



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS  
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA DO TRATO GASTROINTESTINAL**



**EDVALDO BALBINO ALVES JÚNIOR**

**Avaliação da atividade gastroprotetora do estragol em modelos  
animais**

João Pessoa  
2019

**EDVALDO BALBINO ALVES JÚNIOR**

**Avaliação da atividade gastroprotetora do estragol em modelos  
animais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte do requisito para a obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr. Leônia Maria Batista**

João Pessoa  
2019

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A474a Alves Júnior, Edvaldo Balbino.

Avaliação da atividade gastroprotetora do estragol em modelos animais / Edvaldo Balbino Alves Júnior. - João Pessoa, 2019.

185 f. : il.

Orientação: Leônia Maria Batista.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Estragol. 2. úlceras gástricas. 3. gastroproteção. 4. antioxidante. 5. imunorregulatório. I. Batista, Leônia Maria. II. Título.

UFPB/BC

EDVALDO BALBINO ALVES JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO ESTRAGOL EM  
MODELOS ANIMAIS

APROVADA EM: 28/03/2019

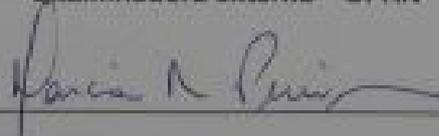
BANCA EXAMINADORA:



Profª Drª. Leônia Maria Batista  
Orientadora – UFPB



Profª Drª Caroline Addison Carvalho Xavier de Medeiros  
Examinadora externa – UFRN



Profª Drª Marcia Regina Piuvezam  
Examinadora interna – UFPB

Dedico este trabalho aos meus pais Judith e Edvaldo por todo o incentivo e apoio ao longo de minha caminhada, tornando possível a realização de mais um sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus** por ter me concedido o dom da vida e servir de refúgio nos meus momentos de incerteza. Obrigado por cada pessoa que passou em meu caminho e fez parte da minha formação, obrigado pelos obstáculos que surgiram em minha vida, me tornando cada vez mais forte.

**A minha família** pelo apoio e afeto. Vocês são a base e o meu estímulo diário para continuar. São os maiores incentivadores das minhas conquistas.

**A Prof. Leônia** pelo exemplo de profissional e orientadora. Sua dedicação, profissionalismo e ética são minhas maiores fontes de inspiração. Obrigado por todos os ensinamentos e amizade e em especial na formação deste trabalho estando disponível em todas as etapas, do planejamento, da realização dos experimentos e das análises.

**Aos alunos do Lab. de Farmacologia do TGI** composto pela doutoranda Elaine e aos alunos de iniciação científica: Michelle, Catarina, Leyle e Alessa. E aos que já passaram pelo LFTGI também: Marley, Monique, Jéssica, Shellygton e em especial a Rodrigo. Sem a ajuda de vocês nada disso seria possível. Agradeço também a todos aos colegas doutores Flávia Frota e Gedson Moraes que ajudaram na minha formação como pesquisador.

**Aos professores colaboradores** Aurigena Antunes, Gerlane Guerra, Raimundo de Araújo, Giciane Vieira e Adriano Alves pela disponibilidade e auxílio para o aprofundamento dos nossos resultados.

**Aos alunos colaboradores** Thamires, Thaís Freitas e Luiz Agra pelo auxílio na bancada. Em especial a Dra. Roseane Vasconcelos pela amizade, aprendizado e profissionalismo.

**Aos Professores do mestrado** pela contribuição para minha formação profissional.

**À banca examinadora** composta pelos professores Caroline de Medeiros e Márcia Piuvezam (membros titulares) e Liana Pordeus e Hemerson Magalhães (membros suplentes) por aceitarem o convite e por contribuir com a nossa pesquisa.

**À coordenação e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** pela atenção e cordialidade, em especial as secretárias Caroline Manguiera e Nilmar.

**À equipe da Unidade de Produção Animal do IPeFarM**, especialmente o bioterista Crispim Duarte e a veterinária Roberta Parentoni, pelo constante apoio e atenção.

**Aos amigos da pós-graduação** pela ajuda nas disciplinas do mestrado e pelos momentos de confraternização. Um agradecimento especial aos integrantes do bloco PGPNSB.

**Ao Sr. Josué** pela dedicação e competência no seu trabalho.

**Aos meus amigos/irmãos** que a vida me deu: Rodrigo, Luciano, Victor, Anderson Rodrigo, e em especial a Anderson Fellyp pela convivência diária, pelo apoio incondicional e pelo incentivo sempre em minha vida.

**A todos os meus amigos** pelo carinho e momentos de descontração.

**Ao Conselho Federal de Farmácia**, na figura do Dr. Samuel Meira.

**Aos órgãos de fomento** CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

**A UFPB** pelo apoio institucional.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a construção desse trabalho.

**Muito obrigado!**

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

**ALVES JÚNIOR, E.B. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO ESTRAGOL EM MODELOS ANIMAIS. 2019. 189 p. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, CCS/UFPB.**

## **RESUMO**

O estragol é um composto orgânico aromático pertencente à classe dos fenilpropanoides derivados de aldeídos cinâmicos presente em óleos essenciais de espécies vegetais, como *Ravensara anisata* (madeira), *Ocimum basilicum* (manjerição/alfavaca), e *Croton zehntneri* (canelinha). Estudos farmacológicos relatam sua atividade anti-inflamatória, antioxidante e vasorelaxante. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade não-clínica aguda, a atividade gastroprotetora e os mecanismos de ação relacionados. O ensaio foi considerado significativo quando  $*p < 0,05$ . No ensaio de toxicidade aguda, em que foram utilizadas as doses de 300 ou 2000 mg/kg do estragol (v.o.) não foram observados sinais de alterações comportamentais, exceto para dose de 2000 mg/kg com diminuição do consumo de água e ração. Desta forma, foi possível estimar que a dose letal 50% (DL50) é igual ou superior a 2500 mg/kg, de acordo com o guia 423 da OECD. Para a avaliação da atividade gastroprotetora foram utilizados os modelos de indução aguda de úlcera gástrica pelo etanol em ratos, anti-inflamatório não-esteroidal (AINE-piroxicam) e estresse (por imobilização e frio) em camundongos e contensão do suco gástrico em ratos. No modelo de indução da úlcera pelo etanol, a carbenoxolona (100 mg/kg) e o estragol (31,25; 62,5; 125 e 250 mg/kg – v.o) reduziram a área de lesão ulcerativa em 55, 25, 69, 74 e 95% ( $***p < 0,001$ ), respectivamente, quando comparada ao controle negativo. Além disso, a dose mais efetiva (250 mg/kg) restaurou os parâmetros histológicos avaliados. Nas úlceras gástricas induzidas pelo estresse (imobilização e frio) a cimetidina (100 mg/kg) e o estragol (31,25; 62,5; 125 e 250 mg/kg – v.o) reduziram o índice de lesão ulcerativo (ILU) em 42, 45, 53, 59 e 65% ( $*p < 0,01$ ) e ( $***p < 0,001$ ), respectivamente, quando comparada ao controle negativo. Nas úlceras gástricas induzidas por AINEs, a cimetidina (100 mg/kg) e o estragol (31,25; 62,5; 125 e 250 mg/kg – v.o) reduziram o ILU em 59, 46, 47, 56 e 64% ( $***p < 0,001$ ), respectivamente quando comparado ao grupo controle negativo. Em úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico (ligadura do piloro) a cimetidina (100 mg/kg) e o estragol (250 mg/kg) reduziram o ILU em 42 e 52 % (v.o) ( $***p < 0,001$ ) e em 42 e 43 % (i.d) ( $####p < 0,001$ ), respectivamente. Na perspectiva de investigar os mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do estragol foram avaliados os mecanismos antissecretórios ou neutralizantes da secreção gástrica, citoprotetores, antioxidante e imunorregulatório. O tratamento i.d com estragol (250 mg/kg) diminuiu o volume do suco gástrico. A atividade gastroprotetora do estragol (250 mg/kg) envolve a participação de grupamentos sulfidrilas, óxido nítrico, muco e prostaglandinas. Aumentou os níveis de glutathione reduzida (GSH) e glutathione peroxidase (GPx) e reduziu os níveis de malondialdeído (MDA) e mieloperoxidase. Reduziu os níveis de interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e da expressão de sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), além de aumentar os níveis de interleucina-10 (IL-10) e de ciclooxigenase 2 (COX-2). Assim é possível inferir que o estragol apresenta atividade gastroprotetora relacionada a mecanismos antissecretório, citoprotetores, antioxidantes e imunomoduladores.

**Palavras-chave:** Estragol, úlceras gástricas, gastroproteção, antissecretório, citoproteção, antioxidante, imunorregulatório.

**ALVES JÚNIOR, E.B. EVALUATION OF ESTRAGOLE GASTROPROTECTIVE ACTIVITY IN ANIMAL MODELS. 2019. 189p. Master's thesis. Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, CCS/UEPB.**

**ABSTRACT**

Estragole is an aromatic organic compound belonging to the class of phenylpropanoids derived from cinnamic aldehydes present in essential oils of plant species such as *Ravensara anisata* (madeira), *Ocimum basilicum* (manjeriç o/alfavaca) and *Croton zehntneri* (canelinha). Pharmacological studies report its anti-inflammatory, antioxidant and vasorelaxant activity. This study aimed to evaluate acute non-clinical toxicity, gastroprotective activity and related mechanisms of action. The assay was considered significant when  $p < 0.05$ . In the acute toxicity test, doses of 300 or 2000 mg/kg of estragole administered orally did not observed, except for a dose of 2000 mg/kg with a decrease in water consumption and feed. In this way, it was possible to estimate that the 50% lethal dose (LD50) is equal to or greater than 2500 mg/kg, according to OECD guide 423. For the evaluation of gastroprotective activity, the models of acute gastric ulcer induction by ethanol in rats, non-steroidal anti-inflammatory (NSAID-piroxicam) and stress (cold restraint) in mice and gastric juice contention in rats were used. In the ethanol model, carbenoxolone (100 mg/kg) and estragol (31.25, 62.5, 125 and 250 mg/kg - vo) reduced the area of ulcerative lesion in 55, 25, 69, 74, 95% (\*\* $p < 0.001$ ), respectively, when compared to the negative control. In addition, the most effective dose (250 mg/kg) improved the histological parameters evaluated. In stress - induced gastric ulcers (cold restraint), cimetidine (100 mg/kg) and estragol (31.25, 62.5, 125 and 250 mg/kg - vo) reduced the ulcerative lesion index (ULI) in 42, 45, 53, 59, 65% (\*\* $p < 0.01$ ) and (\*\* $p < 0.001$ ), respectively, when compared to the negative control. In gastric ulcers induced by NSAIDs, cimetidine (100 mg/kg) and estragol (31.25, 62.5, 125 and 250 mg/kg - vo) reduced ULI by 59, 46, 47, 56 and 64% (\*\* $p < 0.001$ ), respectively when compared to the negative control group. Cimetidine (100 mg/kg) and estragol (250 mg/kg) reduced the ILU by 42 and 52% (v.o) (\*\* $p < 0.001$ ) in gastric ulcer induced by pylorus ligation and in 42 and 43% (i.d) (### $p < 0.001$ ), respectively. In order to investigate the mechanisms involved in the gastroprotective activity of estragole, the antisecretory or neutralizing of gastric secretion, cytoprotection, antioxidant and immunoregulatory mechanisms were evaluated. Pylorus ligation (i.d) treatment with estragol (250 mg/kg) decreased the volume of the gastric juice. The gastroprotective activity of estragol (250 mg/kg) involves the participation of sulfhydryl groups, nitric oxide, mucus and prostaglandins. It increased levels of reduced glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx) and reduced levels of malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase. It reduced the levels of interleucin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression, and increased levels of interleucin-10 (IL-10) and cyclooxygenase 2 (COX-2). Thus, it is possible to infer that estragole has gastroprotective activity related to antisecretory mechanisms, cytoprotectors, antioxidants and immunomodulators.

**Key words:** Estragole, gastric ulcers, gastroprotection, antisecretory, cytoprotection, antioxidant, immunoregulatory.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação anatômica do TGI humano .....	26
Figura 2. Representação anatômica e histológica do estômago .....	28
Figura 3. Representação do Epitélio Gástrico .....	29
Figura 4: Mecanismos de secreção ácida gástrica .....	36
Figura 5. Mecanismos de proteção da mucosa gástrica .....	39
Figura 6: Representação do sistema de defesa antioxidante celular .....	51
Figura 7. Representação de regiões anatômicas do trato gastrointestinal acometidas pelas úlceras pépticas .....	60
Figura 8. Vias de sinalização da secreção ácida gástrica e seus respectivos alvos farmacológicos .....	63
Figura 9. Estrutura química do estragol .....	69
Figura 10. Vias de metabolização do estragol .....	70
Figura 11: Animais utilizados nos modelos experimentais .....	75
Figura 12. Fluxograma experimental desenvolvido no presente estudo com o estragol .....	77
Figura 13. Fluxograma para determinação da DL50 .....	79
Figura 14. Lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40 (A) e estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (B) para determinação do ALU .....	80
Figura 15. Estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (A e B) e quantificação da área de lesão ulcerativa (B) com AVSoft Bioview Spectra 4.0® .....	81
Figura 16. Estimativa da DL50 do estragol de acordo com o guia 423 da OECD ...	93
Figura 17. Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de ratos Wistar pré-tratados (v.o.) com tween 80 5% (A); carbenoxolona 100 mg/kg (B); estragol 31,25 mg/kg (C), 62,5 mg/kg (D), 125 mg/kg (E) e 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol .....	95

Figura 18: Fotomicrografias coradas com HE a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	97
Figura 19: Fotomicrografias coradas com PAS a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	98
Figura 20: Fotomicrografias coradas com ATO a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	99
Figura 21: Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), estragol 250mg/kg (C) ou pré-tratados com NEM e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e estragol 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas .....	104
Figura 22: Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), estragol 250mg/kg (C) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e estragol 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação do óxido nítrico .....	105
Figura 23: Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), diazóxido mg/kg (B), estragol 250mg/kg (C) ou pré-tratados com glibenclamida e tratados com Tween 80 5%, diazóxido 3mg/kg (E) e estragol 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis a ATP .....	106
Figura 24: Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), misoprostol 50µg/kg (B), estragol 250mg/kg (C) ou pré-tratados com indometacina e tratados com Tween 80 5% (D), Misoprostol 50µg/kg (E) e estragol 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação das prostaglandinas .....	109
Figura 25. Fotomicrografias com marcação imunohistoquímica para glutationala peroxidase (GPx; →) em amostras de estômago de ratos submetidos ao etanol. A-Normal; B- Tween 80 5% (10 mL/kg); C- Carbenoxolona (100 mg/kg); D- Estragol (250 mg/kg). Escala: 50 µm. 400x .....	117
Figura 26. Fotomicrografias com marcação imunohistoquímica para sintase do óxido nítrico induzida (iNOS; →) em amostras de estômago de ratos submetidos ao etanol. A-Normal; B- Tween 80 5% (10 mL/kg); C- Carbenoxolona (100 mg/kg); D- Estragol (250 mg/kg). Escala: 50 µm. 400x .....	118
Figura 27. Fotomicrografias com marcação imunohistoquímica para ciclooxigenase 2 (COX-2; →) em amostras de estômago de ratos submetidos ao etanol. A-Normal; B-	

Tween 80 5% (10 mL/kg); C- Carbenoxolona (100 mg/kg); D- Estragol (250 mg/kg).  
Escala: 50  $\mu$ m. 400x ..... 11

Figura 28: Representação esquemática das atividades farmacológicas encontradas  
para o estragol em modelos animais com ratos ou camundongos ..... 150

