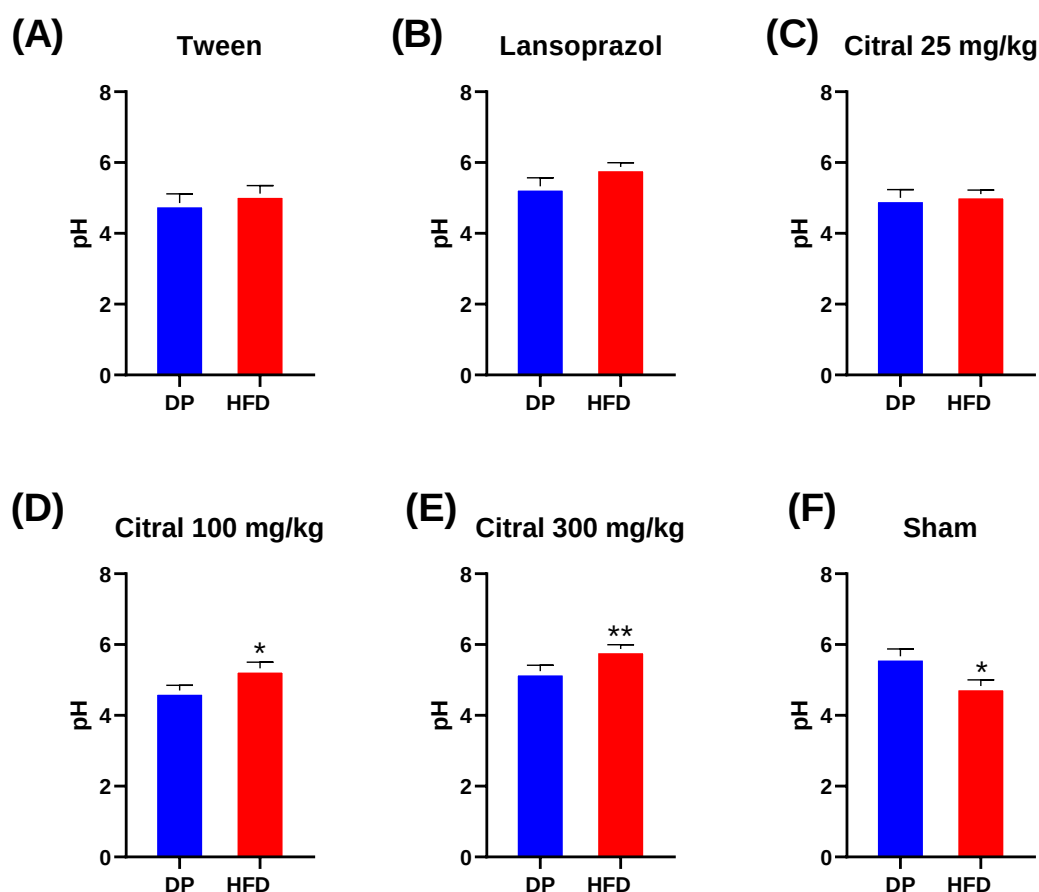


Figura 16. Análise da medida do pH do esôfago de animais submetidos ao modelo agudo de esofagite com diferentes tratamentos que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). (A) Tween, (B) Lansoprazol, (C) Citral 25 mg/kg, (D) Citral 100 mg/kg, (E) Citral 300 mg/kg e (F) Sham. Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. **p* < 0,1 e ***p* < 0,01 ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

O refluxo esofágico do conteúdo ácido gástrico causa lesão e inflamação da mucosa esofágica, na qual radicais livres derivados de oxigênio (EROs) medeiam criticamente o dano da mucosa na esofagite¹¹⁸. As EROs se tornaram um subproduto do metabolismo e possuem um papel fundamental também no desenvolvimento da obesidade e suas complicações¹¹⁸. Além dessa inflamação ocasionada na obesidade, as EROs também atuam diretamente nas lesões esofágicas ocasionadas pela DRGE, principalmente na patogênese da doença. Estudos realizados em modelos animais, demonstraram a relação que existe com as EROs e a esofagite, onde as EROs produzidas no processo de esofagite decorrente do refluxo, foram consideradas responsáveis por ocasionar danos no tecido esofágico¹¹⁹. Embora esses processos bioquímicos

demonstrem uma complexidade em relação a DRGE, o quadro emergente sugere a ocorrência de um ciclo vicioso de EO, EROs e inflamação, o que pode ser uma nova abordagem terapêutica¹²⁰.

Os antioxidantes possuem um papel fundamental dentro dos mecanismos de defesa. Em organismos saudáveis, a proteção contra os efeitos nocivos das EROs ocorre através da manutenção do equilíbrio entre os fatores oxidantes e o sistema antioxidante⁵⁵.

Os radicais livres, na maioria das vezes, são destruídos pelo sistema antioxidante natural do organismo. Se o sistema antioxidante não atuar de maneira adequada, os radicais livres podem gerar uma reação negativa no organismo, uma vez que quantidades elevadas, podem ocasionar danos celulares e apoptose, colaborando com o aparecimento de algumas outras doenças, como câncer e também diabetes ^{121–123}.

Diversos métodos foram estabelecidos para os marcadores de EO em células animais, devido ao excesso da produção de EROs ou pela diminuição da defesa antioxidante¹²⁴. A SOD, é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em O_2 e em peróxido de hidrogênio (H_2O_2)¹²⁵. Posteriormente, o H_2O_2 é reduzido a H_2O através da glutathione peroxidase (GPH-Px) no citosol, ou através da CAT nos peroxissomos. A SOD, CAT e GSH são facilmente induzidas pelos fatores de EO, e seus níveis têm sido utilizados para quantificar o EO em células animais¹²⁶.

Com relação as enzimas antioxidantes, observamos que com relação aos níveis de SOD, nossos resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em ambas as dietas (Figura 17 – A). Contudo, observamos uma diminuição significativa dos níveis de CAT, no grupo que recebeu DP, nos animais tratados com lansoprazol e CT na dose de 25, 100 e 300 mg/kg, porém em comparação ao grupo Sham (Figura 17 – B). Com relação aos níveis de GSH, não observamos diferença significativa entre os grupos tratados em ambas as dietas (Figura 17 – C).

