

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/03/2023.



unesp

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 esteve disposto a me ajudar e por todas as tarde e noites que esteve 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 esteroidal |
| 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.

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. *YGAST* **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 Ver 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 Inflammatory 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 stereoisomers. *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 okamuræ 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. *Endroc.* **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. Orahá, 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 Medicinell.* **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. Klötting, 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 cytokines 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 chemoattractant 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 metaloproteínasa-9 en pacientes con formas leves y graves de enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Cirugía 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).