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol em úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos .....	95
Gráfico 2: Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol após pré-tratamento com salina e NEM (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos ..	103
Gráfico 3: Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol após pré-tratamento com salina e L-NAME (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos .....	105
Gráfico 4: Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol após pré-tratamento com salina e Glibenclamida (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos .....	106
Gráfico 5. Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol na concentração de muco aderido à mucosa gástrica após ligadura do piloro .....	108
Gráfico 6: Efeito da administração oral de misoprostol e estragol após pré-tratamento com salina e Indometacina em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos .....	109
Gráfico 7: Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol nos níveis de GSH a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	110
Gráfico 8. Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol nos níveis de MDA a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	111
Gráfico 9. Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol nos níveis de MPO a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	112
Gráfico 10. Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol nos níveis de IL-1 $\beta$ (A), TNF- $\alpha$ (B) e IL-10 (C) a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos .....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da administração oral do estragol na evolução ponderal, índice de órgãos, consumo de água e ração em camundongos Swiss machos .....	94
Tabela 2: Efeito da administração oral da cimetidina e estragol em úlceras gástricas induzidas pelo estresse (Imobilização e frio) em camundongos swiss machos ....	100
Tabela 3: Efeito da administração oral da cimetidina e estragol em úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não esteroidal (Piroxicam) .....	100
Tabela 4: Efeito da administração oral e intraduodenal da cimetidina e estragol, em úlceras gástricas induzidas por ligadura do piloro em ratos .....	101
Tabela 5: Efeito da administração oral e intraduodenal da cimetidina e estragol nos parâmetros do conteúdo gástrico após ligadura do piloro .....	102
Tabela 6. Efeito da administração oral do estragol sobre a imunomarcção com glutathione peroxidase (GPx), sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) e ciclooxigenase 2 (COX-2) em amostras de estômago de ratos .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
AC	Ciclase de adenilil
ACh	Acetilcolina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALU	Área de lesão ulcerativa
AMPC	3',5'- monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância de uma via
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CaMKII	Proteína quinase II dependente de Ca <sup>2+</sup> /calmodulina
CAT	Catalase
Ca <sub>v</sub>	Canais de cálcio controlado por voltagem
CCK2	Receptores de colecistocinina do tipo 2
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
CSPP-28	Fosfoproteína sensível a Ca <sup>2+</sup> de 28 kDa
DAG	Diacilglicerol
DCA	Ácido desoxicólico hidrofóbico
DL50	Dose letal 50
d.p	Desvio padrão da média
ECL	Células semelhantes às enterocromafins
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	NOS endotelial
EP <sub>2</sub>	Receptor de prostaglandina da série 2
e.p.m	erro padrão da média
ER	Retículo endoplasmático
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCs	Ciclase de guanilil solúvel
GDP	Difosfato de guanosina

GLP-1	Peptídeo tipo 1 semelhante ao glucagon
GMP	monofosfato de guanosina
GMP <sub>c</sub>	monofosfato cíclico de guanosina
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GTP	Trifosfato de guanosina
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	Bomba de prótons
H <sub>2</sub>	Receptor de histamina tipo 2
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
HBD	β-defensinas humanas
HCL	Ácido clorídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Íon bicarbonato
HE	Hematoxilina e eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HO <sub>2</sub>	Radical hidroperóxido
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HPA	Eixo Hipotalâmico-pituitário-adrenal
HSP	Proteínas de choque térmico
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
ILU	Índice de lesão ulcerativa
i.p.	Intraperitoneal
IFNγ	Interferon-γ
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
IP <sub>3</sub>	1-4-5 trisfosfato de Inositol
K <sup>+</sup>	Íon potássio
K <sub>ATP</sub>	Canais de potássio sensível a ATP
LL-37	Catelicidina humana
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster

LPO	Peroxidação lipídica
M <sub>3</sub>	Receptor muscarínico tipo 3
MDA	Malondialdeido
MPO	Mieloperoxidase
MUC	Mucina
NEM	N-etilmaleimida
NFκB	Fator nuclear κB
nNOS	NOS neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
NOX	NADPH oxidases
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PG	Prostaglandina
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina da série D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina da série E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina da série E <sub>1</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina da série F <sub>2α</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos
PIP <sub>2</sub>	4-5 bifosfato de fosfatidil inositol
PKA	Proteína cinase I dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase dependente de Cálcio
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PLA	Fosfolipases
PLC-β1	Fosfolipase C do tipo β1
RNA	Ácido ribonucleico
-SH	Grupamentos sulfidrilas
SH3	Resíduos de serina 3
SNA	Sistema nervoso autônomo

SNAREs	Receptores proteicos solúveis de ligação sensível ao fator N-etilmaleimida
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema nervoso entérico
SOD	Superóxido dismutase
SStR <sub>2</sub>	Receptor de somatostatina tipo 2
STAT	Fatores de transcrição ativados por tirosinas quinases
TFF	Fator trefoil
TGF- $\beta$	Receptor serina-quinase do fator de crescimento transformante $\beta$
TGI	Trato gastrointestinal
TLRs	Receptores Toll-like
TNF $\alpha$	fator de necrose tumoral- $\alpha$
TVs	Tubulovesículas
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
v.o.	Via oral
VAMP2	Proteína associada a vesícula 2
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo

**Obs:** As abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

# SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO .....	23
1.1 Considerações gerais .....	23
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO .....	26
2.1 Anatomofisiologia do trato gastrintestinal .....	26
2.2 Fisiologia gastrointestinal .....	30
2.2.1 Secreção gástrica .....	30
2.2.2 Mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal .....	37
2.2.2.1 Defesa pré-epitelial .....	38
2.2.2.2 Defesa epitelial .....	41
2.2.2.3 Defesa pós-epitelial .....	43
2.2.2.3.1 Fluxo sanguíneo mucoso .....	43
2.2.2.3.2 Inervação sensorial da mucosa .....	44
2.2.2.3.3 Reconstituição do epitélio gástrico .....	45
2.2.2.3.4 Fatores moduladores da barreira gástrica .....	45
2.2.2.3.4.1 Óxido nítrico .....	45
2.2.2.3.4.2 Canais para íons potássio sensíveis ao ATP (KATP) .....	47
2.2.2.3.4.3 Prostaglandinas .....	48
2.2.2.3.4.4 Sistemas antioxidantes .....	49
2.2.2.3.4.5 Grupamentos sulfidrilas .....	51
2.2.2.3.4.6 Citocinas .....	52
2.2.2.3.5 Fatores agressores da mucosa gástrica .....	54
2.2.2.3.5.1 Etanol .....	54
2.2.2.3.5.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) .....	55
2.2.2.3.5.3 Estresse e tabagismo .....	57
2.2.2.3.5.4 Helicobacter pylori .....	58

2.3 Úlceras pépticas .....	59
2.4 Epidemiologia das úlceras pépticas .....	61
2.5 Terapêutica das úlceras pépticas .....	62
2.6 Produtos naturais .....	67
2.7 Estragol .....	68
3.0 OBJETIVOS .....	72
3.1 Objetivo geral .....	72
3.2 Objetivos específicos.....	72
4.0 MATERIAL E MÉTODOS .....	74
4.1 Material.....	74
4.1.1 Local da pesquisa.....	74
4.1.2 Substância teste .....	74
4.1.3 Animais.....	74
4.1.4 Drogas utilizadas.....	76
4.2 Métodos.....	77
4.2.1 Ensaio toxicológico não clínico agudo de estragol (OECD, 2001) .....	78
4.2.2 Investigação da atividade gastroprotetora .....	79
4.2.2.1 Modelos de indução aguda de úlcera gástrica .....	81
4.2.2.1.1 Indução de úlceras por etanol absoluto.....	81
4.2.2.1.2 Análise histológica.....	82
4.2.2.1.4 Indução de úlceras por estresse (Imobilização e frio) .....	82
4.2.2.1.5 Indução de úlceras por Anti-inflamatório não esteroideal (Piroxicam).....	83
4.2.2.1.6 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico (Ligadura do piloro) .....	83
4.2.3 Investigação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do estragol .....	84
4.2.3.1 Mecanismo antissecretório ou neutralizante .....	84
4.2.3.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (v.o/i.d).....	84
4.2.3.2 Mecanismos citoprotetores.....	85
4.2.3.2.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (SHs) na gastroproteção .....	85
4.2.3.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção .....	85

4.2.3.2.3 Avaliação da participação dos canais para íons potássio sensíveis ao ATP (KATP) na gastroproteção.....	86
4.2.3.2.4 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica.....	86
4.2.3.2.5 Avaliação da participação das prostaglandinas na gastroproteção.....	87
4.2.3.3 Atividade antioxidante.....	88
4.2.3.3.1 Determinação dos níveis de grupamento sulfidrílico não proteico (GSH)	88
4.2.3.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA).....	88
4.2.3.3.3 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO).....	89
4.2.3.4 Mecanismo imunorregulatório.....	89
4.2.3.4.1 Determinação das interleucinas.....	89
4.2.3.5 Análise imunohistoquímica dos estômagos submetidos ao modelo de úlceras induzidas por etanol.....	90
4.3 Análises estatísticas.....	91
5.0 RESULTADOS.....	93
5.1 Ensaio toxicológico pré-clínico aguda do estragol.....	93
5.2.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol.....	94
5.2.2 Análise histológica.....	96
5.2.2.1 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE).....	96
5.2.2.2 Coloração PAS.....	97
5.2.2.3 Coloração Azul de Toluidina (ATO).....	98
5.2.3 Úlceras gástricas induzidas pelo estresse (Imobilização e frio).....	99
5.2.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatórios não esteroidais.....	100
5.2.5 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico.....	101
5.3 Investigações dos mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do estragol.....	101
5.3.1 Mecanismo antissecretório ou neutralizante.....	101
5.3.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após contensão do suco gástrico (Ligadura do piloro).....	101
5.3.2 Mecanismos citoprotetores.....	102
5.3.2.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílica (SH) na atividade gastroprotetora do estragol.....	102
5.3.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do estragol.....	104

5.3.2.3 Avaliação da participação dos canais para íons potássio sensíveis ao ATP (KATP) na atividade gastroprotetora do estragol .....	106
5.3.2.4 Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica .....	107
5.3.2.5 Avaliação da participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do estragol.....	108
5.3.3 Atividade antioxidante .....	110
5.3.3.1 Determinação dos níveis de grupamentos sulfídricos não proteicos (GSH) .....	110
5.3.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA).....	111
5.3.3.2 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO).....	111
5.3.4 Investigação da atividade imunorregulatória .....	112
5.3.4.1 Quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 teciduais .....	112
5.3.5 Análise imunohistoquímica dos estômagos submetidos ao modelo de úlceras por etanol.....	115
6.0 DISCUSSÃO .....	121
7.0 CONCLUSÃO.....	149
8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	152
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	154
10.0 ANEXOS .....	187

# INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações gerais

O uso de produtos naturais no tratamento de doenças tem sido utilizado pelo homem ao longo da história em suas práticas terapêuticas (SHEN, 2015). Dessa forma têm-se tornado alvos de pesquisas por parte da indústria farmacêutica, na perspectiva de caracterizar compostos isolados com atividade farmacológica e de elucidar possíveis mecanismos de ação (SHEN, 2015; AHN, 2017).

Esses produtos correspondem às substâncias químicas de origem animal, mineral, vegetal e microrganismos. Dentre as principais fontes de produtos naturais tem se destacado as plantas medicinais, as quais são compostas por diversos metabólitos secundários, que são responsáveis pela atividade biológica (LANAS; CHAN, 2017). Esses compostos bioativos presentes nas plantas podem atuar de maneira isolada ou sinérgica, porém se faz necessário o desenvolvimento e investimento em pesquisas para elucidar quais os principais protagonistas dos efeitos farmacológicos (SÁ et al., 2014; GUO, 2017).

Os produtos naturais são utilizados de modo disseminado para o tratamento de diversas doenças, sejam de caráter agudo ou crônico (PETRYSZYN; WITCZAK, 2016). Dentre as principais afecções estão as do trato gastrointestinal (TGI), como dispepsias, úlceras pépticas, diarreia e doenças inflamatórias intestinais, grande parte como forma de superar limitações da terapêutica existente e garantir maior facilidade de acesso a essa terapia alternativa (PETRYSZYN; WITCZAK, 2016; LANAS; CHAN, 2017).

As úlceras pépticas compreendem um conjunto heterogêneo de distúrbios caracterizados pela presença de inflamação e ulceração da mucosa, de origem multifatorial e complexa (WOODS; CAREY, 2017). A gravidade da úlcera péptica depende da camada que ocorreu a lesão, podendo acometer desde a camada da mucosa, mais superficial, até camadas tissulares mais profundas, como camada epitelial e muscular da mucosa, com comprometimento da funcionalidade e integridade das células lesionadas (LANAS, CHAN, 2017; ELSHAZLY et al., 2018).

Alguns fatores limitantes na terapia das úlceras pépticas, a exemplo de alta taxa de recidiva da doença, efeitos colaterais e alto custo (tratamento e internações)

fazem com que novas alternativas terapêuticas sejam buscadas na perspectiva de combater esta afecção (BOEING et al., 2016).

Nestas perspectivas, o presente trabalho teve como objetivo investigar a capacidade gastroprotetora do estragol, uma substância pertencente a classe dos fenilpropanoides, obtido em escala de síntese, porém encontrado na natureza nas espécies *Ravensara anisata*, *Ocimum basilicum* e *Croton zehntner* (SILVA-ALVES et al., 2013).

Os dados descritos na literatura mostram que essa substância apresenta atividade anti-inflamatória (PONTE et al, 2012), antioxidante e antimicrobiana (FRIEDMAN et al., 2002; MORAIS et al., 2006), relaxante muscular (COELHO-SE-SOUZA et al, 1997; SOARES et al, 2007), entretanto, não existe estudos sobre sua atividade gastroprotetora, o que motivou a escolha dessa substância para o desenvolvimento desse estudo, almejando o papel científico para uma possível nova terapêutica de prevenção, tratamento e cura dessa afecção.

REFERENCIAL

TEÓRICO

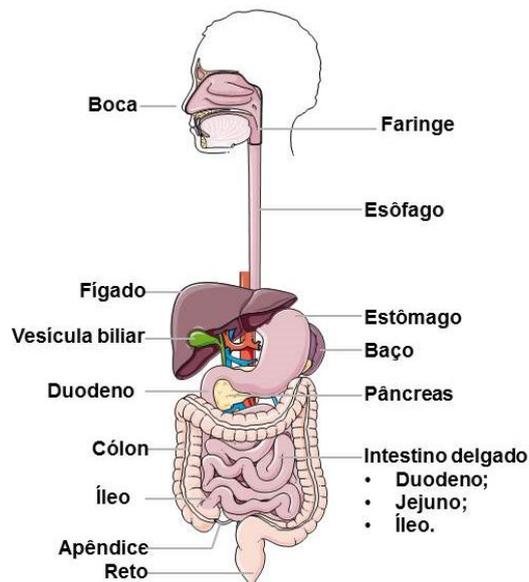
## 2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2.1 Anatomofisiologia do trato gastrintestinal

O Trato gastrointestinal (TGI) compreende um tubo muscular longo e oco com aproximadamente 6 metros de comprimento e de diâmetro variável nas suas diferentes secções, sendo revestido por um epitélio especializado que inicia na boca e se estende até o ânus, com diferentes compartimentos. O TGI se divide anatomicamente em esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon, ceco e reto). É em sua maioria composto camadas musculares (músculo liso), vasos sanguíneos, tecido linfóide e conectivo e glândulas anexas (Figura 1) (CAMPBELL, 2015; ASHFORD, 2017).

As principais funções do TGI compreende a motilidade, absorção, secreção, digestão e função de barreira intestinal as quais ocorrem de maneira ordenada e autônoma devido a presença do sistema entérico que, por meio de nervos aferentes extrínsecos e intrínsecos regula as respostas fisiológicas e mantém a homeostase ativando respostas locais (BROOKES, et al., 2013; BOECKXSTAENS, et al., 2016).

**Figura 1.** Representação anatômica do TGI humano



Fonte: Adaptado de Digestive system, 2017.