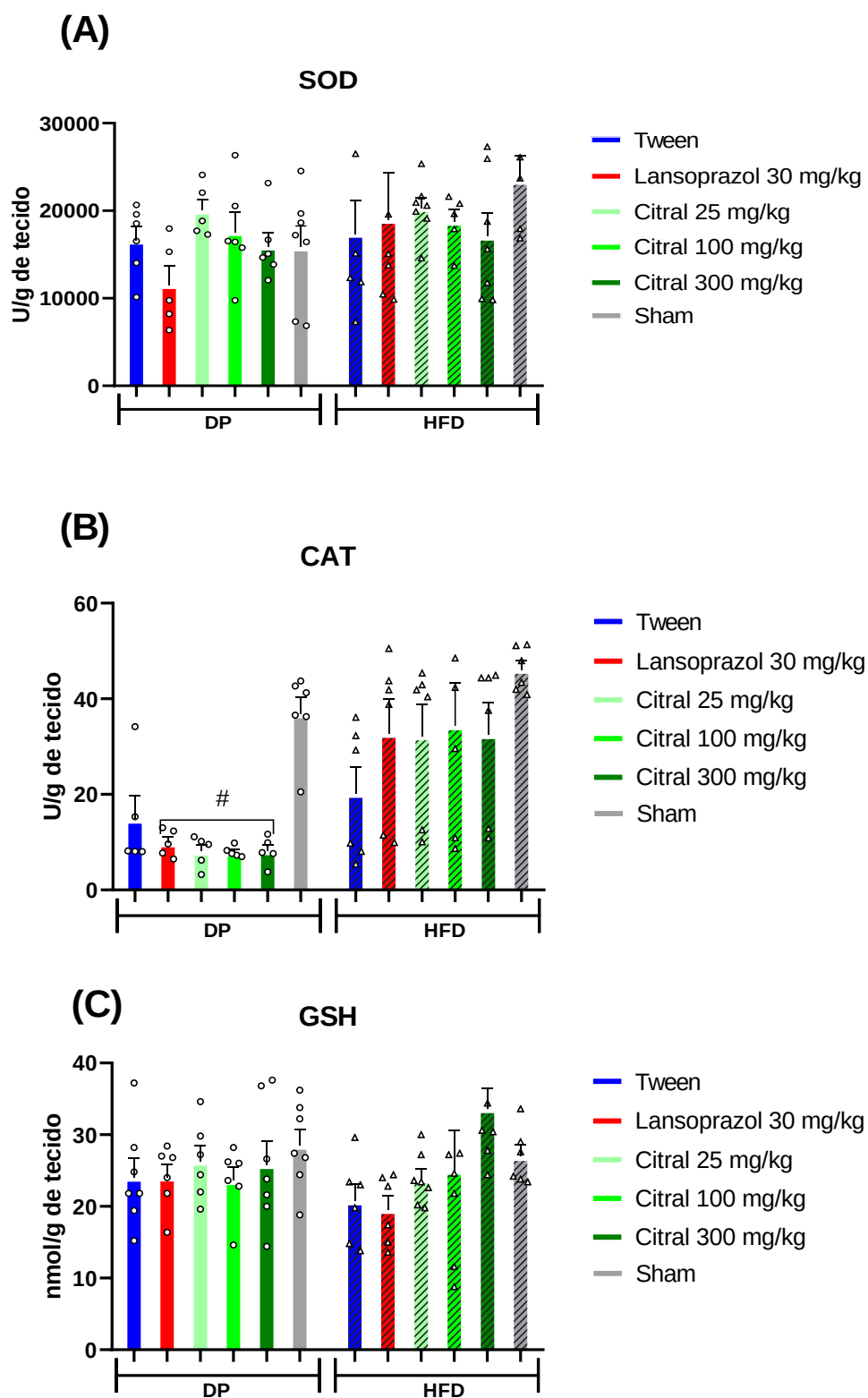


Figura 17. (A), (B) e (C) Análise da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH no esôfago de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Avaliação do efeito preventivo do citral (Citral; 25, 100 ou 300 mg/kg). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ ao comparar com o grupo controle negativo (Tween) e # $p < 0,05$ ao comparar com o grupo Sham.

Moléculas bioativas provenientes de plantas, ganharam grande atenção nos últimos anos, devido a sua importância terapêutica, desde a prevenção até o tratamento de doenças, seja na utilização de plantas inteiras, extratos vegetais ou até mesmo alguns constituintes isolados com perfis fitoquímicos completos⁵⁵.

Em nossos resultados, ao compararmos a atividade da CAT nas diferentes dietas (Figura 18), observamos um aumento significativo dessa enzima nos grupos HFD tratados com CT na dose de 25, 100 e 300 mg/kg quando comparado com o grupo DP (CT 25: 32.20 ± 6.64 vs. 8.05 ± 1.46 ; CT 100: 34.30 ± 9.09 vs. 7.99 ± 0.50 ; CT 300: 32.50 ± 6.62 vs. 8.15 ± 1.32). Com relação aos níveis de SOD e GSH, nossos resultados não apresentaram diferença significativa entre as dietas.

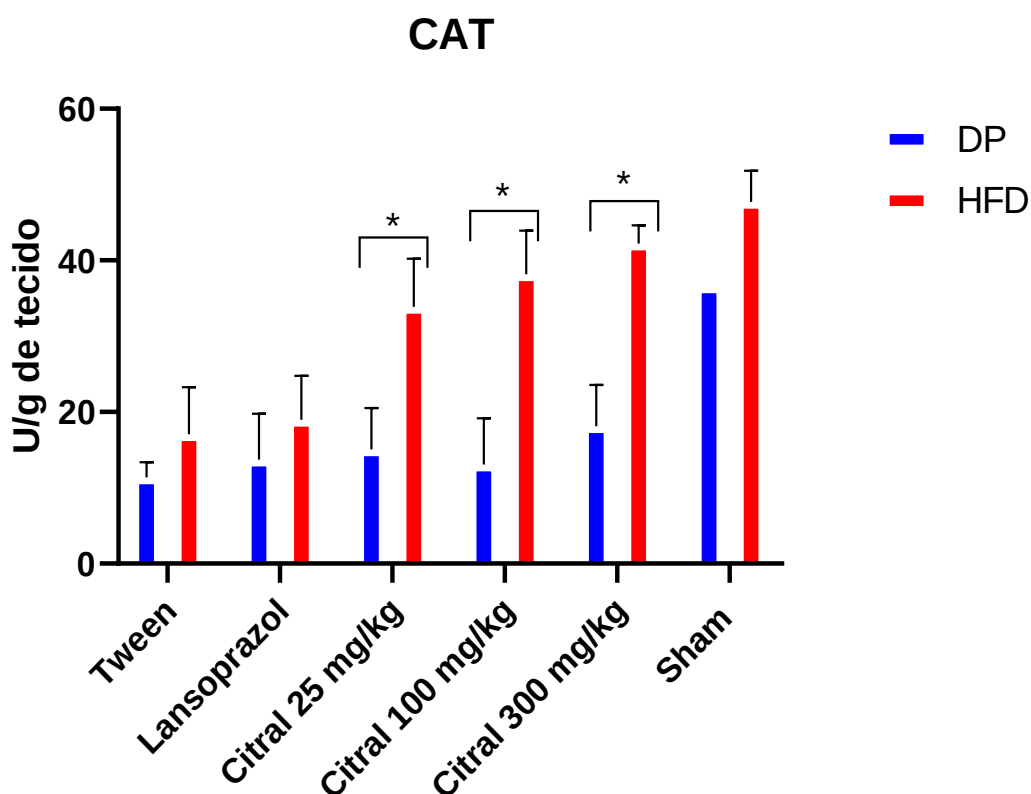


Figura 18. Análise da atividade da enzima antioxidante CAT no esôfago de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. **p* < 0,1 ao comparar o grupo HFD ao grupo DP.

Vários estudos demonstram que o dano causado na mucosa esofágica devido a DRGE, é decorrente da ação de vários fatores, dentre eles ocorre o estímulo que levam as células da mucosa e submucosa a liberarem mediadores inflamatórios, causando uma reação de inflamação¹²⁷. A MPO é uma enzima secretada por neutrófilos e monócitos ativados em condições inflamatórias e, também ocorrendo sua expressão em células endoteliais^{32,128}. Durante o processo inflamatório, a MPO é liberada catalisando a formação de várias espécies reativas, como ácido hipocloroso, que pode modificar as proteínas alvos após o processo de tradução^{129,130}. Estudos também demonstraram que os oxidantes derivados da MPO colaboram com o dano tecidual e com o início e propagação de doenças agudas e crônicas³⁰.

A principal função da MPO, se dá por sua atividade antimicrobiana e seu papel essencial na resposta imune inata. A liberação exacerbada da enzima pelos neutrófilos, pode acarretar em danos teciduais, como é observado em várias doenças³⁰. Dessa forma, os níveis elevados da MPO na circulação, indicam uma resposta às condições de aumento do processo inflamatório³³.

