

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado  
somente a partir de 24/08/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

**RIE OHARA**

**BOTUCATU – SP**

**2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

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

**RIE OHARA**

**ORIENTADORA: PROFA. ASSOC. CLÉLIA AKIKO HIRUMA-LIMA**

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

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

*Prof. Assoc. Clélia Akiko Hiruma-Lima*

**BOTUCATU – SP**

**2022**

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

Ohara, Rie.

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

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

Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima  
Coorientador: Lúcia Regina Machado da Rocha  
Capes: 21006008

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

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

## ***Agradecimentos***

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À CAPES pela bolsa concedida.

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

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

## ***Prólogo***

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

### **Trabalhos apresentados em eventos científicos**

#### **Apresentação oral**

##### **2021:**

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

#### **Apresentações em painel**

##### **2020:**

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

##### **2019:**

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

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

### **Participação em eventos científicos**

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

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

### **Participação em bancas avaliadoras**

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

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

### **Atividades de extensão universitária**

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

### **Atividades de ensino**

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

Fisiologia Humana – Enfermagem (24h)

Fisiologia Humana – Ciências Biológicas (16h)

Fisiologia Humana – Física médica (16h)

Fisiologia Humana – Nutrição (35h)

Iniciação Científica – Ciências Biomédicas (45h)

## Atividades de divulgação científica

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

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

## Artigos completos publicados em periódicos

**2021:**

- BUENO, G.; RICO, S. L. C.; PÉRICO, L. L.; **OHARA, RIE**; RODRIGUES, V. P.; EMÍLIO-SILVA, M. T.; ASSUNÇÃO, R.; ROCHA, L. R. M.; NUNES, D. S.; BESTEN, M. A.; HEIDEN, G.; CAMARGO, A. L. C.; JUSTULIN, L. A.; HIRUMA-LIMA, C. A. The essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC improves gastric ulcer healing in rats through modulation of VEGF and MMP-2 activity. *Journal of Ethnopharmacology*. JCR 2020: 4,36.

**2020:**

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

**2019:**

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

**2018:**

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

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

### **Cursos realizados**

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

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

**2019:** Docência no Ensino Superior: fundamentos, metodologias e práticas pedagógicas. Instituto de Educação e Pesquisa em Práticas Pedagógicas - IEP<sup>3</sup>, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (30h)

### **Disciplinas cursadas**

Tópicos em Biologia Geral e Aplicada (30h)

Empreendedorismo (60h)

O cientista e o professor universitário (30h)

Comunicação científica oral (45h)

International peer review process (30h)

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

Fisiopatologia da Obesidade e do Diabetes (60h)

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

## Lista de figuras

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

## Resumo

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

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

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

## **Abstract**

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

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

**Keywords:** gastric ulcer, citral, obesity, healing.

## Sumário

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

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

## ***Apresentação***

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

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

## ***Introdução***

### **Obesidade**

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

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

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

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

quadro de obesidade ou síndrome metabólica não apresentaram aumento de risco de desenvolvimento de úlceras pépticas <sup>8</sup>.

### Úlceras gástricas

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

As úlceras gástricas ocorrem devido a um desequilíbrio entre fatores protetores e agressores da mucosa gástrica, resultando em lesão nas camadas mucosa e muscular. Entre os fatores protetores estão a manutenção do muco e bicarbonato, prostaglandina E<sub>2</sub>, óxido nítrico e fluxo sanguíneo adequado. Já os fatores agressores podem ser classificados como endógenos: ácido clorídrico e pepsina; ou exógenos: uso crônico e indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), tabagismo, etilismo e infecção por *Helicobacter pylori* <sup>9,11</sup>.

A úlcera gástrica se forma quando há ruptura da camada mucosa do estômago. Para que isso ocorra, há uma série de fatores envolvidos: diminuição da produção de muco e bicarbonato, que pode ser causada por suprimento sanguíneo insuficiente, infecção por *Helicobacter pylori* ou uso excessivo de AINEs. Os AINEs inibem a síntese de Prostaglandina E<sub>2</sub>, que exerce papel fundamental na manutenção do muco. Com isso, a secreção ácida do estômago entra em contato com a muscular da mucosa, podendo causar perfuração do órgão em casos mais graves <sup>12,13</sup>.