O TGI consiste em um tubo muscular oco a partir da cavidade oral, continuando pela faringe, esôfago, estômago e intestinos até o reto e ânus. Existem vários órgãos acessórios que auxiliam o trato secretando enzimas para ajudar a decompor os alimentos em seus nutrientes componentes.

Os vasos sanguíneos e as glândulas possuem controle hormonal e neuronal, sendo o controle neuronal exercido pelo plexo mioentérico localizado entre a camada longitudinal e circular média e pelo plexo submucoso localizado na camada muscular circular. Ambos os plexos são conectados e inervados por fibras parassimpáticas pré-ganglionares do nervo vago (em grande parte colinérgica e excitatória) e fibras simpáticas pós-ganglionares (que inervam fibras musculares, vasos sanguíneos e diretamente os plexos, promovendo inibição da acetilcolina) (RANG; DALE, 2016; BOECKXSTAENS, et al., 2016; WILSON; STEVENSON, 2019).

No TGI, o estômago destaca-se por armazenar temporariamente o alimento ingerido que segue para o duodeno onde será digerido em partículas menores e homogêneas por meio da ação de enzimas digestórias e do ácido clorídrico (HCl), aumentando a superfície de contato e melhorando a absorção dos nutrientes pela mucosa gástrica. Além dessas funções, o estômago também protege o intestino de agentes nocivos que possam estar presentes junto com os alimentos (MAHADEVAN, 2017; ASHFORD, 2017).

O estômago pode ser dividido tanto anatomicamente em 5 regiões: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro; já funcionalmente, o estômago é dividido em proximal e distal (MCDONALD; MACFARLANE, 2018; WILSON; STEVENSON, 2019).

O corpo do estômago se curva em sua porção inferior e se estende de forma expansível (funcionando como um reservatório). É formado por duas bordas, uma borda de menor curvatura a direita e uma borda de maior curvatura a esquerda. Em seu revestimento interno encontram-se as células parietais responsáveis pela secreção do ácido clorídrico (HCl) (MAHADEVAN, 2017; WILSON; STEVENSON, 2019).

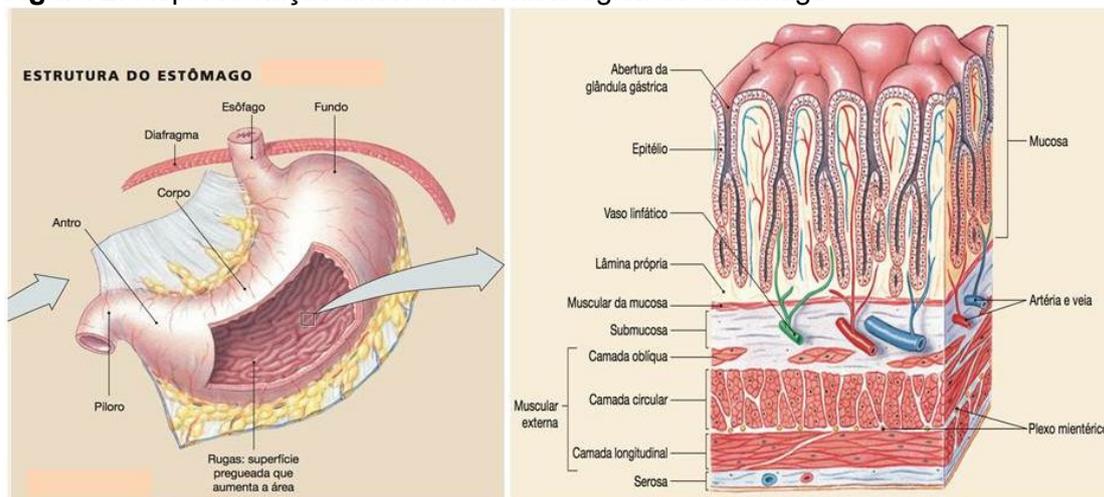
A região proximal (parte não glandular) compreende a cárdia, o fundo e cerca de um terço do corpo, é revestido por epitélio escamoso estratificado e corresponde a cerca de 60% do volume total do estômago, sendo responsável pelo armazenamento, enquanto que a região distal (parte glandular), que abrange o restante do corpo, o antro e o piloro, contém maior camada de células musculares e é responsável pela mistura dos alimentos e sua propulsão para o duodeno (ASHFORD, 2017; MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

Diariamente, o estômago secreta entre 1 e 3 litros de suco gástrico que é composto em sua maioria por ácido clorídrico (com pH próximo à 1), pepsina, fator

intrínseco (principal responsável pela absorção de vitamina B12) e muco. O baixo pH estomacal além de promoverem ambiente favorável para a ativação de enzimas digestivas também protege contra ação de microrganismos presentes nos alimentos ingeridos, inviabilizando sua instalação e infecção (JOHNSON, 2013; MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

Histologicamente o estômago e os demais órgãos que compõem o TGI compartilham de camadas em comum, sendo descritas do lúmen gástrico para o interior como: camada mucosa (composta por três camadas celulares, a mucosa muscular, a lâmina própria constituída por tecido conectivo e o epitélio), camada submucosa (composta por tecido conectivo, contendo tecidos secretórios vastamente irrigados por vasos sanguíneos e linfáticos, e plexo submucoso, integrado de células nervosas, sendo parte do sistema nervoso entérico), camada muscular (constituído por três camadas de tecido muscular liso, uma camada mais externa disposta na posição longitudinal e duas camadas mais internas orientadas de maneira circular, cuja força de contração é capaz de triturar os alimentos) e camada serosa (camada mais externa composta de tecido conectivo e se estende continuamente com o peritônio) (Figura 2) (ASHFORD, 2017).

**Figura 2.** Representação anatômica e histológica do estômago



Fonte: SILVERTHORN, 2010; RIBEIRO 2017.

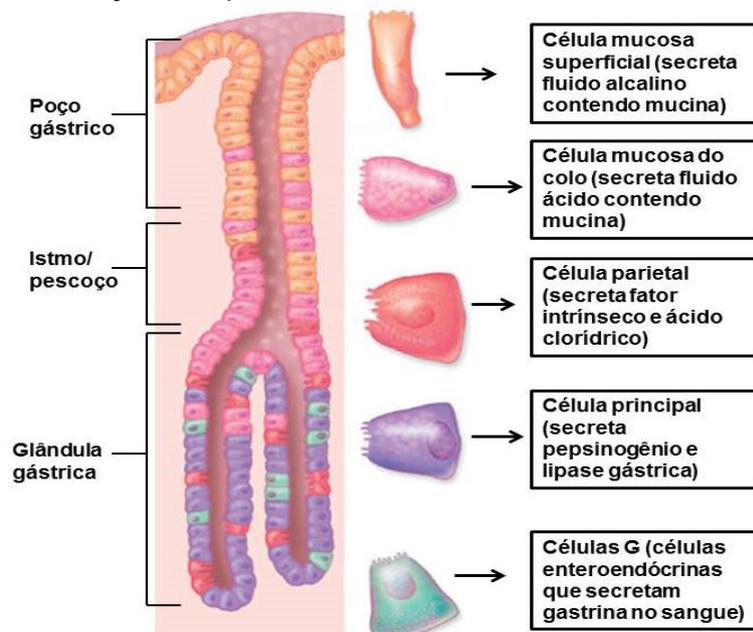
O estômago é uniformemente revestido por um epitélio mucoso colunar simples, composto por uma variedade de glândulas tubulares ramificadas, dispostas em cavidades ao longo da camada de muco, formando a fovéola gástrica. Cada

glândula tubular tem regiões distintas, seguindo a ordem do lúmen para o interior: o poço gástrico, o istmo, o pescoço e a base (WILSON; STEVENSON, 2019).

Em repouso, seu revestimento possui pregas espessas e aveludadas denominadas rugas, em seu interior encontram-se as bolsas gástricas (invaginações microscópicas) que conectam em quatro ou cinco glândulas gástricas (oxínticas e pilóricas). As glândulas oxínticas representam cerca de 75% da totalidade de glândulas e distribuem-se pela parte superior do estômago, enquanto que os 25% restantes correspondem às glândulas pilóricas dispostas na região do antro e piloro (ZOLOTAREV, 2014; FEHER, 2017).

O epitélio gástrico na região do fundo e do corpo invagina-se e forma glândulas na parede gástrica com diversas células especializadas, como: célula mucosa superficial (secreta fluido de caráter alcalino contendo mucina, muco e bicarbonato, conhecidas como células caliciformes), célula mucosa do colo (secreta fluido ácido contendo mucina), célula parietal (produz e secreta ácido clorídrico e fator intrínseco (células parietais), célula principal (secreta pepsinogênio e lipase gástrica) e células G (secretam gastrina na corrente sanguínea) (Figura 3) (BERRIDGE, 2014; FEHER, 2017).

**Figura 3.** Representação do Epitélio Gástrico



Fonte: Adaptado de WILSON; STEVENSON, 2019.

A mucosa gástrica é exposta constantemente a vários agentes agressores e substâncias nocivas como: consumo excessivo de etanol e cigarro, uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*, espécies reativas de oxigênio e secreção ácida gástrica (BOEING et al., 2016), porém os agentes protetores impedem sua deterioração e mantêm a integridade constitucional da mucosa, a exemplo do fluxo sanguíneo (minimização dos efeitos do ácido no lúmen gástrico), prostaglandinas (melhora fluxo sanguíneo na camada da mucosa e reduz secreção local de ácido gástrico), óxido nítrico (NO), produção de muco (barreira física) e bicarbonato (neutralização do ácido e formação de uma camada alcalina), fatores de crescimento e neuropeptídeos (bombesina, aumenta produção de prostaglandinas) (MILLER, 1983; LAINE et al., 2008; WILSON; STEVENSON, 2019).

## **2.2 Fisiologia gastrointestinal**

### **2.2.1 Secreção gástrica**

É uma solução isotônica de 150 mmol/L com pH abaixo de 1 e composta majoritariamente pelo ácido clorídrico (HCl), pepsina, íons e pelo fator antianêmico intrínseco (glicoproteína responsável pela absorção da vitamina B12, ferro e cálcio), sendo secretada pelas células parietais, com secreção basal de aproximadamente 2,5 litros/dia na concentração de 0,16 M (BROWNLEE, 2014).

Por ser um sistema que entra em contato diretamente com o meio externo do organismo, o TGI é uma porta de entrada para microrganismos que podem causar algum tipo de infecção. A produção de ácido clorídrico (HCl) impossibilita a instalação de microrganismos infecciosos oriundos da alimentação (HOWELL et al., 2010; LOMBARDO, et al., 2010), ao mesmo tempo que o baixo pH viabiliza a ativação de enzimas importantes na digestão, principalmente de proteínas, e promove desnaturação das proteínas alimentares, facilitando seu desdobramento e exposição do sítio de clivagem pelas proteases (WALLACE; SHARKEY, 2012; BROWNLEE, 2014; RANG; DALE, 2016. RENÉ et al., 2016. SCHUBERT, 2016).

O fator intrínseco é produzido de maneira essencial no estômago e serve como cofator de ligação da vitamina B12, sendo necessário para sua absorção no íleo terminal. Na região do antro não há células parietais, entretanto, possui células G

responsáveis pela excreção da gastrina, um dos reguladores da secreção ácida (ZOLOTAREV, 2014; BERRIDGE, 2014; BROWNLEE, 2014; FEHER, 2017).

Localizadas no pescoço das glândulas gástricas, as células parietais (oxínticas) secretam fator intrínseco e HCl no lúmen gástrico, sendo morfológicamente arredondadas, possuem núcleo esférico e citoplasma eosinofílico, uma vez que para ativar a  $H^+/K^+$ -ATPase (bomba de prótons), se faz necessário uma grande densidade mitocondrial (corresponde a cerca de 35% do volume celular total) (OKAMOTO et al., 2018; WILSON; STEVENSON, 2019).

As células parietais, responsáveis pela secreção ácida gástrica, contêm em seu interior organelas tubulares e vesiculares, as tubulovesículas (TVs), onde se localizam as  $H^+/K^+$ -ATPases (responsáveis pelo bombeamento de íons  $H^+$ ) (OKAMOTO et al., 2018). Com a estimulação dessas células pelos secretagogos (transmissores gástricos), são percebidas algumas alterações em sua morfologia, como a remodelação da membrana pelos receptores proteicos de ligação à proteína de fusão sensível ao N-etilmaleimida (SNAREs) e reestruturação do citoesqueleto dependente de actina (WHITMAN; O'NEIL, 2018), além de sinaptobrevina (proteína associada a vesícula 2-VAMP2) e syntaxina (BERRIDGE, 2014). Em seguida as TVs são translocadas para se fundirem com canalículos orientados na membrana apical, resultando em uma superfície invaginada com grande capacidade secretora conectada ao lúmen do estômago (SAHOO, et al., 2017; WHITMAN; O'NEIL, 2018).

A regulação da secreção ácida gástrica ocorre em quatro fases específicas (FEHER, 2017) que compreendem a fase basal, fase cefálica, fase gástrica e fase intestinal.

Na fase basal a secreção ácida ocorre de forma contínua mesmo sem estimulação da célula parietal (MULHOLLAND, 2006; MERCER; ROBINSON, 2008; RAMSAY; CARR, 2011; FEHER, 2017). Na fase cefálica a secreção gástrica é modulada pelo nervo vago integralmente, com estimulação da secreção salivar, ácido gástrico e secreção pancreática além de inibição da motilidade fásica do TGI superior (FARRÉ; TACK, 2013, FEHER, 2017). A inervação vagal conecta diretamente a secreção gástrica e as funções superiores do sistema nervoso central sob diversos estímulos sensoriais, tais como visão, olfato e paladar estimulam sinalizações do córtex cerebral, amígdalas e hipotálamo (RAMSAY; CARR, 2011; RIBEIRO, 2017). Esta fase é responsável por cerca de 30% da produção total de ácido pós-prandial e

seus efeitos são exercidos por ativação dos centros superiores e liberação pelo complexo vagal dorsal de neurotransmissores como o peptídeo liberador de gastrina e acetilcolina, que agem por duas vias diferentes: por estimulação direta da acetilcolina e indiretamente pela gastrina (peptídeo liberador da gastrina age nas células G antrais e induz sua liberação) (FEHER, 2017; WILSON; STEVENSON, 2019).

Com a chegada do alimento ao lúmen estomacal, inicia-se a fase gástrica, onde a secreção ácida é amplificada tanto por estímulos físicos (60% da secreção ácida), quanto por estímulos mecânicos, acionando as principais vias de secreção ácida (acetilcolina, gastrina e histamina). Os aminoácidos resultantes da ação da pepsina sob os peptídeos da dieta, bem como bebidas alcóolicas, café e cálcio estimulam receptores de células G à liberar gastrina (FEHER, 2017; WILSON; STEVENSON, 2019).

A distensão do estômago provocada pela presença do alimento ativa receptores de estiramento que promovem arco-reflexos longos e curtos e impulsionam os nervos vagais a liberar acetilcolina (ativa células parietais diretamente e células semelhantes às enterocromafins-ECL para secretar histamina) e peptídeo liberador de gastrina que tem como alvo células G (RAMSAY; CARR, 2011; RIBEIRO, 2017).

A redução dos estímulos sensoriais e de estiramento do estômago limita a secreção de ácido gástrico à níveis basais, este estágio é caracterizado pela fase intestinal. Essa resposta negativa à secreção gástrica ocorre por vias parácrinas e endócrinas, como a produção de colecistocinina (aumenta o pH mesmo ainda havendo produção de gastrina pela mucosa duodenal). As células D antrais liberam somatostatina, e são estimuladas pela gastrina liberada nas duas fases anteriores, exercendo um *feedback* negativo ao inibir a liberação de gastrina (FARRÉ; TACK, 2013; WILSON; STEVENSON, 2019).

Com a entrada do alimento no duodeno, a mucosa gástrica fica exposta ao baixo pH promovido pela secreção ácida das células parietais (SCHUBERT, 2016). Esta condição ativa os quimiorreceptores e a liberação via reflexo neuronal do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), responsável por promover a liberação de somatostatina pelas células D, resultando na restauração da inibição tônica sobre a secreção ácida e um retorno à produção ácida basal. O aumento

acentuado do fluxo sanguíneo gástrico durante esta fase aumenta a função secretora das células gástricas (WILSON; STEVENSON, 2019).