Em nosso trabalho, a atividade da enzima MPO foi quantificada (Figura 19) e observamos que o grupo que recebeu DP, apresentou uma redução significativa da ação enzimática quando tratado com 300 mg/kg de CT, em relação ao grupo veículo (CT 300 vs. Veículo, 4.10 ± 0.72 vs. 12.10 ± 2.27). No grupo que recebeu HFD, a redução significativa da atividade da MPO ocorreu nos grupos tratados com lansoprazol e CT na dose de 100 e 300 mg/kg, quando comparado ao seu grupo veículo (LZ vs. Veículo, 5.30 ± 0.67 vs. 13.10 ± 0.67 ; CT 100 vs. Veículo, 5.30 ± 0.82 vs. 13.10 ± 0.67 ; CT 300 vs. Veículo, 4.70 ± 1.53 vs. 13.10 ± 0.67). Observamos que o CT agiu de maneira efetiva em animais que receberam HFD, onde os tratamentos na dose de 100 e 300 mg/kg apresentaram níveis reduzidos da atividade de MPO, semelhantes ao tratamento com o fármaco padrão (LZ). Nas Figuras 13 e 14 possível avaliar macroscopicamente a área de lesão superficial do esôfago de animais submetidos a esofagite, a análise da ação da MPO contribuiu

para que avaliássemos o grau de comprometimento tecidual presente na DRGE e confirmássemos a ação protetora do CT na prevenção da doença.

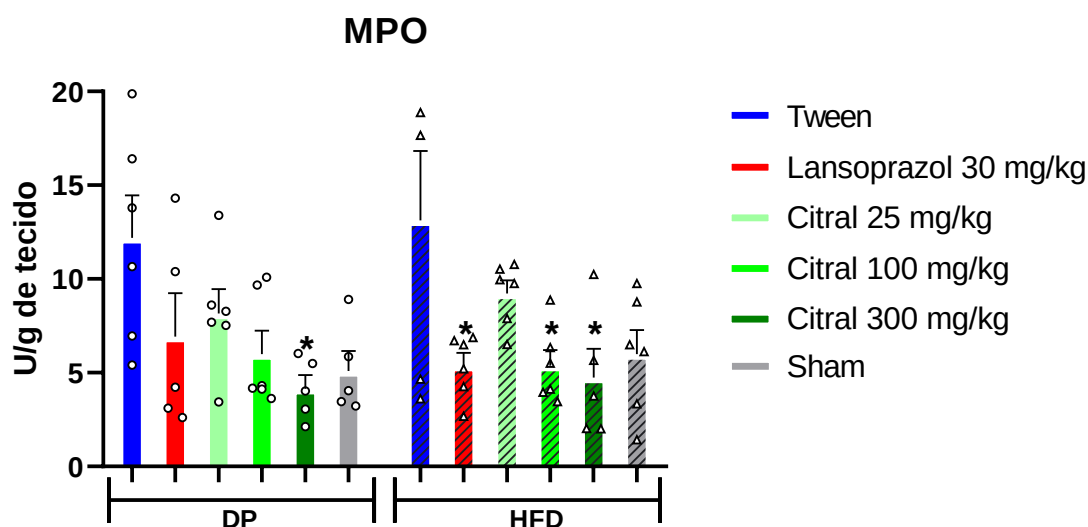


Figura 19. Análise da atividade da enzima MPO no esôfago de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Avaliação do efeito preventivo do citral (Citral; 25, 100 ou 300 mg/kg). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ ao comparar com o grupo Tween.

A resposta inflamatória causada pelo dano tecidual, desencadeia a liberação de mediadores pró-inflamatórios, e esse processo de defesa fisiológico que tem como objetivo manter a homeostase³⁴.

O processo inflamatório caracterizado pelo acúmulo de TA também apresenta aumento significativo de citocinas inflamatórias¹³¹. Estudos indicam que a inflamação relacionada à obesidade, aumenta a secreção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias de adipócitos e macrófagos¹³². Estudos também tem demonstrado que o TA visceral, apresenta uma maior resposta inflamatória em decorrência da obesidade, fato que pode ser evidenciado devido ao aumento do infiltrado de células imunes e a produção de citocinas¹³³.

Dessa forma, as citocinas inflamatórias liberadas pelo TA podem aumentar consideravelmente o risco de inflamação esofágica^{35,134}. Embora os mediadores pró-inflamatórios

presentes no esôfago não sejam distintos do que são encontrados na inflamação em outros órgãos, as alterações funcionais por eles produzidas podem ser características¹³⁵.

A IL-1 β e IL-6 são citocinas que atuam como mediadores-chaves no controle da resposta inflamatória¹³⁵. Estudos demonstram que os níveis de IL-1 β estão elevados na mucosa esofágica durante a inflamação decorrente do refluxo, em modelos animais e humanos, além de ser produzida através do contato entre a mucosa esofágica e o ácido^{136,137}. A IL-6 pode preceder o surgimento e induzir indiretamente a produção de IL-1 β ¹³⁶. Além disso, outras citocinas pró-inflamatórias têm sido alvo de investigação, como o TNF- α em estudos realizados com modelo de esofagite em ratos¹³⁸.

Frente ao estresse causado pelo modelo agudo de indução de esofagite nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa nos níveis séricos de IL-1 β entre os tratamentos em relação ao grupo tratado com veículo em ambas as dietas, DP e HFD. No entanto, observamos um aumento de IL-6 nos diferentes grupos em ambas as dietas, o que pode estar atrelado a uma redução do esvaziamento gástrico, e conseqüentemente, estar atuando nas lesões esofágicas¹³⁹. Estudos demonstraram que a IL-6 é capaz de reduzir a motilidade gástrica, agindo diretamente no processo de esvaziamento do conteúdo gástrico^{139,140}.

Em nossos resultados observamos um aumento significativo dos níveis séricos de IL-6, nos animais do grupo DP receberam veículo e CT na dose de 300 mg/kg quando comparado ao grupo Sham (Veículo vs. Sham, 488500 $\pm$ 75992 vs. 8816 $\pm$ 3061; CT 300 vs. Sham, 608735 $\pm$ 116215 vs. 8816 $\pm$ 3061). Já o grupo HFD, apresentou aumento significativo da IL-6 entre os animais que receberam CT na dose de 300 mg/kg quando comparado ao grupo Sham (CT 300 vs. Sham, 874001 $\pm$ 151173 vs. 10457 $\pm$ 4795), e o mesmo perfil foi observado nos animais que receberam as diferentes doses de citral, demonstrando que o citral elevou os níveis sistêmicos de IL-6, porém também protegeu a mucosa esofágica. Desse modo, nossa hipótese é que o citral

possui uma atuação de proteção local frente a lesões esofágicas provenientes de um quadro de esofagite aguda, mas não atuou de forma sistêmica na proteção, pois não foi capaz de reduzir a motilidade gástrica em todos os grupos, quando comparado aos animais do grupo Sham. Além disso, quando analisamos os resultados referentes a TNF- α , nossos resultados mostram que houve aumento significativo apenas no grupo DP, no tratamento de CT na dose de 300 mg/kg quando comparado ao grupo Sham (CT 300 vs. Sham, 2107 ± 117 vs. 958.3 ± 113.5), conforme mostra a Figura 20.

Nossos resultados mostram que dentre os grupos submetidos ao modelo agudo de esofagite, nenhum deles promoveu o aumento de citocinas pró-inflamatórias séricas, quando comparamos ao grupo veículo (Tween). Porém, observamos que as citocinas pró-inflamatórias dos grupos que foram tratados com CT se mostraram elevadas, quando comparamos com o grupo que não foi submetido ao modelo agudo de esofagite (Sham). Isso representa que o CT, de alguma forma, está modulando a ação de fatores pró-inflamatórios para essa determinada resposta. Devemos destacar também que a resposta com relação ao CT, até o momento, é de proteção. Uma vez que observamos que animais tratados com o monoterpeno apresentou redução a área de lesão, pH esofágico e na atividade de MPO quando comparado ao grupo de animais que recebeu veículo (tween).

Em modelos experimentais, quando se avalia o perfil inflamatório da lesão tecidual, ocorre o aumento de mediadores inflamatórios, contudo, buscamos avaliar o processo oxidativo que pode atuar diretamente numa redução do perfil inflamatório, como observado com relação ao MPO, porém devido a uma quantidade limitada e reduzida de amostras de tecido esofágico, analisamos o perfil inflamatório apenas no soro dos animais. Além disso, com esse resultado, observamos a existência da relação entre tempo e expressão, uma vez que buscamos o efeito da atividade de um modelo agudo e, possivelmente, esse aumento sistêmico de mediadores inflamatórios não poderia interferir diretamente no processo inflamatório decorrente da esofagite.