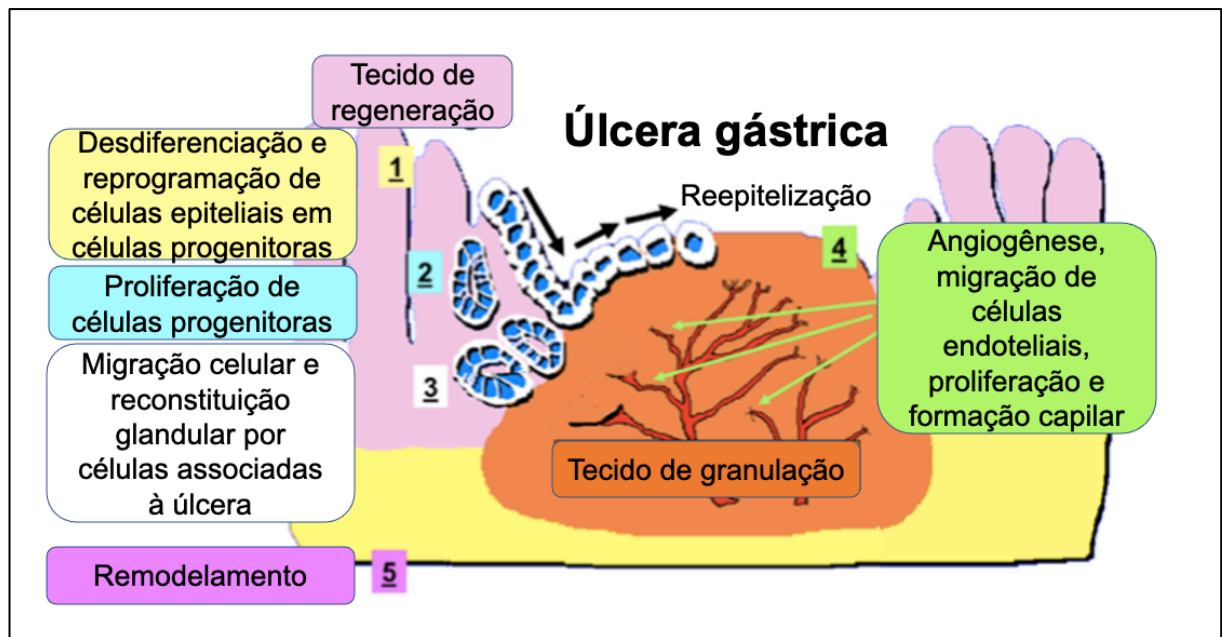
É possível classificar as lesões gástricas em duas partes: base e margem da úlcera. A base da úlcera é a região necrótica, onde predomina tecido conjuntivo de granulação, que contém fibroblastos, macrófagos e proliferação de células endoteliais. Já a margem da úlcera, que é denominado tecido de regeneração,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

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

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

### Cicatrização

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



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

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

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

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

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

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

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

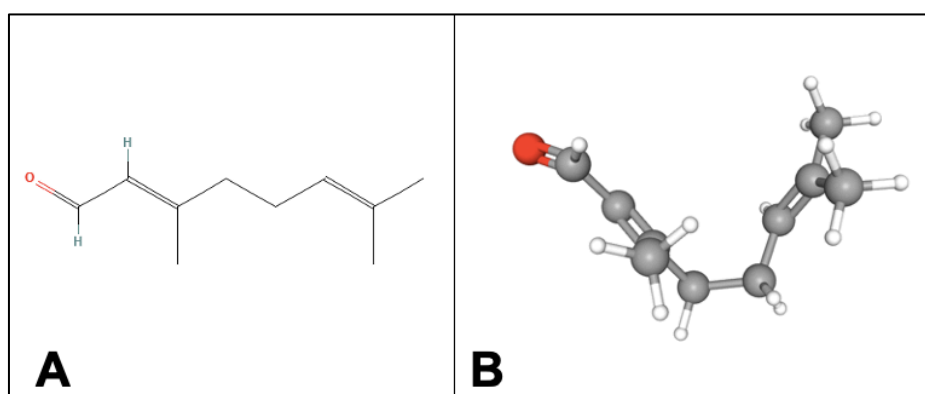
Nas úlceras gástricas, a degradação da mucosa gástrica se relaciona diretamente com a degradação da matriz extracelular. As MMP-9 são secretadas principalmente por neutrófilos e macrófagos e atuam na fase inicial da cicatrização. Em pacientes com úlcera gástrica, foi detectado aumento da produção de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

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

## Citral

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

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



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

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

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

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

### ***Conclusões finais***

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

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

### ***Referências bibliográficas***

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

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

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

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