As células parietais secretam os íons  $H^+$  continuamente, moduladas por múltiplos fatores centrais e periféricos. Os principais fatores estimuladores da secreção ácida são de origem neuronal (acetilcolina), parácrina (histamina) e endócrina (gastrina) (WALLACE; SHARKEY, 2012; RANG; DALE, 2016; SCHUBERT, 2016), além de grelina, motilina e sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ). Como *feedback* negativo, a somatostatina produzida e secretada nas células D oxínticas e antrais é o principal inibidor da secreção ácida, assim como o peptídeo tipo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) também exerce inibição, em parte por impulsionar a secreção de somatostatina. A própria produção de ácido também estimula a somatostatina de maneira local por retroalimentação negativa (SCHUBERT, 2015; SCHUBERT, 2016).

Os arco reflexos simpáticos e parassimpáticos tem grande relevância no TGI, uma vez que modulam a secreção ácida e a motilidade gastrointestinal. A inervação parassimpática aferente representa cerca de 80% dos neurônios vagais localizados no estômago, e está ligada de maneira intrínseca ao pH gástrico, secreção, esvaziamento e informações sensoriais (náuseas e saciedade) (OKAMOTO, 2018). Embora os estímulos nociceptivos estejam ligados às fibras simpáticas, o cruzamento de fibras parassimpáticas vagais são capazes de produzir síndromes de dor clinicamente confusas como resultado de vias sensoriais semelhantes para o coração, esôfago e estômago, levando a um falso diagnóstico de doenças no TGI superior (gastrite ou refluxo gastroesofágico) (QIN et al., 2003; WILSON; STEVENSON, 2019).

As fibras pós-sinápticas estimulam as células parietais por diversas vias, podendo agir de forma direta, em seus receptores do tipo muscarínico  $M_3$  localizadas nas células parietais, ou indiretamente em seus receptores  $M_3$  que estão localizados nas ECL liberadora de histamina, e nas células G antrais, por meio da liberação do peptídeo liberador de gastrina e consequente estimulação da secreção de gastrina (BERRIDGE, 2014; OKAMOTO, 2018). A gastrina age nos receptores de colecistocinina tipo 2 ( $CCK_2$ ) encontrados na célula parietal, nas ECLs e nas células D. Os receptores muscarínicos  $M_2$  e  $M_4$  localizados nas células D modulam a diminuição da liberação de somatostatina observada com o aumento do tônus vagal (WILSON; STEVENSON, 2019).

A resposta da acetilcolina nos receptores  $M_3$  e da gastrina nos receptores  $CCK_2$  compartilham da mesma via de sinalização. Ambas, quando ligadas aos seus respectivos receptores do tipo metabotrópicos acoplados à proteína  $G_{q/11}$  (BERRIDGE, 2014; OKAMOTO et al., 2018). Em seu estado inativo, os receptores  $M_3$  e  $CCK_2$  ancoram a proteína G em sua região intracelular. A proteína G é composta por três subunidades, a  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Encontra-se ligado na subunidade  $\alpha$  o nucleotídeo difosfato de guanosina (GDP) formando o complexo  $\alpha$ -GDP ligado. Com a ativação do receptor ocorre uma mudança conformacional e o nucleotídeo GDP é trocado pelo trifosfato de guanosina (GTP), formando o complexo  $\alpha$ -GTP ligado. Esse complexo causa uma separação das subunidades por impedimento estérico e formação de dois complexos distintos, o  $\alpha$ -GTP ligado e o dímero  $\beta\gamma$ . O  $\alpha$ -GTP transloca-se pela membrana plasmática e fosforila a proteína de membrana fosfolipase C  $\beta 1$  (PLC- $\beta 1$ ), responsável por hidrolisar o 4-5 bisfosfato de fosfatidil inositol ( $PIP_2$ ) um fosfolípido localizado na membrana, em dois segundos mensageiros: o diacilglicerol (DAG) e o 1-4-5 trisfosfato de Inositol ( $IP_3$ ). O DAG permanece na membrana por causa da sua lipossolubilidade, enquanto o  $IP_3$  solubiliza no citoplasma e se liga ao seu receptor presente nas reservas de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelulares, resultando na translocação desse íon para o citosol seguido de um rápido aumento de sua concentração intracelular (BERRIDGE, 2014. SCHUBERT, 2016; OKAMOTO et al., 2018).

O aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  possibilita vários processos que culminam na transferência e fusão de TVs para a membrana apical da célula parietal. Dentre as várias sinalizações do  $Ca^{2+}$ , uma delas é estimular a proteína quinase II dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) para fosforilar a fosfoproteína sensível a  $Ca^{2+}$  de 28 kDa (CSPP-28). Deste modo, após a fusão das vesículas, a proteína CSPP-28 fosforilada estimula a  $H^+/K^+$  ATPase, transportando íons  $H^+$  para o lúmen dos canalículos e íons  $K^+$  para o interior da célula (BERRIDGE, 2014, OKAMOTO et al, 2018).

A histamina é um dos secretagogos gástricos e sua produção ocorre nas ECLs, sendo responsável por maior parte da secreção ácida gástrica. A histamina liga-se ao receptor de histamina tipo 2 ( $H_2$ ) localizado na membrana das células parietais, ativando-o. Este receptor é do tipo metabotrópico e acoplado a proteína  $G_s$ , que, após ativada, dissocia-se em  $\alpha$ -GTP ligado e dímero  $\beta\gamma$ . A subunidade  $\alpha$ -GTP ligado estimula a enzima ciclase de adenil (AC) a ciclisar o monofosfato de adenosina (AMP),

formando o 3'5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMP<sub>c</sub>), iniciando uma cascata de sinalização dependente de AMP<sub>c</sub> (BERRIDGE, 2014).

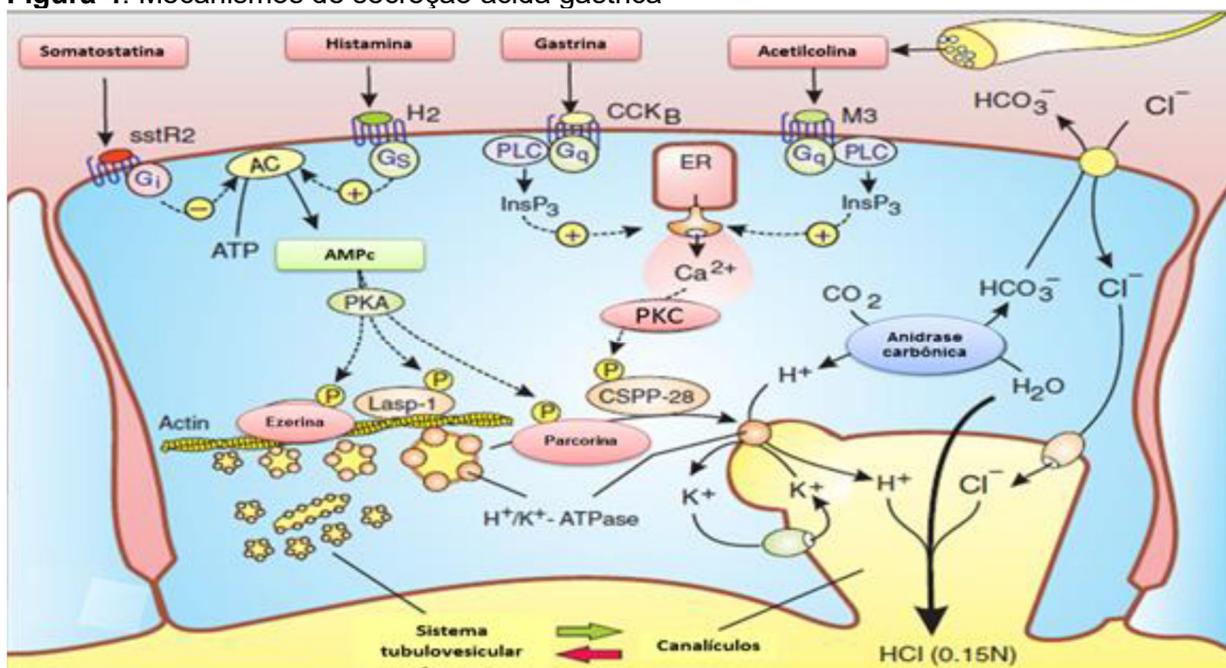
O aumento de AMP<sub>c</sub> intracelular ativa a proteína cinase I dependente de AMP<sub>c</sub> (PKA), fosforila vários alvos proteicos que desencadeiam rearranjos da membrana e do citoesqueleto dentro da célula parietal, promovendo mudanças conformacionais e morfológicas com aumento da condutividade elétrica por meio do epitélio gástrico (aumento da quantidade de canais iônicos funcionais). Algumas proteínas alvos da PKA foram identificadas, como a proteína ligante de membrana citoesquelética (anteriormente a ezerina), a parchorin (transporte de Cl<sup>-</sup> e água), Lasp-1, coronina e CSPP-28, todas fosfoproteínas associadas à atividade secretória (NISHIZAWA et al., 2000; MIZUKAWA et al., 2002; CHOU et al., 2016; OKAMOTO et al., 2018).

Duas destas proteínas fosforiladas (ezerina e Lasp-1) funcionam na remodelação da actina. A Lasp-1 é uma proteína adaptadora e foi identificada em células parietais como uma fosfoproteína de ligação a actina que está relacionada à ativação de secreção ácida mediada por AMP<sub>c</sub> (BERRIDGE, 2014; SCHUBERT, 2015; SCHUBERT, 2016). A ezerina (proteína de ligação a actina) está localizada na membrana apical das células parietais e ao ser fosforilada pela PKA, induz um desdobramento conformacional que permite que a syntaxina 3 se ligue ao seu N terminal, a quebra dessa ligação inibe o acoplamento da H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase à membrana apical com diminuição da secreção ácida (SCHUBERT, 2015; SCHUBERT 2016). A parchorin, uma vez fosforilada pela PKA, transloca-se para a membrana apical, onde ativa diretamente a bomba de prótons e modula positivamente sua atividade (Figura 4) (BERRIDGE, 2014).

Outros fatores também influenciam na secreção do ácido clorídrico, como a grelina (expressa em células semelhantes X/A ou células Gr) e motilina que aumentam a liberação do peptídeo histamina (SCHUBERT, 2015; SCHUBERT 2016).

O gás sulfídrico (sulfeto de hidrogênio - H<sub>2</sub>S) é sintetizado pela ação de duas proteases que são expressas na mucosa gástrica e em células parietais, a cistatina β-sintase e cistatina g-liase. O mecanismo pelo qual o H<sub>2</sub>S estimula a secreção ainda não foi desvendado, porém estima-se que sua ação é diretamente no interior das células parietais (SCHUBERT, 2015; SCHUBERT 2016).

**Figura 4:** Mecanismos de secreção ácida gástrica



(Fonte: adaptada de BERRIDGE, 2014).

SStR<sub>2</sub>- receptor de somatostatina tipo 2; Gi-Proteína G inibitória; Gs-Proteína G estimulatória; AC ciclase de adenilil; Gq-Proteína Gq ou proteína 11; PLC-fosfolipase C; M<sub>3</sub>-receptor muscarínico tipo 3; CCK<sub>B</sub>-Receptor de colecistocinina tipo B; PKA-proteína quinase A; ER-retículo endoplasmático; CSPP-28-Fosfoproteína sensível a concentração de Ca<sup>2+</sup>; CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono; ATP-trifosfato de adenosina; H<sup>+</sup> - íon hidrogênio; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> íon bicarbonato; Cl<sup>-</sup> íon cloreto; IP<sub>3</sub> - 1,4,5 trifosfato de inositol; AMP<sub>c</sub>-monofosfato cíclico de adenosina; Ca<sup>2+</sup> íon cálcio; PKC- proteína quinase C; H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase-bomba de prótons; HCl - ácido clorídrico.

A bomba de prótons é formada por duas subunidades, a  $\alpha$  que realiza as funções catalíticas e de transporte da enzima e a  $\beta$  que é extremamente glicosilada e protege a enzima da degradação sendo necessária para o deslocamento da enzima entre o citoplasma e a membrana da célula parietal (SCHUBERT, 2016).

A bomba de prótons quando ativada, transporta íons H<sup>+</sup> para o lúmen dos canalículos em troca de K<sup>+</sup>. A saída de H<sup>+</sup> promove o efluxo de íons Cl<sup>-</sup> e água simultaneamente. O suprimento de H<sup>+</sup> é fornecido pela enzima anidrase carbônica presente no citoplasma das células parietais, e catalisa a junção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água para formar H<sup>+</sup> e íon bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). O bicarbonato é extrudado por meio de um trocador Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> presente na membrana basolateral da célula o qual também fornece o influxo de Cl<sup>-</sup>, necessário para secreção ácida no canalículo e formação do HCl (BERRIDGE, 2014; RANG; DALE, 2016; SCHUBERT 2016).

A regulação da secreção de HCl envolve fatores neuronais parácrinos e hormonais com ação direta, como a acetilcolina liberada do nervo vago, e indireta por meio do aumento da secreção de gastrina pelas células G no antro e de histamina das

células ECL, agindo de modo parácrino nas células parietais (SCHUBERT, 2015). A gastrina além de agir diretamente nas células secretoras, também ativa as células ECL, enquanto que a somatostatina é liberada pelas células D localizadas no antro gástrico, sendo ativadas pela alta acidez estomacal bem como pela gastrina (retroalimentação negativa), inibindo a secreção ácida. Sua ação é intermediada pelos receptores do tipo SSTR<sub>2</sub>, que são acoplados a proteína G inibitória (Gi) e quando ativados, diminuem a concentração intracelular de AMP<sub>c</sub>, impossibilitando os eventos necessários para translocação e atividade da H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (BERRIDGE, 2014; SCHUBERT, 2015; SCUBERT, 2016; FEHER, 2017).

Outros fatores que bloqueiam a secreção ácida são as prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e prostaciclina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) o qual se liga ao seu receptor EP<sub>2/3</sub> nas células ECS, acoplado a proteína Gi que inativa a via da adenilil ciclase e diminui os níveis de AMP<sub>c</sub> (BERNE; LEVY, 2009; RANG; DALE, 2016; RIBEIRO, 2017).

### **2.2.2 Mecanismos de defesa da mucosa gastrintestinal**

A mucosa gástrica é exposta continuamente a fatores e substâncias agressoras que desencadeia danos ao epitélio estomacal por meio de diversos mecanismos, dentre eles o aumento da secreção ácida péptica, diminuição do fluxo sanguíneo, supressão de prostaglandinas endógenas, inibição dos fatores de crescimento e regeneração celular e alterações da motilidade (BOEING et al., 2016).

O baixo pH propicia o ambiente proteolítico ideal para digestão de proteínas importante da dieta, porém o HCl é um dos fatores agressores da mucosa, causando danos e perda da integridade. Entre outros fatores agressores da mucosa estão os hábitos alimentares, tabagismo, alcoolismo, estresse, uso contínuo de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) ou presença do bacilo *Helicobacter pylori* (DONG; KAUNITZ, 2006; MAYER, 2007; KEMMERLY; KAUNITZ, 2014).

As lesões na mucosa gástrica podem ser desenvolvidas por fatores agressivos endógenos (ácido, pepsina e ácidos biliares) associados a fatores exógenos (AINES, tabagismo, consumo de álcool e estresse emocional) que desestabilizam a integridade da mucosa e inibem a produção de fatores protetores, como o muco, o bicarbonato e as prostaglandinas (JÜRGENS et al., 2012; TARNAWSKI et al., 2012; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; RIBEIRO, 2017).

Os fatores de proteção gástrica agem em diferentes níveis, como na camada de muco, epitélio da superfície da mucosa e mais profundamente, na vasculatura da mucosa, o que mantêm sua integridade estrutural e funcional (KEMMERLY; KAUNITZ, 2014; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; RIBEIRO, 2017).