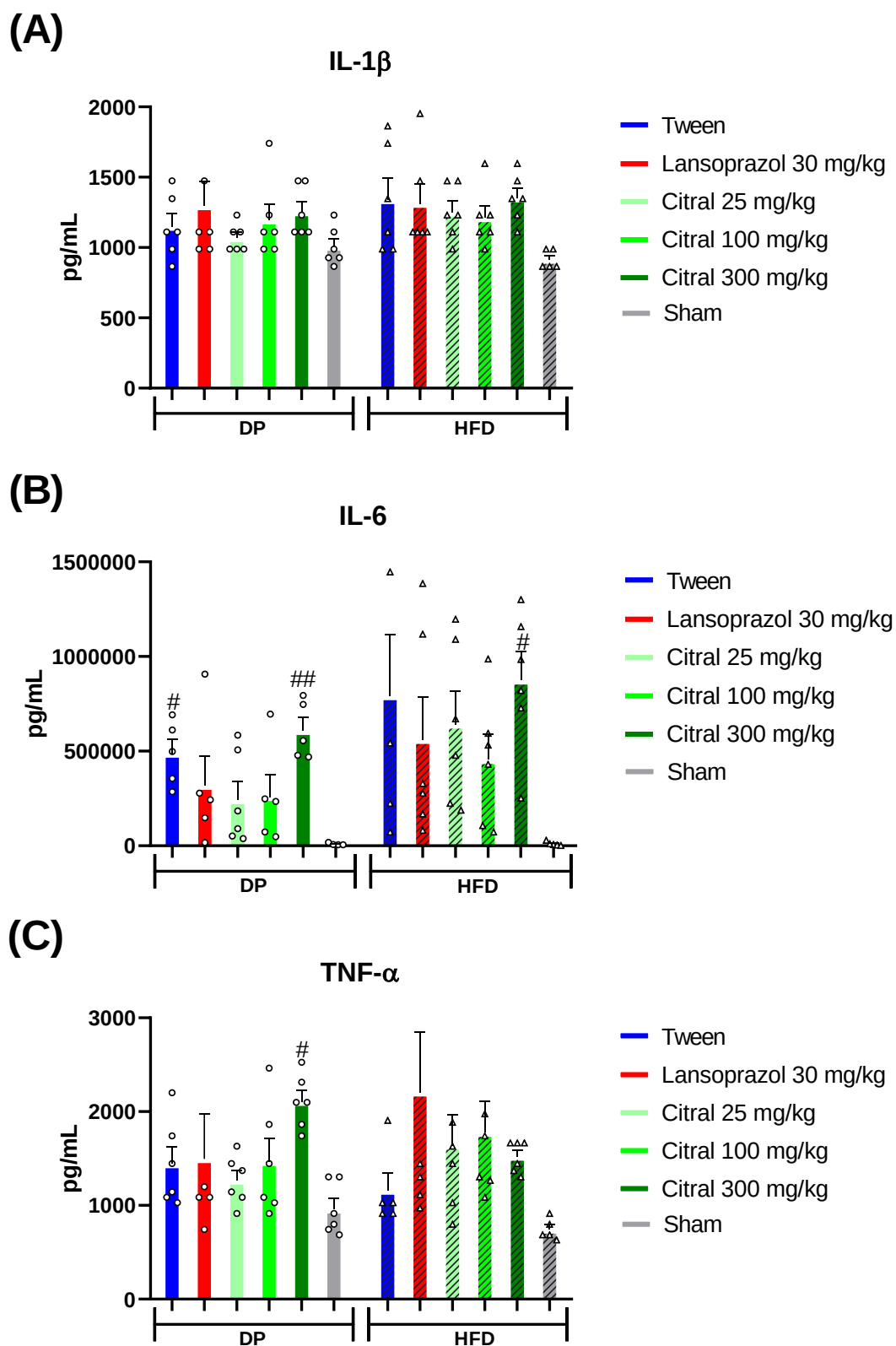


Figura 20. Níveis séricos de (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α em animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Avaliação do efeito preventivo do citral (Citral; 25, 100 ou 300 mg/kg). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo Teste de Tukey. #p < 0,1 e ##p < 0,01 ao comparar os grupos controle negativo (Tween) e Citral na dose de 300 mg/kg ao grupo Sham na DP.

A proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) é um membro pertencente à família de quimiocinas, como a CCL2, sendo um extenso grupo de moléculas responsável por realizar sinalização celular. Essa proteína pode ser produzida por uma variedade de células, inclusive pelas células endoteliais e epiteliais. Além disso, a MCP-1 é sintetizada e induzida quando há a ocorrência de EO, atividade de citocinas ou através da atividade de fator de crescimento específico¹⁴¹.

A MCP-1 é considerada eficiente na ativação de monócitos, macrófagos e linfócitos¹⁴². Estudos demonstraram que em adultos, os níveis de quimiocinas se encontraram elevados de forma significativa em tecidos esofágicos de pacientes com esofagite, quando comparados ao grupo controle. Ainda nesse contexto, estudos também mostraram uma correlação significativa entre a gravidade da esofagite e os níveis de quimiocinas com a MCP-1^{108,143}.

Nossos resultados demonstraram que em relação a proteína CCL2/MCP-1, houve aumento significativo apenas no grupo que recebeu HFD em animais tratados com CT na dose de 25 mg/kg ao comparar com o grupo Sham (CT25 vs. Sham, $4658,0 \pm 1289,0$ vs. $1541,0 \pm 45,4$), conforme é demonstrado na Tabela 2.

CCL2/MCP-1 (pg/mL)		
Grupos	DP	HFD
Tween	3381,0 ± 450,9	2583,0 ± 498,6
Lansoprazol	3476,0 ± 871,7	2267,0 ± 173,5
Citral 25 mg/kg	2969,0 ± 457,7	4658,0 ± 1289,0 #
Citral 100 mg/kg	2708,0 ± 457,0	2928,0 ± 428,8
Citral 300 mg/kg	3562,0 ± 286,0	3486,0 ± 467,5
Sham	2017,0 ± 257,4	1541,0 ± 45,4

Tabela 2. Análise da atividade de CCL2/MCP-1 no soro de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média ± E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental. #p < 0,05 ao comparar o grupo Citral na dose de 25mg/kg ao grupo Sham na HFD.

A IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória com papel fundamental no aumento da atividade de neutrófilos, macrófagos e células natural killer (NK)¹⁴⁴. As células T auxiliares do tipo 1 (Th1), além de produzirem INF- γ , também são responsáveis pela produção de TNF- α , que levam a ativação de macrófagos e promovem a imunidade mediada por células¹⁴⁵.

De acordo com estudos clínicos, existem vários níveis de inflamação causados pelo refluxo esofágico, e o equilíbrio entre as respostas imunes de Th1 e Th2 é considerado fundamental no desenvolvimento da doença, uma vez que a proliferação de linfócitos T auxiliares, é responsável por reprimir a resposta imune proveniente de Th2^{40,144}.

IFN- γ e IL-4 são os reguladores principais das respostas imunes de Th1 e Th2, respectivamente^{146,147}, e estudos demonstraram que durante o refluxo esofágico, os níveis de IFN- γ se mostraram elevados, e os níveis de IL-4 são reduzidos. Essas alterações caracterizam o grau de inflamação aguda causada na esofagite, indicando que o refluxo pode levar a indução dessas citocinas pró-inflamatórias.

Em relação aos parâmetros avaliados de IFN- γ , nossos resultados demonstraram que houve um aumento significativo apenas no grupo que recebeu HFD e tratamento do CT na dose de 300 mg/kg quando comparado ao grupo Sham (CT300 vs. Sham, $781,2 \pm 44,5$ vs. $610,5 \pm 39,3$), conforme está demonstrado na Tabela 3. Embora o dano esofágico causado pelo refluxo induza um aumento da expressão de IFN- γ , em nosso estudo esse aumento foi observado apenas em um grupo tratado com CT, levantando a hipótese de avaliar se esse efeito pode estar ocorrendo em decorrência da atividade de agentes antioxidantes.

Grupos	INF- γ (pg/mL)	
	DP	HFD
Tween	$701,8 \pm 33,1$	$715,3 \pm 47,3$
Lansoprazol	$682,5 \pm 50,4$	$701,8 \pm 33,3$
Citral 25 mg/kg	$649,2 \pm 20,2$	$728,1 \pm 28,8$
Citral 100 mg/kg	$688,9 \pm 44,5$	$714,8 \pm 24,2$
Citral 300 mg/kg	$714,8 \pm 24,2$	$781,2 \pm 44,5$ #
Sham	$638,3 \pm 31,4$	$610,5 \pm 39,3$

Tabela 3. Análise da atividade de IFN- γ no soro de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). Os resultados foram expressos em média $\pm$ E.P.M. e a significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental. #p < 0,05 ao comparar o grupo Citral na dose de 300 mg/kg ao grupo Sham na HFD.

Devido ao processo lesivo causado pelo refluxo gastroesofágico, ocorre uma desestruturação e destruição da mucosa esofágica. O mecanismo de cicatrização em tecidos lesionados, envolve a proliferação, migração e também diferenciação celular¹⁴⁸. Estudos demonstram que a desregulação das MMP, acarreta no comprometimento da angiogênese e também da cicatrização de úlceras gastrointestinais^{149–152}.

A MMP-2 (gelatinase A) é expressa por alguns tipos celulares e está envolvida no processo de remodelação da MEC¹⁵³. Um estudo demonstrou que os níveis de MMP-2 se encontram elevados em indivíduos com esofagite, onde sua expressão ocorre em células epiteliais em proliferação, mostrando que fatores de crescimento podem induzir a expressão de MMP-2 de células epiteliais esofágicas a fim de causar fibrose tecidual¹⁵⁴. A MMP-9 (gelatinase B) se mostrou promissora como alvo terapêutico, de acordo com estudos que evidenciam sua participação em processos patológicos que contribuem para a inflamação crônica. Além disso, sua expressão e atividade quando desreguladas, estão associadas à vários distúrbios metabólicos. Atualmente, embora existam poucos estudos sobre a relação entre a expressão de MMP-9 e a DRGE, alguns estudos encontrados relataram altos valores da expressão de MMP-9 dentro da membrana citoplasmática e no epitélio esofágico de pacientes com DRGE, indicando que sua expressão elevada está associada com formas mais graves da doença, como esôfago de Barret e adenocarcinoma esofágico^{155,156}. Desse modo, pode-se notar que as MMP-2 e MMP-9, possuem um papel fundamental na degradação das proteínas de MEC e afeta a remodelação tecidual. Além disso, a ativação e expressão dessas MMP está diretamente ligada a acontecimentos fisiopatológicos, como inflamação e fibrose tecidual¹⁵⁷.

Apesar dos resultados de MMP-2 e MMP-9 não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, pudemos observar que dentre os animais que receberam DP, o grupo que recebeu CT na dose de 300 mg/kg e o grupo controle (tween) apresentam uma quantidade maior de MMP-2. Nos animais que receberam HFD, observamos que os grupos tratados com CT na dose de 25 e 100 mg/kg, houve uma redução de MMP-2 enquanto os demais grupos demonstraram um aumento, apesar desses resultados não serem estatisticamente diferentes. Do mesmo modo, observamos que animais alimentados com DP e provenientes dos grupos tratados com CT na dose de 25 e 100 mg/kg apresentaram menores níveis de MMP-9 com relação aos outros grupos, apesar da ausência de significância estatística.

MMP-2 (DOI)		
Grupos	DP	HFD
Tween	3656,0 ± 709,3	4074,0 ± 676,5
Lansoprazol	2372,5 ± 824,5	6923,0 ± 3144,0
Citral 25 mg/kg	1623,7 ± 300,5	3269,0 ± 336,0
Citral 100 mg/kg	1875,7 ± 311,3	3148,0 ± 626,1
Citral 300 mg/kg	3826,0 ± 615,8	5726,0 ± 1521,0
Sham	2168,1 ± 489,8	6576,0 ± 1090,0

Tabela 4. Análise da atividade de MMP-2 no tecido esofágico de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental.

MMP-9 (DOI)		
Grupos	DP	HFD
Tween	13333,0 ± 3106,0	8536,6 ± 1754,0
Lansoprazol	10614,4 ± 1984,0	10796,0 ± 2370,0
Citral 25 mg/kg	7996,2 ± 343,5	11535,0 ± 1661,0
Citral 100 mg/kg	7477,4 ± 1419,0	10484,0 ± 1940,0
Citral 300 mg/kg	13055,0 ± 2940,0	14086,0 ± 1129,0
Sham	13667,0 ± 3304,0	12702,0 ± 1320,0

Tabela 5. Análise da atividade de MMP-9 no tecido esofágico de animais submetidos ao modelo de esofagite que receberam dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (HFD). A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar a diferença entre animais DP e HFD dentro de cada grupo experimental.

Estudos demonstram a ocorrência de níveis elevados de MMP-2 e uma regulação de forma positiva da MMP-9 no TA de camundongos obesos¹⁵⁸. Neste contexto, existe a hipótese de que as MMP sejam responsáveis por controlar a remodelação tecidual em resposta à ingestão excessiva de nutrientes, resultando em alterações da capacidade metabólica desses tecidos¹⁵⁸. Embora os resultados apresentados de MMP não apresentem diferença significativa com relação ao modelo de DRGE, quando se trata de modelo de indução da obesidade, nossos resultados mostraram que embora também não ocorra diferença significativa das MMP entre as dietas, observamos que da mesma forma como citado acima, os níveis de MMP-2 se apresentam maiores em todos os tratamentos, quando comparamos o grupo HFD ao DP.

Diante disso, as perspectivas futuras para esse trabalho é considerar que novas avaliações sejam feitas a partir da ação do CT dentro do perfil inflamatório, como as citocinas pró-inflamatórias em lesões esofágicas decorrentes de um modelo agudo da DRGE implantada experimentalmente. Uma vez que em nosso estudo, a quantidade de amostras de tecido esofágico foi limitada e medida a nível sistêmico, é necessário que haja uma melhor elucidação do mecanismo pró-inflamatório.

5. CONCLUSÃO

Podemos concluir que tratamento agudo com CT foi efetivo na DRGE em animais eutróficos e obesos. Prevenindo as lesões esofágicas causadas pelo refluxo gastroesofágico e diminuindo uma resposta inflamatório no tecido, através da redução da atividade da enzima MPO, possivelmente causado por um aumento do pH esofágico. Embora nossos resultados demonstrem uma resposta de proteção do CT em ambas as dietas, foi possível observar que no grupo que recebeu HFD o tratamento com CT demonstrou uma maior efetividade de acordo com os parâmetros avaliados até o momento.