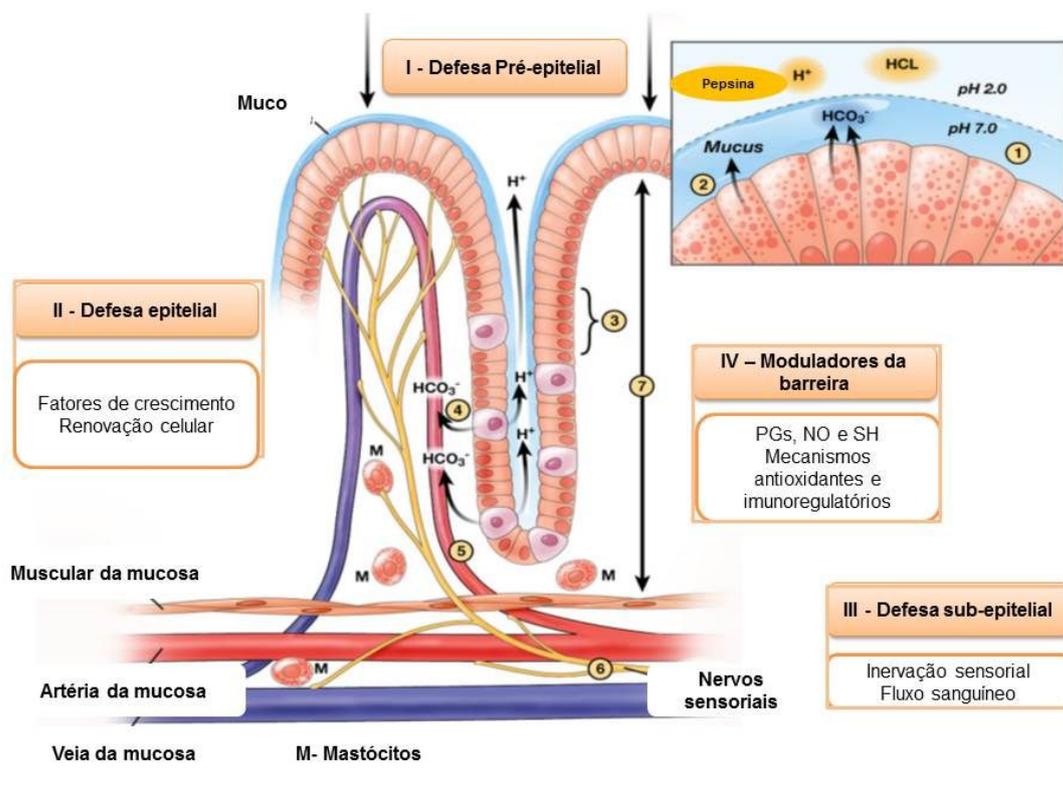
Os processos de hemostasia e os mecanismos de defesa do epitélio estomacal envolvem sistemas locais e neuro-humorais que compreendem os fatores: pré-epiteliais, epiteliais, sub-epiteliais ou endoteliais (TARNAWSKI et al., 2013; QUINTANA-HAYASHI et al., 2018).

A primeira linha de defesa da mucosa gástrica compreende os fatores pré-epiteliais como o muco, fosfolipídios de membrana e HCl) (QUINTANA-HAYASHI et al., 2018). Os fatores epiteliais representam a segunda linha de defesa e compreendem as células epiteliais, os fatores de crescimento e renovação celular. Os fatores sub-epiteliais compreendem a inervação sensorial, o fluxo sanguíneo, os fatores reconstrutivos do epitélio e os reguladores da barreira gástrica como prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) e prostaciclina, óxido nítrico (NO) e o sistema antioxidante e imunorregulatórios, demonstrado na figura 5 (LAINE et al., 2008; TARNAWSKI et al., 2012; TARNAWSKI et al., 2013; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015; RIBEIRO, 2017).

### **2.2.2.1 Defesa pré-epitelial**

A primeira barreira física no lúmen gástrico é formada pelo muco/bicarbonato, monocamada de fosfolipídios surfactantes localizado na superfície das células epiteliais gástricas. O muco é um gel viscoso, translúcido e aderente formado por 95% de água e o restante é composto por mucina, fosfolipídios, glicoproteínas (mucina), ácidos nucleicos e bicarbonato, apresenta uma espessura entre 200-300 µm. A camada de muco mantém um microambiente neutro com pH próximo a neutralidade (=7) devido a retenção de íons bicarbonato na camada de muco, o que impede a digestão proteolítica da pepsina (inativa em pH neutro) (LAINE et al., 2008; RIBEIRO, 2017).

**Figura 5.** Mecanismos de proteção da mucosa gástrica



(Fonte: adaptada de TARNAWSKI et al., 2012; TARNAWSKI et al., 2013; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

1. A camada mucosa é composta por: Mucina, fosfolipídios, bicarbonato e não-bicarbonato, formando a primeira linha de defesa, a barreira pré-epitelial. 2. Superfície de células epiteliais que são capazes de secretar muco e estão interligadas por junções gap formando uma barreira impermeável ao ácido e a pepsina, formando a segunda barreira de defesa da mucosa gástrica. 3. Células progenitoras da mucosa. 4. Porção alcalina formada pela secreção de muco pela membrana basolateral das células parietais gástricas, durante a secreção. 5. O fluxo sanguíneo proporciona oxigênio e nutrientes, formando uma barreira endotelial e gera vasodilatadores, como o óxido nítrico e prostacilinas. 6. Nervos sensoriais da mucosa detectam o ácido mucosal e estimulam a secreção de bicarbonato/muco. 7. As prostaglandinas estimulam a secreção de muco e inibem a secreção ácida, otimizando mecanismos defensivos.

As mucinas constituem uma família oligomérica de glicoproteínas glicosiladas de alto peso molecular com ligação de 105 monómeros entre si por meio de pontes dissulfetos localizados em resíduos de cisteínas (40 MDa) e consistem de um núcleo proteico com regiões ricas em serina (BANSIL; TURNER, 2006; QUINTANA-HAYASHI et al., 2018). As mucinas possuem papel importante na diferenciação e renovação do epitélio, modulação da adesão celular, resposta imune, sinalização celular, apoptose e modulação de secreção de células especializadas (secretoras de muco) (CORFIELD, 2015; MATSE et al., 2017).

As mucinas podem ser divididas em dois tipos principais: as mucinas secretoras e as transmembranares. As mucinas secretoras auxiliam no processo de secreção de muco, enquanto que as mucinas transmembranares além do componente secretor possuem um fator de transcrição intracelular respondendo a estímulos externos e adesão celular (SHEEHAN et al., 2000; BANSIL; TURNER, 2006; LINDÉN et al., 2008; QUINTANA-HAYASHI et al., 2018). Deste modo, ambas as mucinas promovem a integridade da camada de muco, conferindo proteção aos agentes externos (MATSE et al., 2017).

A principal mucina da superfície celular é mucina-1 (MUC1) e as principais mucinas secretoras são as mucinas MUC2, MUC5AC e MUC6. A MUC1 está presente por todo epitélio gástrico e a MUC5AC e a MUC6 são as principais mucinas formadoras de gel localizadas na superfície e na região glandular, respectivamente, sendo produzidas e secretadas pelas células mucosas dos tecidos glandulares e células epiteliais especializadas (caliciformes). A MUC5AC é secretada pelas células superficiais da mucosa gástrica, em resposta aos peptídeos gastrina ou histamina. As mucinas MUC6 são secretadas pelas células secretoras de muco (células caliciformes) e formam a segunda camada de mucina, protegendo o epitélio da ação lesiva do ácido clorídrico, das pepsinas, álcool, *Helicobacter pylori* e suas toxinas (SINGH; HOLLINGSWORTH, 2006; HATTRUP; GENDLER, 2008; KEMMERLY; KAUNITZ, 2014; QUINTANA-HAYASHI et al., 2018).

O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon e sua secreção é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e agentes colinérgicos. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são capturadas pelas glicoproteínas presentes no muco, conferindo-o atividade antioxidante frente a ação deletéria de agentes citotóxicos (etanol, AINEs dentre outros) (YANDRAPU e SAROSEIK, 2015; RIBEIRO, 2017).

No estômago a secreção do íon bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) é mediado por vários tipos de prostaglandina E sintase, principalmente a PGES-1 ligada a membrana da célula parietal. Esta enzima catalisa a conversão de PGH<sub>2</sub> em PGE<sub>2</sub> que aumenta os níveis de AMPc e cálcio no interior da célula, intensificando o influxo de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> para o meio intracelular por meio da ativação do co-transportador de sódio-bicarbonato (Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), localizado na membrana baso da célula parietal (SCHUBERT 2016; LEWIS et al., 2017).

No estômago, as prostaglandinas ligam-se aos seus receptores EP<sub>1</sub>, estimulando a secreção de bicarbonato. Outros fatores como o ácido luminal, o fator liberador de corticotrofina (CRF), a melatonina, a uroguanilina e a orexina A também estimulam a secreção de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (LAINE et al., 2008; LEWIS et al., 2017; WILSON; STEVENSON, 2019). Esse íon é secretado para o lúmen gástrico pelo transportador cloreto-bicarbonato (simporte) e difunde-se na camada de muco. Esse processo também pode ser estimulado pelo ácido luminal, o fator de liberação de corticotropina (CRF), melatonina, uroguanilina, orexina A e Prostaciclina (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

Os fosfolípidios formam uma película na superfície luminal com características hidrofóbicas fortes, impedindo o influxo de íons H<sup>+</sup> (LAINE et al., 2008; RIBEIRO, 2017). A porção polar fica em contato com o muco, enquanto que a parte hidrofóbica fica no lúmen gástrico impedindo a retrodifusão dos íons H<sup>+</sup> em direção à mucosa e promovendo sua defesa (HAM et al., 2012; MCDONALD; MACFARLANE, 2018).

O ácido clorídrico mesmo sendo um agente lesivo da mucosa gástrica também promove efeitos benéficos uma vez que inativa e impede o crescimento de patógenos (bactérias, fungos e parasitas) inativando suas toxinas que possam ser ingeridas pela água e pelos alimentos, além de ser fundamental na digestão de proteínas, na absorção de cálcio, ferro e vitamina B12 (SCHUBERT, 2015; SCHUBERT 2016; SCHUBERT 2017).

#### **2.2.2.2 Defesa epitelial**

A segunda linha de defesa gástrica é formada pela camada contínua de células epiteliais superficiais ligadas por meio das “gap junctions” que proporcionam uma barreira resistente e está em constante renovação pela proliferação de células progenitoras permitindo a restituição do epitélio gástrico (DAURE et al., 2016).

São responsáveis pela secreção de muco e bicarbonato, síntese das prostaglandinas, peptídeos antimicrobianos (β-defensinas e catelicidinas), proteínas de choque térmico (HSP) e peptídeos da família do fator trefoil (TFFs) (LAINE et al., 2008; TARNAWSKI et al., 2012; TARNAWSKI et al., 2013; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

As HSPs são polipeptídeos produzidos pelas células epiteliais que interagem com proteínas desnaturadas devido ao estresse oxidativo, como: pH ácido, temperatura elevada e presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DAURE et al., 2016). Elas previnem a desnaturação proteica intracelular, reduzem apoptose, produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e infiltração de leucócitos, bem como aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) (LEUNG et al., 2015; WU et al., 2016; LEITE et al., 2016; CHEBOTAREVA et al., 2017).

Os peptídeos catiônicos,  $\beta$ -defensinas e catelicidinas, fazem parte da imunidade inata da superfície da mucosa, defendendo contra colonização bacteriana e diminuindo o tempo de cicatrização na úlcera (LAINE et al., 2008; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

As defensinas são peptídeos antimicrobianos de carga positiva com grande quantidade de arginina em sua composição e são secretados pelas células imunes (monócitos, neutrófilos) e pelas células epiteliais (gastrintestinais, pulmonares, urogenitais, pele e placenta) (DIXON et al., 2016; PERO et al., 2017). São divididas em três subfamílias:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$ -defensinas.

As  $\beta$ -defensinas humanas (HBDs) são constituídas por peptídeos com cerca de 35 resíduos de aminoácidos, incluindo seis resíduos de cisteína com três pontes dissulfeto (YANAGI et al., 2005), sua expressão é majoritariamente em tecidos epiteliais, formando a segunda linha de defesa e possuem duas atividades principais: antimicrobiana e quimiotática (COLAVITA et al., 2015; CHEN et al., 2016; PERO et al., 2017).

A catelicidina é uma família de peptídeos antimicrobianos com ação efetora na imunidade inata, modulação da resposta inflamatória local e ativação da imunidade adaptativa. Esses peptídeos são sintetizados na forma precursora com um domínio C-terminal estruturalmente variado, sendo essa a região biologicamente ativa. A catelicidina humana (LL-37) é expressa ao longo do TGI. No estômago sadio é produzida pelas células da superfície epitelial, células principais e parietais e também está presente na secreção gástrica (ZHANG et al., 2016; SHEN; XIAO, 2018). Em um indivíduo com *Helicobacter pylori* a expressão de LL-37 está desregulada, sugerindo que a catelicidina pode ter um papel importante na prevenção da inflamação relacionada a bactérias bem como na carcinogênese no TGI (CUPERUS et al., 2016; SHEN; XIAO, 2018).

As proteínas do fator trefoil (TFF) de baixo peso molecular correspondem a uma família de peptídeos que estão envolvidas na estabilização e viscosidade da camada de muco (DIECKOW et al., 2016; AIHARA et al., 2017). Apresentam-se na forma de três peptídeos, o TFF-1, TFF-2 e TFF-3, sendo esse último localizado no TGI e secretado por epitélios mucosos com ação na proteção da mucosa, nos efeitos antiapoptose, na migração epitelial, na interação com a mucina para formar a barreira de muco e na estimulação da renovação celular da mucosa após ser lesionada (SCHUBERT, 2015; SCHUBERT 2016).

Um dos mecanismos de defesas da mucosa gástrica considerado mais importante é o de reconstituição celular. A renovação do epitélio é feita a cada 2-4 dias, onde as células gástricas lesionadas ou senescentes são substituídas por células progenitoras. Essa substituição completa-se em torno de 3-7 dias. Vários fatores de crescimento contribuem para a sobrevivência e manutenção dessas células. A reconstituição da glândula se inicia minutos após a lesão, com migração de células epiteliais para o local afetado (LAINE et al., 2008; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

### **2.2.2.3 Defesa pós-epitelial**

Vários fatores compõem a defesa pós-epitelial contra lesões como a microcirculação capilar, fatores de crescimento e regeneração celular, prostaglandinas, óxido nítrico, sulfato de hidrogênio e inervações sensoriais presentes nesta camada do estômago. Todos esses fatores protegem as células epiteliais e endoteliais contra lesões e previnem a agregação de plaquetas e leucócitos (LAINE et al., 2008; WILSON; STEVENSON, 2019).

#### **2.2.2.3.1 Fluxo sanguíneo mucoso**

A rede de vasos que irriga a mucosa gástrica é bem desenvolvida e se origina no tronco celíaco impedindo a isquemia deste órgão. A grande e a pequena curvatura contêm a maioria dos vasos sanguíneos, já as artérias gástricas curvas suprem o fundo e o corpo proximal do estômago (WILSON; STEVENSON, 2019).

O fluxo sanguíneo confere proteção à mucosa devido a maior disponibilidade de oxigênio, nutrientes, bicarbonato, além de remover metabólitos tóxicos. Quando a

mucosa gástrica é exposta a substâncias irritantes ou quando ocorre retrodifusão de íon  $H^+$ , o aumento do fluxo sanguíneo auxilia no processo de reparação tecidual. As células endoteliais dos capilares produzem substâncias vasodilatadoras como o NO e PGs que se opõem à agentes vasoconstritores a exemplo dos leucotrienos  $C_4$ , tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) e endotelina (YANDRAPU e SAROSEIK, 2015; RIBEIRO, 2017).