REFERÊNCIAS

1. WHO. <https://www.who.int/> (2017).
2. Saúde, M. da. *Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico*. G. Estatística e Informação em Saúde (2019).
3. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 415–445 (2011).
4. Kim, J. E. *et al.* The Roles and Associated Mechanisms of Adipokines in Development of Metabolic Syndrome. *Molecules* **27**, 1–19 (2022).
5. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**, 860–867 (2006).
6. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
7. Calder, P. C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. *Eur. J. Pharmacol.* **668**, S50–S58 (2011).
8. Wu, H. & Ballantyne, C. M. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ. Res.* **126**, 1549–1564 (2020).
9. Rogero, M. M. & Calder, P. C. OBesity Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients* **10**, 432 (2018).
10. Rajala, M. W. & Scherer, P. E. Minireview: The adipocyte - At the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* **144**, 3765–3773 (2003).
11. Guzik, T. J. *et al.* The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc. Res.* **113**, 1009–1023 (2017).
12. Suter, M. *et al.* Gastro-esophageal Reflux and Esophageal Motility Disorders in Morbidly Obese Patients. 959–966 (2004).
13. Johnson, D. A. & Fennerty, M. B. Heartburn Severity Underestimates Erosive Esophagitis Severity in Elderly Patients with Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology* **126**, 660–664 (2004).
14. Nakahara, K. *et al.* Acid reflux directly causes sleep disturbances in rat with chronic esophagitis. *PLoS One* **9**, (9):e106969 (2014).
15. Vaezi, M. F. & Sifrim, D. Assessing Old and New Diagnostic Tests for Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology* **154**, 289–301 (2018).
16. Vakil, N. *et al.* The Montreal Definition and Classification of Gastroesophageal Reflux Disease : A Global Evidence-Based Consensus. *American Journal of Gastroenterology* **101**, 1900–1920 (2006).
17. Herregods T. V. K, Bredenoord A. J. P. M. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease : new understanding in a new era. *Motil* **27**, 1202-1213 (2015).

18. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846 (2006).
19. Calabro, P. & Yeh, E. T. H. Intra-abdominal adiposity, inflammation, and cardiovascular risk: New insight into global cardiometabolic risk. *Curr. Hypertens. Rep.* **10**, 32–38 (2008).
20. Triantos, C. *et al.* Changes in the esophageal mucosa of patients with non erosive reflux disease: How far have we gone? *World J. Gastroenterol.* **21**, 5762–5767 (2015).
21. Yu, H. X. *et al.* Involvement of the TLR4/NF- κ B signaling pathway in the repair of esophageal mucosa injury in rats with gastroesophageal reflux disease. *Cell. Physiol. Biochem.* **51**, 1645–1657 (2018).
22. Hart, I. R. & Saini, A. Biology of tumour metastasis. Science and Practice - *The Lancet* **39**, 1453–1457 (1992).
23. Wasim, M., Awan, F. R., Najam, S. S., Khan, A. R. & Khan, H. N. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. *Biochem. Genet.* **54**, 565–572 (2016).
24. Gill, S. E. & Parks, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1334–1347 (2008).
25. Ghedin, E. *et al.* Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* **437**, 1162–1166 (2005).
26. Odaka, C., Tanioka, M. & Itoh, T. Neovascularization following Thymocyte Apoptosis. *The Journal of Immunology* **9**, 846-853 (2005).
27. Wang, C. *et al.* Association of Matrix Metalloproteinase (MMP) -2 and -9 Expression with Extra-gastrointestinal Stromal Tumor Metastasis. **15**, 4187–4192 (2014).
28. Zeng, Z. S. *et al.* Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* **20**, 749–755 (1999).
29. Groblewska, M. *et al.* The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.* **50**, 12–19 (2012).
30. Aratani, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* **640**, 47–52 (2018).
31. Odobasic, D., Kitching, A. R. & Holdsworth, S. R. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: The role of myeloperoxidase. *J. Immunol. Res.* **2016**, (2016).
32. La Rocca, G. *et al.* Oxidative stress induces myeloperoxidase expression in endocardial endothelial cells from patients with chronic heart failure. *Basic Res. Cardiol.* **104**, 307–320 (2009).
33. Ramachandra, C. J. A. *et al.* Myeloperoxidase As a Multifaceted Target for Cardiovascular Protection. *Antioxidants Redox Signal.* **32**, 1135–1149 (2020).

34. Masaka, T. *et al.* Gender differences in oesophageal mucosal injury in a reflux oesophagitis model of rats. *Gut* **62**, 6–14 (2013).
35. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
36. Souza, R. F. *et al.* Gastroesophageal Reflux Might Cause Esophagitis Through a Cytokine-Mediated Mechanism Rather Than Caustic Acid Injury. *YGA* **137**, 1776–1784 (2009).
37. Shan, J. *et al.* Interferon γ -induced nuclear interleukin-33 potentiates the release of esophageal epithelial derived cytokines. *PLoS One* **11**, 1–15 (2016).
38. Rieder, F. *et al.* Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis and carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **298**, G571-81 (2010).
39. Rieder, F. *et al.* Gastroesophageal reflux disease-associated esophagitis induces endogenous cytokine production leading to motor abnormalities. *Gastroenterology* **132**, 154–165 (2007).
40. Fitzgerald R.C. *et al.* Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut* **50**, 451–459 (2002).
41. Hamaguchi, M. *et al.* Esophageal Disorders Increased Expression of Cytokines and adhesion molecules in rat chronic esophagitis. *Digestion* **68**, 189–197 (2003).
42. Kelleher, D. & Reynolds, J. V. Potential Role of NF- κ B in Esophageal Adenocarcinoma: As an Emerging Molecular Target. *J Surg Res.* **153**, 172–180 (2009).
43. Giri, A. K. *et al.* Effect of lycopene against gastroesophageal reflux disease in experimental animals. *BMC Complement Altern Med* **15**, 110 (2015).
44. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* **86**, 715-748 (2017).
45. Sies, H. On the History of Oxidative Stress: Concept and Some Aspects of Current Development. *Curr. Opin. Toxicol.* **7**, 122-126 (2020).
46. Li, S., Hong, M., Tan, H., Wang, N. & Feng, Y. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* **2016**:4234061, (2016).
47. Muriel, P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol. Int.* **3**, 526–536 (2009).
48. d'Ischia, M., Manini, P. & Napolitano, A. Oxidative damage to carbohydrates and amino acids. *Oxidative Stress. Dis. Cancer* 333–356 (2006).
49. Mostafa Abd El-Aal, H. A. H. Lipid Peroxidation End-Products as a Key of Oxidative Stress: Effect of Antioxidant on Their Production and Transfer of Free Radicals. *Lipid Peroxidation* (2012).
50. Nishida, N. *et al.* Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. *Dig. Dis.* **31**, 459–

466 (2013).

51. Cadenas, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *BioFactors* **6**, 391–397 (1997).
52. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44–84 (2007).
53. Ore, A. & Akinloye, O. A. Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Med.* **55**, 1–14 (2019).
54. Simioni, C. *et al.* Oxidative stress : role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget* **9**, 17181–17198 (2018).
55. Sharifi-Rad, M. *et al.* Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front. Physiol.* **11**, 1–21 (2020).
56. Oh, T. Y. *et al.* Accelerated ulcer healing and resistance to ulcer recurrence with gastroprotectants in rat model of acetic acid-induced gastric ulcer. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **42**, 204–214 (2008).
57. Raghunath A.S., Morain, C. O. & Mcloughlin, R. C. Review article : the long-term use of proton-pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther.* **22**, 55–63 (2005).
58. Daila S. Nagel, H. M. S. *Farmacologia Integrativa da Inflamação*.
59. Abraham, N. S. Proton pump inhibitors: potential adverse effects. *Curr Opin Gastroenterol.* **28**, 615–620 (2012).
60. Yadlapati, R. & Delay, K. Proton Pump Inhibitor-Refractory Gastroesophageal Reflux Disease. *Med Clin North Am.* **103**, 15–27 (2019).
61. Lin, P. *et al.* The efficacy and safety of proton pump inhibitors vs histamine-2 receptor antagonists for stress ulcer bleeding prophylaxis among critical care patients: A meta-analysis. *Crit Care Med* **38**, 1197–1205 (2010).
62. Bansal, V. K. & Goel, R. K. Gastroprotective effect of *Acacia nilotica* young seedless pod extract : Role of polyphenolic constituents. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **5**, 523–528 (2012).
63. Szwenger, S. & Basu, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **3**, 1–7 (2008).
64. Lange, B. M. & Ahkami, A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnol. J.* **11**, 169–196 (2013).
65. Nishijima, C. M. *et al.* Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.* **736**, 16–25 (2014).
66. Viana, G. S. B. *et al.* Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J. Ethnopharmacology* **70**, 323–327 (2000).