#### **2.2.2.3.2 Inervação sensorial da mucosa**

O estômago recebe ramificações nervosas provindas tanto dos sistemas nervoso simpático e parassimpático quanto do sistema nervoso entérico (SNE). O SNE é o terceiro ramo do sistema nervoso autônomo (SNA) e contém tantos neurônios quanto a medula espinhal, podendo funcionar de forma autônoma. Ele transmite informações para o sistema simpático por meio dos nervos esplâncnico, e para o sistema parassimpático por meio do nervo vago (FURNESS; COSTA, 1980; FURNESS, 2012; MEMIC et al., 2017; WILSON; STEVENSON, 2019).

Tanto a mucosa gástrica quanto os vasos adjacentes a ela são inervados por grande quantidade de neurônios sensoriais na camada submucosa, formando o plexo submucoso. Junto com os capilares, as fibras nervosas penetram na lâmina própria até a base das células epiteliais superficiais, e são capazes de sentir o conteúdo luminal e entrada de ácido na barreira mucosa, por meio de canais de ácido (CAMPBELL, 2015; FEHER, 2017). Sua ativação regula o tônus das arteríolas submucosa, influenciando diretamente no fluxo sanguíneo mucoso. Além disso, a estimulação desses nervos promove a liberação de neurotransmissores como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e a substância P em torno dos terminais nervosos dos vasos submucosais. A função do gene relacionado ao peptídeo é proteger a mucosa pela liberação de substâncias vasodilatadoras, como o óxido nítrico (NO) (HOLZER, 2006; LAINE et al., 2008; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

#### **2.2.2.3.3 Reconstituição do epitélio gástrico**

O epitélio do TGI tem elevada taxa de renovação celular, processo esse essencial para manter a integridade estrutural e funcional da mucosa, substituindo o epitélio danificado ou senescente (FALLAH et al., 2018). A manutenção de células-

tronco multipotentes, localizadas na base das criptas intestinais, controla o processo de renovação celular e resulta em diferentes tipos de células funcionais. (PAUL et al., 2004; FALLAH et al., 2018). A renovação epitelial ocorre de 2-4 dias por meio da substituição de células epiteliais lesionadas ou envelhecidas por células progenitoras e são controladas pela sinalização de fatores de crescimento, regulando a proliferação celular, em que logo após lesionada, ocorre a reepitelização e reconstrução glandular pela migração (LAINE et al., 2008; TARNAWSKI et al., 2012; TARNAWSKI et al., 2013; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

Os Fatores de crescimento controlam a reepitelização e reconstrução glandular, a exemplo do fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), assim como fator trefoil (TFF), prostaglandinas produzidas pela ativação ciclooxygenase-2 (Cox-2) e outras citocinas produzidas localmente pela regeneração de células de maneira ordenada e integrada. Todos esses fatores estimulam a proliferação celular por meio de vias de transdução de sinais, podendo ser de modo direto ou por transativação do receptor do EGF (LAINE et al., 2008; TARNAWSKI et al., 2012; TARNAWSKI et al., 2013; YANDRAPU; SAROSIEK, 2015).

#### **2.2.2.3.4 Fatores moduladores da barreira gástrica**

##### **2.2.2.3.4.1 Óxido nítrico**

O óxido nítrico (NO) é um gás lipossolúvel de alta permeabilidade e instabilidade, que atua localmente e sendo sintetizado pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS). Essa enzima converte o aminoácido L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO (HALL; GUYTON, 2011). As enzimas sintases do óxido nítrico (NOS) são uma família de sintases catalítica que englobam a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS) e todas são estimuladas pelo aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelularmente. A isoforma endotelial, eNOS, é expressa constitutivamente nas células endoteliais, já a isoforma iNOS, não é constitutivamente expressa, mas é induzida por citocinas (ZHOU et al., 2018).

O NO apresenta uma grande importância na defesa gastroduodenal. Sua atividade vasodilatadora estimula a formação de vasos sanguíneos, aumenta o fluxo sanguíneo e exerce uma ação anti-inflamatória (MA; WALLACE, 2000; KEMMERLY;

KAUNITZ, 2012; KEMMERLY; KAUNITZ, 2014; DELLAMEA et al., 2014). Entretanto, o NO produzido pela iNOS promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio, além de efeitos tóxicos sobre as células, ocasionando o surgimento de úlceras pépticas (LEBDA et al., 2018).

O NO é importante na manutenção da integridade da mucosa gástrica. Quando produzido pelo endotélio dos vasos que irrigam a mucosa gástrica ou ainda quando é liberado pelas terminações nervosas sensoriais, atua como modulador na mucosa gástrica por aumentar o fluxo sanguíneo e a angiogênese, estimular a secreção de muco e bicarbonato, inibir o estresse oxidativo, diminuir a degranulação de mastócitos e liberação de citocinas por macrófagos, e reduzir a adesão neutrofílica em células endoteliais, eliminar radicais livres com consequente diminuição dos peróxidos lipídicos gástricos (VALLE, 2015; MAGIEROWSKI et al., 2015; WEI et al., 2018).

Nos sistemas neuronal, cardiovascular, gastrointestinal e outros, o NO medeia os seus efeitos biológicos pela ciclase de guanilil solúvel (GCs) e estimula a síntese de monofosfato de guanosina (GMP<sub>c</sub>) (IGNARRO, 2002). Após sua produção, o NO difunde-se da célula endotelial para a célula muscular, sendo um potente estimulador da enzima ciclase de guanilil solúvel (GCs). A GCs é um receptor heterodimérico de NO e tem duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$  com quatro isoformas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ). Destas, dois heterodímeros  $\alpha_1/\beta_1$  e  $\alpha_2/\beta_1$  são ativados pelo NO a converter trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMP<sub>c</sub>). O aumento de GMP<sub>c</sub> intracelular ativa a proteína quinase dependente de GMP<sub>c</sub> (PKG), fosfodiesterases reguladas por GMP<sub>c</sub>, bem como canais iônicos, incluindo sódio, cálcio controlado por voltagem (Ca<sub>v</sub>), potássio ativado por cálcio (K<sub>ca</sub>) e potássio sensível a ATP (K<sub>ATP</sub>), canais controlados por nucleotídeo cíclico. Esses eventos resultam em diminuição da concentração de Ca<sup>2+</sup> na célula muscular, diminuição da funcionalidade da máquina contrátil, regulação do tônus e motilidade do músculo liso vascular e consequente relaxamento do vaso, além de atuar na regulação da apoptose, remodelação e angiogênese (NOTT; RICCIO, 2009; HALL; GUYTON, 2011; GULATI et al., 2017; VEERAPPAN et al., 2017).

#### 2.2.2.3.4.2 Canais para íons potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ )

Os canais para íons potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) são macromoléculas transmembranas estruturais formadas por proteínas hetero-octamérica, formado por 4 subunidades retificadas interna (Kir) e 4 subunidades de receptor de sulfoniluréias (SUR) com peso molecular de 880 kDa (LI et al., 2017) e possuem uma sequência de cinco aminoácidos comum nas subunidades de toda família de canais de  $K^+$  (treonina, valina, glicina, tirosina e glicina), conferindo-os o filtro de seletividade apenas para íons  $K^+$  (JENKINSON, 2006; BONFANTI et al., 2015; CURRÒ, 2016; CRICHTON, 2019).

A sinalização via NO/GMP<sub>c</sub> pode ativar diversos alvos proteicos, dentre eles, os diferentes tipos de canais de  $K^+$ , em especial os  $K_{ATP}$  estão envolvidos nos mecanismos de defesa gástrica (PESKAR et al., 2002; GOMES et al., 2006; MEDEIROS et al., 2008; BONFANTI et al., 2015).

A abertura dos  $K_{ATP}$  ocorre em função de vários estímulos, dentre eles o aumento citosólico dos níveis de cálcio que promove o efluxo de  $K^+$  com hiperpolarização da membrana que reduz a excitabilidade celular, resultando em relaxamento da célula muscular lisa (CURRÒ, 2016). Os neurotransmissores excitatórios acetilcolina e substância P bloqueiam os  $K_{ATP}$ , entretanto a sinalização de outros neurotransmissores como o NO e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) podem ativa-los no músculo liso do TGI (NA et al., 2017).

O NO ativa a ciclase de guanilil solúvel (sGC) que aumenta os níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMP<sub>c</sub>) e conseqüentemente ativa os canais  $K_{ATP}$ , favorecendo um efeito gastroprotetor por ativação da via NO/GMP<sub>c</sub>/ $K_{ATP}$  pelo aumento da microcirculação gástrica da expressão de superóxido e pela inibição da ativação de neutrófilos (TRISTE et al., 2014; ROZZA et al., 2014; ARUNACHALAM et al., 2017).

Os  $K_{ATP}$  também podem ser inibidos pelo aumento da concentração intracelular de ATP e ativados pelo nucleotídeo difosfato de adenosina (ADP) ligado ao íon  $Mg^{2+}$  (IPAVEC et al., 2011; CURRÒ, 2016).

### 2.2.2.3.4.3 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) são autacóides lipídicos biossintetizadas a partir do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado de 20 carbonos, pela enzima ciclooxigenase (COX). Essa enzima localiza-se por todo o TGI, sintetizando PGs e provocando diversas ações, tais como, controle da secreção ácida, secreção de muco e bicarbonato, fluxo sanguíneo nas mucosas e manutenção da integridade da mucosa (MILLER, 1983; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; TAKEUCHI; AMAGASE; 2017).

Os prostanoides, assim denominados prostaglandinas e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), são formados quando o AA é liberado da membrana plasmática por fosfolipases (PLAs). A via biossintética das PGs inicia-se pela ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) clivando o AA da membrana plasmática da célula, sendo convertido inicialmente em prostaglandinas intermediárias pelas isoformas da ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2). As principais prostaglandinas bioativas são: prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) e prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; BERRIDGE, 2014). Sua produção é distribuída por todo o corpo de acordo com os diferentes estímulos produzidos pelas células, atuando como mediadores lipídicos autócrinos e parácrinos para manter a homeostase local no corpo (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; KE et al., 2017).

As prostaglandinas (PGs) têm importância fundamental na inflamação, elevando sua atividade no tecido inflamado e sendo responsáveis pelos principais sintomas da inflamação aguda, como rubor, inchaço, dor e calor (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

A mucosa gástrica apresenta uma fonte contínua de produção de PGs, as quais têm como função proteger a mucosa gástrica contra a formação de lesões, aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa, estimular a secreção de muco e bicarbonato e inibir a secreção ácida gástrica (TAKEUCHI; AMAGASE; 2017).

As ciclooxigenases apresentam sob duas isoformas de COX: a COX-1 constitutiva e a COX-2 induzida (KE et al., 2017).

A COX-1 é expressa na maioria das células e sua principal função é garantir a homeostase, como citoproteção epitelial gástrica (PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>). Já a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios, hormonais e fatores de crescimento. Contudo a homeostase dos prostanoides é mantida pela ação conjunta e balanceada das duas

isoformas, regulando a sua produção, segundo a necessidade do organismo (LAINE et al., 2008; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; TAKEUCHI; AMAGASE; 2017).

A subfamília de receptores de prostanoídes é composta por oito membros: os subtipos EP<sub>1</sub> (receptor prostanoíde E), EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> do receptor PGE, receptor PGD (DP<sub>1</sub>), receptor PGF (FP), receptor PGI (IP) e TX receptor (TP) (BIRUKOVA et al., 2015). Esses receptores são acoplados a várias vias de sinalização intracelular, O EP<sub>2</sub>, EP<sub>4</sub>, IP e DP<sub>1</sub> ativam a ciclose de adenilil (AC) via G<sub>s</sub>, aumentando os níveis intracelulares de AMPc. O EP<sub>1</sub> e FP ativam o metabolismo do fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) via G<sub>q</sub>, levando à formação de trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e translocação de Ca<sup>2+</sup> das suas reservas intracelulares. As isoformas do EP<sub>3</sub> podem se acoplar via G<sub>i</sub> ou G<sub>12</sub> com aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, inibição da geração de AMPc e ativação da proteína G pequena Rho (HATAE et al., 2002). No entanto, os efeitos dos prostanoídes nestas vias de sinalização acopladas à proteína G podem mudar em função da concentração ou estrutura do ligante (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; BIRUKOVA et al., 2015; TAKEUCHI; AMAGASE; 2017).

Estudos conduzidos por Robert e colaboradores (1979) demonstraram, de modo inédito, a ação de PGs, especificamente a prostaglandina E<sub>2</sub>, como agente protetor da mucosa gastrintestinal frente aos agentes necrotizantes, estresse e AINES, e atribuiu à essas ações o aumento de fatores de citoproteção (ROBERT et al., 1979; TAKEUCHI; AMAGASE; 2017).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem a COX, sendo uma das causas mais comum de doenças no TGI por diminuir a síntese de prostaglandinas responsáveis pela citoproteção gástrica e consequente diminuição da secreção de muco e do fluxo sanguíneo (STEWART; ACKROYD, 2011). Os AINEs inibem competitivamente o sítio ativo das isoformas da COX em apenas um monômero do dímero da COX, sendo suficiente para bloquear a produção de prostanoídes (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; KE et al., 2017).

#### **2.2.2.3.4.4 Sistemas antioxidantes**

O Sistema antioxidante é um conjunto de moléculas e enzimas que reagem com espécies reativas de oxigênio (EROs) e inativa-as para prevenir o estresse oxidativo (GOUGH; COTTE, 2011). As espécies reativas de oxigênio são formadas em sua maioria pelo metabolismo mitocondrial e outras organelas como os

peroxissomos e o retículo endoplasmático por meio do complexo de respiração celular em que são produzidas altas taxas de ATP, oxidação de ácidos graxos e desintoxicação de processos xenobióticos, respectivamente (MURPHY, 2009; SARANGARAJAN et al., 2017). As EROs englobam íons e peróxidos de oxigênio reativos que causam danos, em altas concentrações, a biomoléculas como DNA, ácido ribonucléico (RNA), proteínas e lipídios, que podem levar ao desequilíbrio homeostático (SARANGARAJAN et al., 2017).

O organismo possui um sistema de defesa antioxidante que pode ser enzimático e não enzimático. O sistema de defesa enzimático é composto por proteases que formam a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, como: a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutational peroxidase (GPx) e a glutational S-transferase (GST) (KIVRAK et al., 2017; SARANGARAJAN et al., 2017).

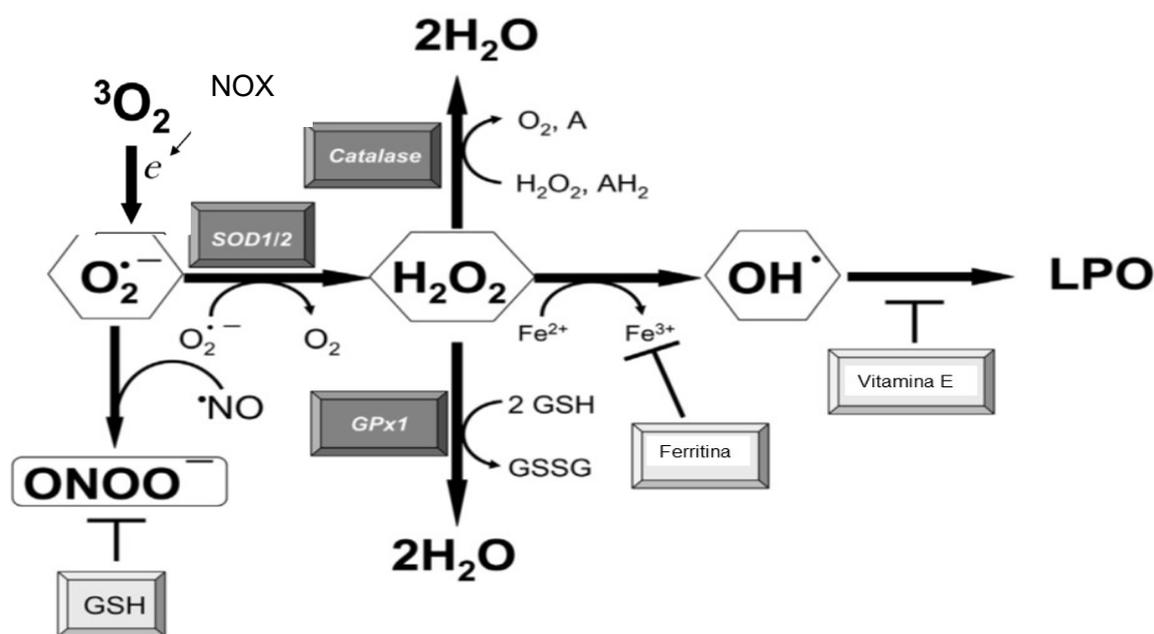
O sistema antioxidante não enzimático corresponde a segunda linha de defesa e pode ser de produção endógena ou exógena, com destaque para a glutational reduzida (GSH), tioredoxinas, ácido úrico e bilirrubina que são antioxidantes endógenos e ácido ascórbico, tocoferóis, vitaminas E e C, carotenóides, compostos fenólicos que são antioxidantes exógenos (MURPHY, 2009; GOUGH; COTTE, 2011; CALCABRINI et al., 2016; KIVRAK et al., 2017; SARANGARAJAN et al., 2017).