67. Emílio-Silva, M. T. *et al.* Antipyretic Effects of Citral and Possible Mechanisms of Action. *Inflammation* **40**, 1735–1741 (2017).
68. Sri, S. & Natarajan, D. Citral , a Monoterpene Inhibits Adipogenesis Through Modulation of Adipogenic Transcription Factors in 3T3-L1 Cells. *Indian J. Clin. Biochem.* **33**, 414-421 (2017).
69. Gonçalves, E.C.D. *et al.* Citral Inhibits the In fl ammatory Response and Hyperalgesia in Mice: The Role of TLR4, TLR2/Dectin-1, and CB2 Cannabinoid Receptor/ ATP-Sensitive K + Channel Pathways. *J. Nat. Prod.* **83**, 1190-1200 (2020).
70. Bachiega, T. F. & Sforcin, J. M. Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **137**, 909–913 (2011).
71. Olmo, D., Feliciano, A. S. & Filho, V. C. Anti-hyperalgesic effects of two sphingosine derivatives in different acute and chronic models of hyperalgesia in mice. *Pharmacol. Reports* **70**, 753-759 (2018).
72. Bailly, C. Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereo-isomers. *European Journal of Pharmacology* **871**: 172945 (2020).
73. Arçari, D. P. *et al.* The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. *Food Chem.* **141**, 809–815 (2013).
74. Takeuchi, K. & Nagahama, K. Animal model of acid-reflux esophagitis: Pathogenic roles of acid/pepsin, prostaglandins, and amino acids. *Biomed Res. Int.* **2014**:532594, (2014).
75. Gilles, L. The Estimation Of Red Cell Superoxide Dismutase Activity By Pulse Radiolysis In Normal And Trisomic 21 Subjects. *J Lab Clin Med* **69**, 55–58 (1976).
76. Aebi, H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* **105**: 121-6 (1984).
77. Anderson, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* **113**, 548–555 (1985).
78. Krawisz, J. E., Sharon, P. & Stenson, W. F. Quantitative Assay for Acute Intestinal Inflammation Based on Myeloperoxidase Activity Assessment of Inflammation in Rat and Hamster Models. *Gastroenterology* **87**, 1344–1350 (1984).
79. Steffensen, B. & Hakkinen, L. Proteolytic events of wound-healing- coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPS), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Ver Oral Biol Med* **12**, 373–398 (2001).
80. Wang, C. Y. & Liao, J. K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol. Biol.* **821**, 421–433 (2012).
81. Nagy, C. & Einwallner, E. Study of in vivo glucose metabolism in high-fat diet-fed mice using oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT). *J. Vis. Exp.* **2018**, 1–12 (2018).
82. Schlottmann, F., Dreifuss, N. H. & Patti, M. G. Obesity and esophageal cancer: GERD, Barrett’s esophagus, and molecular carcinogenic pathways. *Expert Rev. Gastroenterol.*

- Hepatol.* **14**, 425–433 (2020).
83. Grasa-lópez, A. *et al.* Undaria pinnatifida and Fucoxanthin Ameliorate Lipogenesis and Markers of Both Inflammation and Cardiovascular Dysfunction in an Animal Model of Diet-Induced Obesity. *Mar Drugs* **14**, 148 (2016).
 84. Sharma, B. R. *et al.* Caulerpa okamurae extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and prevents high fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Nutr. Res.* **47**, 44–52 (2017).
 85. Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 772–783 (2006).
 86. Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548–2556 (2004).
 87. Szydło, B. *et al.* Role of omentin and chemerin in metabolic syndrome and tumor diseases. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* **70**, 844–849 (2016).
 88. Heymsfield, S. B. & Wadden, T. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N. Engl. J. Med.* **376**, 254–266 (2017).
 89. Hubert, H. B. *et al.* Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: A 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* **67**, 968–977 (1983).
 90. Britton, K. A. & Fox, C. S. Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation* **124**, (2011).
 91. Qi, H. *et al.* Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: The Jackson Heart Study. *Nature*. **388**, 539–547 (2018).
 92. Iwasa, M. *et al.* Visceral fat volume predicts new-onset type 2 diabetes in patients with chronic hepatitis C. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **94**, 468–470 (2011).
 93. Kurioka, S. *et al.* Relationship between visceral fat accumulation and anti-lipolytic action of insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Journal*. **49** 459–464 (2002).
 94. Widmaier, E. P. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Endocr.* **33**, 176–188 (2008).
 95. Feinle-Bisset, C. Modulation of hunger and satiety: Hormones and diet. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **17**, 458–464 (2014).
 96. Arita, S. & Inagaki-Ohara, K. High-fat-diet-induced modulations of leptin signaling and gastric microbiota drive precancerous lesions in the stomach. *Nutrition*. **67–68** (2019).
 97. Blundell, J. E. *et al.* Appetite control and energy balance: Impact of exercise. *Obes. Rev.* **16**, 67–76 (2015).
 98. Orah, J. *et al.* Sex-specific changes in metabolism during the transition from chow to high-fat diet feeding are abolished in response to dieting in C57BL / 6J mice. *Int J Obes (Lond)*. Online ahead of print 1–10 (2022).

99. Han, J., Odelade, A. & Freely, F. D. High-Fat Diet-Induced Weight Gain , Behavioral Deficits , and Dopamine Changes in Young C57BL/6J Mice. *Front Nutr.* **7**, 1–10 (2021).
100. Kahn, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* **46**, 3–19 (2003).
101. Bergman, R. N. et al. Accurate Assessment of β -Cell Function. *Diabetes* **51**, 212-220 (2002).
102. Qatanani, M. & Lazar, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: Many choices on the menu. *Genes Dev.* **21**, 1443–1455 (2007).
103. Rees, D. A. & Alcolado, J. C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicinel.* **22**, 359–370 (2005).
104. Murray, L. et al. Relationship between body mass and gastro-oesophageal reflux symptoms: The Bristol Helicobacter Project. *Int. J. Epidemiol.* **32**, 645–650 (2003).
105. Mathus-Vliegen, E. M. H., Van Weeren, M. & Van Eerten, P. V. LOS function and obesity: The impact of untreated obesity, weight loss, and chronic gastric balloon distension. *Digestion* **68**, 161–168 (2003).
106. Tack, J. & Pandolfino, J. E. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology.* **154**, 277-288 (2018).
107. Orlando, R. C., Powell, D. W. & Carney, C. N. Pathophysiology of acute acid injury in rabbit esophageal epithelium. *J. Clin. Invest.* **68**, 286–293 (1981).
108. Srivastava, A. Diversity in the esophageal phenotypic response to gastroesophageal reflux: immunologic determinants. *Indian J. Gastroenterol.* **21**, 169 (2002).
109. Isomoto, H. Elevated levels of chemokines in esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis. *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 551–556 (2003).
110. Ashida, K. et al. Maintenance for healed erosive esophagitis: Phase III comparison of vonoprazan with lansoprazole. *World J. Gastroenterol.* **24**, 1550–1561 (2018).
111. Xiao, Y. et al. Phase III, randomised, double-blind, multicentre study to evaluate the efficacy and safety of vonoprazan compared with lansoprazole in Asian patients with erosive oesophagitis. *Gut* **69**, 224–230 (2020).
112. Çelebi, A. et al. Comparison of the effects of esomeprazole 40mg, rabeprazole 20mg, lansoprazole 30mg, and pantoprazole 40mg on intragastric pH in extensive metabolizer patients with gastroesophageal reflux disease. *Turkish J. Gastroenterol.* **27**, 408–414 (2016).
113. Shibli, F., Kitayama, Y. & Fass, R. Novel Therapies for Gastroesophageal Reflux Disease: Beyond Proton Pump Inhibitors. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **22**, (2020).
114. Khinchi, P. et al. Combination therapy of gamma-aminobutyric acid derivative promotes proton pump inhibitor based healing of reflux esophagitis in animal model. *Pharmacol. Reports* **66**, 165–168 (2014).