O sistema antioxidante pode agir pelo mecanismo de ruptura da cadeia (no qual o antioxidante primário libera um elétron para o radical livre encontrado nos sistemas) pela eliminação dos iniciadores de espécies de EROS/nitrogênio reativo (antioxidantes secundários) e pela supressão de catalisadores de iniciação de cadeia. Os antioxidantes também podem afetar os sistemas biológicos pela liberação de elétrons, quelação de íons metálicos, co-antioxidantes ou pela manutenção da expressão de genes (KIVRAK et al., 2017).

A reação espontânea de superóxido ( $O_2^-$ ) com óxido nítrico (NO) produz peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). A enzima NADPH oxidases (NOX) e as mitocôndrias são fontes potenciais de superóxido, deste modo, o óxido nítrico é gerado por óxido nítrico sintases (NOS) e o peróxido de hidrogênio pode ser formado diretamente por várias oxidases. Os mecanismos de defesa antioxidante celular incluem enzimas para o metabolismo rápido de EROs (Espécies reativas de oxigênio), proteínas de ligação para metais de transição (ex. Ferritina) e antioxidantes de quebra de cadeia (ex.

Vitamina E) para prevenir a peroxidação lipídica (LPO). O superóxido pode ser metabolizado pela superóxido dismutase-1 (Cu/Zn-SOD) e dismutase-2 (Mn-SOD), já o peroxinitrito pode ser eliminado pela glutathiona (GSH) e o peróxido de hidrogênio é reduzido pela glutathiona peroxidase1 (GPx1) ou pela catalase (CAT) como mostrado na figura 6 (JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2018).

**Figura 6:** Representação do sistema de defesa antioxidante celular



(Fonte: adaptada de JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2018).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas por reduções de um elétron de oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ).

#### 2.2.2.3.4.5 Grupamentos sulfidrila

Os grupamentos sulfidrílicos (-SHs) são formados por grupos químicos denominados tióis que contém um átomo de enxofre ligados a hidrogênio existentes em proteínas, formando uma ligação covalente não-polar devido à sua pequena diferença de eletronegatividade. Os grupamentos sulfidrílicos protegem as células das superfície da mucosa gástrica por meio de pontes de dissulfeto entre suas subunidades, promovendo a formação de uma barreira de muco-bicarbonato e favorecendo a integridade das células epiteliais, sobretudo quando as espécies

reativas de oxigênio estão envolvidas na formação dos danos teciduais (RADOVANOVIĆ et al., 2015; PARRA et al., 2015; OCHMANN, 2017).

Os grupamentos sulfidrílicos tem a capacidade de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio, desse grupo se destacam a glutatona redutase (GSH), peroxidase (GPx) e Transferase (GSTS). A GSH é considerada um excelente nucleófilo, devido a sua capacidade de doar elétrons a outros compostos, o que a torna um bom redutor (HUBER; ALMEIDA, 2008). A diminuição da disponibilidade deste antioxidante não enzimático agrava o estresse oxidativo e resulta no aumento das lesões a mucosa gástrica e as concentrações de grupos SH servem como marcadores de oxidação proteica (LABONNE et al., 2009; RADOVANOVIĆ et al., 2015).

Os grupamentos sulfidrilas de uma forma geral desempenham um papel importante na proteção da mucosa gástrica, a glutatona protege a integridade e a permeabilidade da membrana celular e pode atuar como antioxidante sequestrador de radicais livres, na manutenção da função imunológica, na regulação da síntese e degradação de proteínas e na manutenção da estrutura proteica (PARRA et al., 2015; OCHMANN, 2017).

#### **2.2.2.3.4.6 Citocinas**

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular (6 a 70 kDa) e produzidas por diferentes células do sistema imunológico, que atuam como moléculas sinalizadoras pelas vias autócrina, parácrina e endócrina em órgãos e em tecidos inflamados (GUO et al., 2017).

As citocinas são mediadores para a manutenção da homeostase da mucosa intestinal e efetivas durante doenças inflamatórias no TGI (BAMIAS et al., 2014; BAMIAS; COMINELLI, 2016) além de desenvolver importantes ações no controle e função de várias células imunes e não imunes, tais como a regulação imunológica, a patogênese e a modulação de doenças mediadas pelo sistema imune (VILCEK, 2003; O'SHEA et al., 2019).

As citocinas podem ser classificadas de acordo com seus receptores em receptores da citocina do tipo I (família da hematopoietina) e tipo II (família do interferon), receptores da família do fator de necrose tumoral (TNF), receptor da interleucina 1 (IL-1), receptores Toll-like relacionados (TLRs), receptores de IL-17,

receptor de tirosina-cinases e receptor serina-quinases do fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (VILCEK, 2003; O'SHEA et al., 2019).

Com a ligação da citocina ao seu respectivo receptor, ocorre transdução de sinal por segundo mensageiros promovendo ativação de fatores de transcrição ou atuando sobre as células do sistema imunológico quanto a regulação do tipo e grau de inflamação (WOOD et al., 2016; DONETTI et al., 2016). Essa sinalização pode gerar respostas pró-inflamatórias (IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-7 e TNF) e respostas anti-inflamatórias (IL-10, IL-11, e IL-13), modulando a resposta inflamatória (BLUNDELL, et al., 2015; BOCKERSTETT; DIPAOLO, 2017)

Na úlcera gástrica as principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas são: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (YUN et al., 2017). Estão relacionadas principalmente na resposta à fase aguda da inflamação, sendo característico o infiltrado de neutrófilos na mucosa gástrica com liberação de EROs, causando lesões na mucosa, além de aumento de moléculas de adesão em células endoteliais e leucócitos (EAMLAMNAM et al, 2006; BLUNDELL, et al., 2015; ALMASAUDI et al., 2017).

A IL-1 compreende uma família de 11 citocinas de relevante resposta imune da mucosa gástrica frente a patógenos. Dois membros dessa família, a IL-1 $\beta$  e a IL-18 tem a capacidade de recrutar células imunes inatas, promover respostas imunes adaptativas diretas e modular a homeostase tecidual (TU et al., 2008; LOPETUSO et al., 2013). A IL-1 $\beta$  está associada a um alto grau de inflamação da mucosa gástrica, atuando por meio de retroalimentação positiva para induzir a expressão de IL-8 (citocina envolvida na regulação de NF $\kappa$ B). A IL-8 favorece o recrutamento, influxo e ativação de neutrófilos na mucosa gástrica com produção massiva de EROs e potencialização da via de sinalização do NF- $\kappa$ B (WATANABE et al., 1997; TRAN et al., 2017).

A IL-6 estimula o surgimento de tumores na região gástrica devido a capacidade de ativar a sinalização da via STAT3 (controla proliferação e sobrevivência), um impulsionador da tumorigênese associada à inflamação. Ela se liga aos receptores gp130, que regula diretamente as alterações das células epiteliais gástricas associadas ao câncer e seus níveis elevados ativam neutrófilos, monócitos e linfócitos durante eventos inflamatório na fase aguda com aumento de secreção de enzimas lisossômicas e metabólitos tóxicos que ajudam na manutenção e severidade

das úlceras pépticas (JUDD et al., 2006; ERNST et al., 2008; BOCKERSTETT; DIPAOLO, 2017).

O TNF- $\alpha$  pode estimular a expressão de ICAM-1, uma molécula de adesão de leucócitos ao endotélio promovendo a diapedese para locais inflamados em células endoteliais vasculares (NIU et al., 2016). Também apresenta a capacidade de estimular a expressão de LFA-1, uma molécula de adesão em leucócitos (EAMLAMNAM et al, 2006). Além de causar aumento de permeabilidade e edema vascular, o TNF- $\alpha$ , desencadeia também a expressão da COX-2, potencializando efeitos inflamatórios (PAWLIK et al., 2016).

A IL-10 é secretada por monócitos, macrófagos, células do perfil Th1, Th2, Treg e linfócitos B e sua produção aumenta após o início da inflamação, reduzindo a inflamação gástrica por meio da inibição da retroalimentação do TNF- $\alpha$  por monócitos e macrófagos com consequente diminuição das inflamações do tecido gástrico (EAMLAMNAM et al, 2006; NIU et al., 2016).

As PGs, particularmente a PGE<sub>2</sub>, protegem a mucosa gástrica de vários agentes irritantes por meio de mecanismos que aumentam a produção de muco e fluxo sanguíneo nas mucosas, além de inibir a produção do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por macrófagos e inibir a adesão e quimiotaxia de neutrófilos (EAMLAMNAM et al, 2006; WANG et al., 2018).

### **2.2.2.3.5 Fatores agressores da mucosa gástrica**

#### **2.2.2.3.5.1 Etanol**

O etanol é um dos principais agentes agressores exógenos da mucosa gástrica, age de maneira local e sistêmica, promovendo instabilidade em todo sistema defensivo da mucosa gástrica (LI et al., 2000; BOUTEMINE et al., 2018). As lesões induzidas pelo etanol estão intimamente ligadas à infiltração de mastócitos na mucosa gástrica que, sob estímulo de interleucinas pró-inflamatórias, são degranulados e liberam substâncias quimiotáticas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos que, por sua vez, liberam EROs do seu interior para a mucosa já lesionada. O acúmulo de EROs causam estresse oxidativo nos componentes celulares, desestabilização da camada de muco e íons bicarbonato, degranulação de mastócitos, diminuição da síntese e secreção de prostaglandinas citoprotetoras (PGE<sub>2</sub> e PGI) e induz alterações

na expressão de interleucinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) que resulta em apoptose das células epiteliais gástricas (BOEING et al., 2016; YUN et al., 2017; HUI; FANGYU, 2017).

O etanol provoca isquemia nos pequenos vasos da mucosa gástrica promovendo o estresse oxidativo que, juntamente com a redução dos níveis do sistema antioxidante endógeno (glutathiona, superóxido dismutase e catalase), aumenta a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados gerando aldeídos altamente reativos, como o 4-hidroxinonal (HNE) e principalmente o malondialdeído (MDA) (LI et al., 2015; BOUTEMINE et al., 2018).

O etanol difunde-se pela camada de fosfolípidios e muco da mucosa gástrica desestabilizando-a com consequente retrodifusão dos H<sup>+</sup>, diminuição de produção e secreção de muco, bicarbonato e fluxo sanguíneo gástrico, resultando na formação de úlceras gástricas graves com presença de infiltração celular, hemorragia sub-epitelial e edema na camada submucosa (BOEING et al., 2016; BOUTEMINE et al., 2018; DA SILVA et al., 2018).

O etanol também age de modo sistêmico, penetrando rapidamente na mucosa gástrica e na corrente sanguínea é convertido a acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase, diminuindo os níveis dos sistemas antioxidantes e liberação de radicais livres de hidroperóxidos e ânion superóxido. Esses radicais livres causam um aumento no estresse oxidativo nos tecidos e dos níveis de malondialdeído (MDA), um marcador de aumento da peroxidação lipídica. Em geral, o efeito deletério induzido pelo etanol pode se manifestar diretamente via geração de metabólitos reativos ou indiretamente via ativação de outros mecanismos que finalmente desencadeiam o dano oxidativo (ZAKARIA et al., 2016).

#### **2.2.2.3.5.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)**

O uso contínuo de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) é considerado um importante agente causador de distúrbios gastrintestinais de acordo com o tipo de medicamento, a frequência de uso, a dose e fatores idiopáticos (DRINI, 2017).

Os AINEs responsáveis pela injúria gástrica podem apresentar uma ação local ou sistêmica. Em contato com o pH neutro da célula epitelial, a molécula do fármaco se ioniza e libera metabólitos lesivos, causando retrodifusão de íons H<sup>+</sup> e formação de lesões superficiais agudas na mucosa do estômago, a perda da integridade da

mucosa é seguida pela reação tecidual amplificada pelo conteúdo luminal, como ácido, pepsina, alimento, bile e *H. pylori* (LANAS et al., 2003; LANAS; CHAN, 2017).

A inibição sistêmica das prostaglandinas deriva da COX-1 e acarreta diminuição dos níveis de PGs. Esta condição diminui a secreção de muco e bicarbonato, inibe a proliferação celular e diminui o fluxo sanguíneo da mucosa, que são essenciais para a manutenção da sua integridade (BHALA et al., 2013; LANAS; CHAN, 2017).

Os AINES exercem sua atividade por meio bloqueio das isoformas da enzima COX-1 e COX-2, reduzindo biossíntese de prostanóides pela via do ácido araquidônico (AA) e conseqüentemente os sintomas dos processos inflamatórios (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; DRINI, 2017; ATHAYDES et al., 2018).

A isoforma COX-1 localiza-se na maioria das células (endoteliais, epiteliais do TGI e plaquetas), tendo sua produção contínua, enquanto que isoforma COX-2 além de ter ação constitutiva, também é induzida em processos inflamatórios e delimitam-se ao local da inflamação (FERREIRA; MONCADA, 1971; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; BHATTACHARYYA et al., 2014; DRINI, 2017).

A inibição da COX gástrica limita a secreção de PGs e a manutenção da integridade da mucosa gástrica, secreção de muco e fluxo sanguíneo da mucosa, acarretando em maior adesão leucocitária ao endotélio, infiltração neutrofílica e desencadeamento do estresse oxidativo (DRINI, 2017), caracterizado pela produção excessiva de EROs, e desbalanceamento dos níveis de antioxidantes. As EROs promovem maior oxidação de DNA e proteínas assim como a peroxidação lipídica, que têm um efeito destruidor sobre a integridade dos tecidos biológicos, mediando a lesão gástrica, bem como o processo inflamatório (LEE et al., 2017; ATHAYDES et al., 2018).

Portanto, a inibição da prostaglandina derivada da COX, o dano vascular e os efeitos tópicos são os principais mecanismos envolvidos na indução da úlcera pelos AINEs (DRINI, 2017; LANAS; CHAN, 2017).

### 2.2.2.3.5.3 Estresse e tabagismo

A intersecção do estilo de vida com doenças do TGI é de ampla importância em sua gênese, uma vez que fatores psicossociais e ambientais podem promover, ou facilitar, o surgimento dessas doenças (BHATIA; TANDON, 2005). Nessa perspectiva, fatores emocionais (estresse) e maus hábitos (tabagismo, uso contínuo de anti-inflamatórios não esteroidais e ingestão de álcool) são considerados algumas das principais causas de úlcera péptica (DEDING ET AL., 2016. TANYELI et al., 2017).

As lesões gástricas induzidas pelo estresse reduzem os níveis de GSH, a síntese e secreção de prostaglandinas e de muco, elevam os níveis de peroxidação lipídica no tecido gástrico e induzem liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) (LYLE et al., 2009), bem como o NF- $\kappa$ B, que é estimulado rapidamente e de forma contínua (YE et al., 2013; TANYELI et al., 2017).