115. DeVault, K. R. & Castell, D. O. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 190–200 (2005).
116. Clarrett, D. M. & Hachem, C. Gastroesophageal reflux disease affects millions of people worldwide with significant clinical implications. *Mo. Med.* **115**, 214–218 (2018).
117. Patel, A. et al. Parameters on esophageal pH impedance monitoring that predict outcomes of patients with gastroesophageal reflux disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **13**, 884–891 (2016).
118. Manna, P. & Jain, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **13**, 423–444 (2015).
119. Wetscher, G. J. et al. Free radical scavengers prevent reflux esophagitis in rats. *Dig. Dis. Sci.* **40**, 1292–1296 (1995).
120. Nelkine, L. et al. Role of antioxidants in the treatment of gastroesophageal reflux disease-associated idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **26**, 363–371 (2020).
121. Kurutas, E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: Current state. *Nutr. J.* **15**, 1–22 (2016).
122. Tsatsakis, A. et al. A Mechanistic and pathophysiological approach for stroke associated with drugs of abuse. *J. Clin. Med.* **8**, (2019).
123. Padureanu, R. et al. Oxidative stress and inflammation interdependence in multiple sclerosis. *J. Clin. Med.* **8**, 1–11 (2019).
124. Armstrong, D. Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols. **186** (2002).
125. Fridovich, I. Superoxide Dismutases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **41**, 35–97 (2006).
126. van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N. P. E. Soil Quality Field Kit : Part II. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **13**, 57–149 (2016).
127. Dent, J., El-Serag, H. B., Wallander, M. A. & Johansson, S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: A systematic review. *Gut* **54**, 710–717 (2005).
128. Mcdermott, J. H. Antioxidant Nutrients : Current. *J. Am. Pharm. Assoc.* **40**, 785–799 (2000).
129. Abdo, A. I., Rayner, B. S., Reyk, D. M. Van & Hawkins, C. L. Redox Biology Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase oxidants induces endothelial dysfunction. *Redox Biol.* **13**, 623–632 (2017).
130. Love, D. T. et al. Cellular targets of the myeloperoxidase-derived oxidant hypothiocyanous acid (HOSCN) and its role in the inhibition of glycolysis in macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **94**, 88–98 (2016).
131. Castro, M. et al. Obesity: The Metabolic Disease, Advances on Drug Discovery and Natural Product Research. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 2577–2604 (2016).

132. Klöting, N. & Blüher, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **15**, 277–287 (2014).
133. Altintas, M. M. *et al.* Apoptosis, mastocytosis, and diminished adipocytokine gene expression accompany reduced epididymal fat mass in long-standing diet-induced obese mice. *Lipids Health Dis.* **10**, 1–12 (2011).
134. International, T. *et al.* Obesity , metabolic syndrome and esophageal adenocarcinoma : Epidemiology , etiology and new targets. *Cancer Epidemiol.* **35**, 309–319 (2011).
135. Rieder, F. *et al.* Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G5721-G581 (2010).
136. Cheng, L. *et al.* Acid-Induced Release of Platelet-Activating Factor by Human Esophageal Mucosa Induces Inflammatory Mediators in Circular Smooth Muscle. **319**, 117–126 (2006).
137. Cheng, L. *et al.* In vitro model of acute esophagitis in the cat. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **289**, G860-869 (2005).
138. Hamaguchi M. *et al.* Increased of expression of cytokynes and adhesion molecules in rat chronic esophagitis. *Digestion* **68**, 189-197 (2003).
139. Lang Lehrskov, L. *et al.* Interleukin-6 Delays Gastric Emptying in Humans with Direct Effects on Glycemic Control. *Cell Metab.* **27**, 1201-1211 (2018).
140. Docsa, T. *et al.* The Role of Inflammatory Mediators in the Development of Gastrointestinal Motility Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
141. Deshmane, S. L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J. Interf. Cytokine Res.* **29**, 313–325 (2009).
142. Mukaida, N., Harada, A. & Matsushima, K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**, 9–23 (1998).
143. Kanazawa, Y. *et al.* Impact of endoscopically minimal involvement on IL-8 mRNA expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive reflux disease. *World J. Gastroenterol.* **9**, 2801–2804 (2003).
144. Schroder, K. *et al.* Interferon-gamma: an overview of signals , mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* **75**, 571-581 (2004).
145. Cullender, T. C. *et al.* Article Innate and Adaptive Immunity Interact to Quench Microbiome Flagellar Motility in the Gut. *Cell Host Microbe* **14**, 571–581 (2013).
146. Teloni, R., Rossi, P. & Cristina, M. Interleukin- 4 inhibits cyclo-oxygenase- 2 expression and prostaglandin E 2 production by human mature dendritic cells. *Immunology.* **120**, 83–89 (2006).
147. Chartouni, C. El & Rehli, M. Immunobiology Comprehensive analysis of TLR4-induced transcriptional responses in interleukin 4-primed mouse macrophages. *Immunobiology* **215**,

780–787 (2010).

148. Tarnawski, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig. Dis. Sci.* **50**, 24–33 (2005).
149. Swarnakar, S. *et al.* Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases 9 and 2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *J. Biol. Chem.* **280**, 9409–9415 (2005).
150. Kobayashi, S. *et al.* Effects of lansoprazole on the expression of VEGF and cellular proliferation in a rat model of acetic acid-induced gastric ulcer. *J. Gastroenterol.* **45**, 846–858 (2010).
151. Kakimoto, K. *et al.* Significance of Chymase-Dependent Matrix Metalloproteinase-9 Activation on Indomethacin-Induced Small Intestinal Damages in Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **332**, 684–689 (2010).
152. Res, P. Melatonin promotes angiogenesis during protection and healing of indomethacin-induced gastric ulcer: role of matrix. *J. Pineal Res.* **49**, 130–140 (2010).
153. Ganguly K. *et al.* Effects of melatonin on secreted and induced matrix metalloproteinase-9 and -2 activity during prevention of indomethacin-induced gastric ulcer. *J. Pineal Res.* **39**, 307–315 (2005).
154. Beppu, L. *et al.* MMPs-2 and -14 Are Elevated in Eosinophilic Esophagitis and Reduced Following Topical Corticosteroid Therapy. *Gastroenterology.* **61**, 194–199 (2015).
155. Herszenyi, L. *et al.* Alterations of glutathione S-transferase and matrix metalloproteinase-9 expressions are early events in esophageal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* **13**, 676–682 (2007).
156. Norte, C. Expresión de la metaloproteinasa-9 en pacientes con formas leves y graves de enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Cirugia Y Cirujanos.* **87**, 436–442 (2019).
157. Roy, R., Yang, J. & Moses, M. A. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5287–5297 (2009).
158. Biga, P. R. *et al.* Gelatinases impart susceptibility to high-fat diet-induced obesity in mice. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 1462–1468 (2013).

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito protetor do citral na doença do refluxo gastroesofágico em camundongos eutróficos e obesos", protocolada sob o CEUA nº 7707010620 (ID 000107), sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 26/06/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the protective effect of citral in gastroesophageal reflux disease in eutrophic and obese mice", utilizing 216 Isogenics mice (216 males), protocol number CEUA 7707010620 (ID 000107), under the responsibility of **Clélia Akiko Hiruma-Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University (IBB/UNESP) in the meeting of 06/26/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2020](#) a [03/2022](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [CPPA - IBTEC/UNESP](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 6 semanas](#)

N: [216](#)

Linhagem: [C57BL](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Local do experimento: Laboratório de ensaios biológicos com produtos naturais - Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (Setor Fisiologia) - Instituto de Biociências - UNESP Botucatu.

Botucatu, 02 de julho de 2020



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista



Prof. Dr. Bruno César Schimming
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual Paulista