Em condições de estresse, o sistema simpático adrenomedular é rapidamente estimulado, reduzindo o fluxo sanguíneo para a mucosa gástrica, o que leva à hipóxia e isquemia local (YE et al., 2013). A condição de hipóxia/isquemia é seguida de uma acentuada resposta inflamatória da mucosa gástrica, o que contribui substancialmente para a necrose epitelial e a formação de erosão hemorrágica (HAMAGUCHI ET AL., 2001; YE et al., 2013).

As úlceras induzidas em condições de estresse estimula a liberação de catecolaminas, cortisol e ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (LANDEIRA-FERNANDEZ, 2004). Após ativação, o eixo HPA associa-se à desregulação dos hormônios gástricos, geração de radicais livres e aumento do estresse oxidativo na mucosa gástrica (ZHEN-BIN et al., 2006). O cortisol aumentado regula positivamente a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 pelos macrófagos (RENS et al., 1992; ELSHAZLY et al., 2018).

A prática do tabagismo é um dos hábitos mais difundidos mundialmente e está relacionada às úlceras gástricas (LAZAAR et al., 2015). Estudos sugerem que a sua fumaça modula positivamente agente agressores como a secreção ácida gástrica e de pepsina, além de promover efeitos pró-inflamatórios com recrutamento neutrofílico e produção de EROs. Entretanto sugere-se que a fumaça do cigarro aumenta a secreção de ácido e pepsina, radicais livres e infiltração de neutrófilos e liberação de grelina na circulação (que atua estimulando a liberação do hormônio gastrina e a secreção de ácido gástrico) ao mesmo tempo que reduz fatores protetores como fluxo

sanguíneo, secreção de muco, PGs e fatores de renovação e cicatrização celular (LAZAAR et al., 2015; NOBLE, 2017).

#### **2.2.2.3.5.4 *Helicobacter pylori***

É uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo e está presente em mais de 50% da população mundial e cerca de 10% das infecções por *H. pylori* estão associadas à úlceras pépticas e 1 a 3% evoluem para câncer gástrico (SCHUBERT, 2017).

A vulnerabilidade ao desenvolvimento de quadros mais graves da doença depende da relação conjunta entre fatores ambientais, genéticos e bacterianos (PEEK; CRABTREE, 2006; SCHUBERT, 2017; TRAN et al., 2017).

O bacilo *H. pylori* tem intrínseca atividade de urease, conferindo-o a capacidade de catalisar a hidrólise da ureia e produzir amônia e CO<sub>2</sub>, o que leva a neutralização do ácido, facilitando sua sobrevivência nas condições inóspitas do lúmen gástrico (WOODS; CAREY, 2017), assim como também estimula processos inflamatórios em resposta à sua infecção, principalmente reflexo de sobrevivência das células epiteliais e produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 $\beta$  e IL-18, servindo como marcadores em potencial para essa infecção (TU et al., 2008; HITZLER et al., 2012 TRAN et al., 2017).

Aliado ao fator de imunomodulação, *H. pylori* também inibe a secreção ácida gástrica por vários outros mecanismos, como por repressão da atividade da subunidade  $\alpha$ -H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e da ezerina (papel de tráfico de TVs contendo a bomba), rompimento de barreira da camada de muco e bicarbonato, ruptura das junções comunicantes que culminam em apoptose das células epiteliais, dano ao DNA e proliferação e simultaneamente estimula produção de somatostatina, com inibição da liberação de secretagogos como gastrina e histamina (SCHUBERT, 2009; SONNENBERG, 2013; SCUBERT, 2014; SHINDLER-ITSKOVITCH et al., 2018).

Os mecanismos de sinalização desse bacilo podem ser por meio dos receptores da superfície celular ou por meio dos fatores de virulência solúveis, como a citotoxina vacuolizante (VacA), citotoxina associada ao gene A (CagA) que estimulam uma resposta inflamatória aguda com destruição das funções de barreira e ulcerações no epitélio gástrico (SCUBERT, 2014; SHINDLER-ITSKOVITCH et al., 2018).

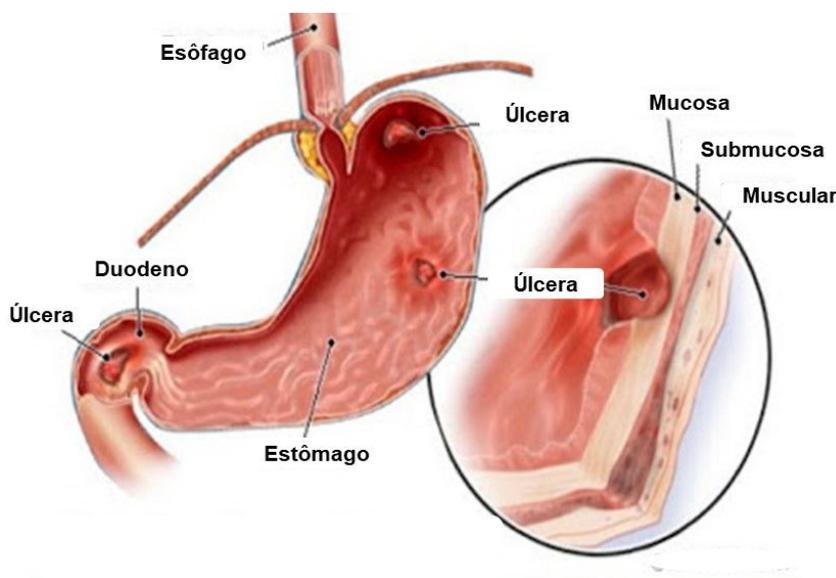
## 2.3 Úlceras pépticas

As úlceras pépticas compreendem um conjunto heterogêneo de distúrbios caracterizados pela presença de inflamação e lesões na mucosa, as quais são de origem multifatorial e complexa (Figura 7) (WOODS; CAREY, 2017), caracterizadas pelo surgimento de pontos necrotizantes e lesões hemorrágicas que acometem o esôfago, estômago ou duodeno, formando uma cavidade circundada por mediadores inflamatórios, que pode se apresentar de forma aguda e crônica (NAJM, 2011; DA SILVA et al., 2018). Elas estão relacionadas ao desequilíbrio entre os agentes protetores da mucosa gástrica (muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico, fatores de crescimento e renovação celular) e os agentes agressores (ácido clorídrico, uso contínuo de AINEs, tabagismo, estresse oxidativo e consumo de etanol) (BOEING et al., 2016). Elas podem ser cicatrizadas porém sempre existirá uma predisposição a recidiva da doença, em decorrência de infecções por *H. pylori* (SIDAHMED et al., 2018; DA SILVA et al., 2018).

A úlcera péptica tende a agravar de acordo com o grau de acometimento da lesão, podendo acometer desde a camada mais superficial da mucosa até as camadas tissulares mais profundas, como camada epitelial e muscular, com comprometimento da funcionalidade e integridade das células lesionadas (TARNAWSKI et al., 2013; LANAS, CHAN, 2017). Quanto a sua localização, pode acometer o esôfago, o estômago ou o duodeno, podendo ser denominada de úlcera esofágica, gástrica e duodenal, respectivamente (MALFERTHEINER et al., 2009; TARNAWSKI et al., 2012; NIETO, 2012; TARNAWSKI et al., 2013; LANAS, CHAN, 2017; ELSHAZLY et al., 2018).

Morfologicamente a úlcera péptica se divide em duas regiões: a margem, que é formada pela mucosa circundante sem área necrosada e com presença de componentes epiteliais, e a base da úlcera, que é caracterizada pelo comprometimento dos tecidos de granulação e conectivo, formado por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais de proliferação (TARNAWSKI et al., 2012; KANGWAN et al., 2014).

**Figura 7.** Representação de regiões anatômicas do trato gastrointestinal acometidas pelas úlceras pépticas



Fonte: adaptado de TARNAWSKI et al., 2012

A mucosa possui um sistema de defesa eficiente contra agentes nocivos composto por uma camada de muco e bicarbonato, sistema antioxidante, fluxo sanguíneo (DA SILVA et al., 2018), grupamentos sulfidrilas, liberação de NO, geração de PGs e fatores de crescimento e renovação celular (YANDRAPU; SAROSEIK 2015; RIBEIRO, 2017). As úlceras pépticas surgem quando o sistema de defesa da mucosa normal é subjugado por agentes nocivos, como HCl, pepsina, bile, isquemia (WOODS; CAREY, 2017), infecção por *H. pylori*, hipergastrinemia, estresse, tabagismo, deficiências nutricionais e uso crônico de AINEs (SEPULVEDA et al., 2016; SIDAHMED et al., 2018; DA SILVA et al., 2018).

O sintoma mais comum é a dor epigástrica em queimação, que aparece 2 a 3 horas após a refeição ou à noite nos indivíduos com úlcera duodenal, e antes da ingestão de alimentos nos indivíduos com úlcera gástrica, o que pode estar associada a falta de apetite e perda de peso. A variação na intensidade ou na distribuição da dor abdominal, bem como o início dos sintomas associados, como náuseas e vômitos, pode ser indicativa de uma complicação da úlcera, o que pode indicar perfuração. A presença de fezes escurecidas ou vômitos cor de borra de café indicam sangramento (NIETO, 2012; VALLE, 2015).

## 2.4 Epidemiologia das úlceras pépticas

A epidemiologia da úlcera péptica apresenta um caráter dinâmico, com difícil precisão da estimativa de prevalência devido a subjetividade dos sintomas e a semelhança clínica de outros tipos de doenças que também apresentam sintomas dispépticos. Os dados epidemiológicos têm como base as estatísticas oriundas de atendimentos clínicos, hospitalizações, cirurgias e óbitos, não havendo total representação do tipo da úlcera (FEITOSA, 2012; HAVENS et al., 2018).

A úlcera péptica acomete cerca de 5 a 10% da população mundial, com incidência de 0,1 a 0,3% ao ano, equivalente a 4 milhões de pessoas. Entretanto esse percentual não é fidedigno considerando que muitos casos são subnotificados, fazendo com que os dados epidemiológicos existentes não corroborem com o real quadro epidemiológico (VENDRAMINI-COSTA et al., 2014. VALLE, 2015; LEOW et al., 2016; LANAS, CHAN, 2017).

As úlceras pépticas acometem mais adultos de meia-idade ou mais velhos, entretanto, também pode ser diagnosticada na juventude (KUMAR et al., 2010; LEOW et al., 2016) Em relação ao sexo, os homens são mais acometidos pelas úlceras pépticas do que as mulheres, na proporção de 3,5:1 para úlceras duodenais e 2,5:1 para úlceras gástricas, sendo as mulheres mais acometidas durante ou após a menopausa A úlcera duodenal acomete mais jovens (20-50 anos) enquanto que a úlcera gástrica é diagnosticada mais em idoso (a partir dos 55 anos). Nas últimas décadas foi observado uma redução na incidência de úlceras duodenais, porém a incidência de úlceras gástricas permaneceu quase inalterada (KUMAR et al., 2010; LANAS, CHAN, 2017).

As úlceras pépticas têm como principais complicações o sangramento, perfuração ou obstrução da saída gástrica, sendo que em 50% dos indivíduos, o sangramento pode ocorrer sem nenhum sintoma de alerta. As internações hospitalares têm diminuído mundialmente, porém a taxa de letalidade continua estável em 5-10%, e dependendo de agravantes como idade e comorbidade, a mortalidade pode alcançar 20% desses indivíduos (LANAS., et al., 2011; MIN; MIN 2018).

Estudos em países da América latina identificaram que a infecção pelo *H. Pylori*, está presente em úlceras duodenais e gástricas, com prevalência de 74,3% e 55,4, respectivamente. Em países desenvolvidos como os Estados Unidos, a relação entre úlcera e *H. pylori* tem diminuído, ao passo que úlceras relacionadas ao uso

crônico de AINES mantêm-se com taxas elevadas, com variação de 9 a 30% para úlceras gástricas e para o uso crônico de AINEs, a prevalência de úlceras gástricas varia de 9% a 31%, e de úlceras duodenais pode chegar a 19% (KUMAR et al., 2010; BERNARDO et al., 2017; MIN; MIN, 2018).

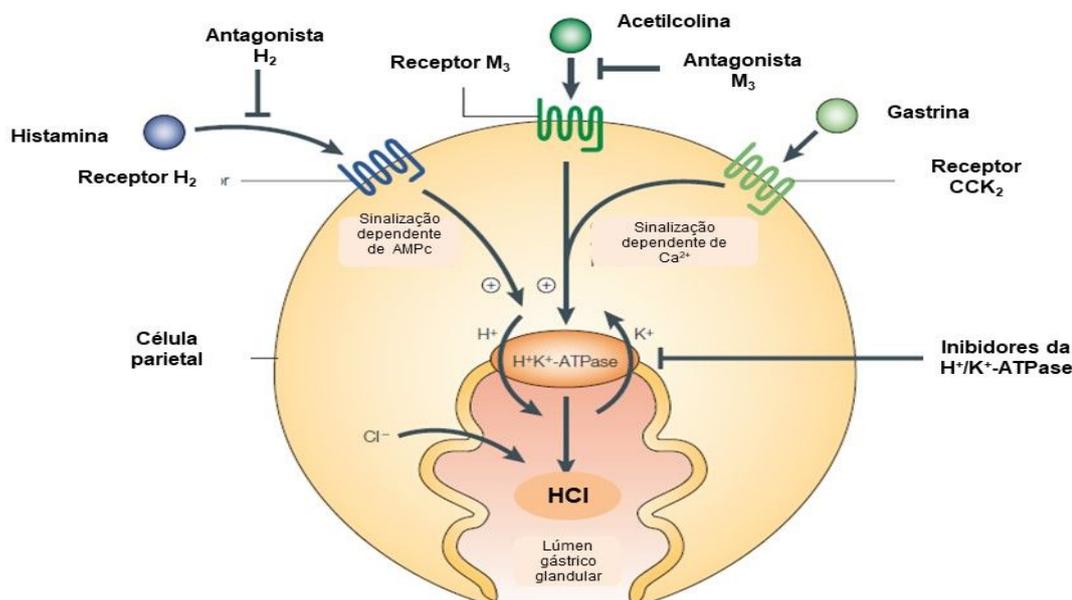
No Brasil, a escassez de dados atuais sobre a prevalência de úlceras pépticas configura uma imprecisão a cerca da realidade efetiva. Um dos estudos mais recentes desenvolvido por Oliveira et al 2015, demonstrou que nos últimos 10 anos a prevalência de úlcera em mulheres e homens foi de 0,1 e 0,2%, respectivamente. A taxa de mortalidade em nível nacional é de 3,0/100 mil habitantes (3,6/100 mil em homens e 2,3/100 mil em mulheres); e essas taxas progridem com a idade. No mesmo estudo, o Nordeste apresentou índices superiores em comparação com índices nacionais, com taxa de mortalidade de 3,8/100 mil habitantes (4,7/100 mil homens e 2,9/100 mil mulheres) (OLIVEIRA et al., 2015).

## **2.5 Terapêutica das úlceras pépticas**

O tratamento das úlceras pépticas tem como objetivo reestabelecer o equilíbrio perdido em decorrência da ação dos fatores citoprotetores frente aos fatores agressores e tem como principais funções diminuir ou neutralizar a secreção ácida e/ou estimular o sistema de citoproteção gástrica (Figura 8) (FEITOSA, 2012; BOEING et al., 2016).

Durante um longo período de tempo, o único tratamento disponível para as úlceras pépticas era cirúrgico com a remoção do nervo vago, um método invasivo que acarretava em grande número de mortalidade. Posteriormente como alternativa terapêutica, iniciou-se o uso de agentes capazes de inibir diretamente a secreção ácida por meio de reação de neutralização, a exemplo dos antiácidos, medicamentos de caráter básico que, em contato com a acidez estomacal, reagem e formam sal e água. Entre os antiácidos utilizados na clínica estão o bicarbonato de cálcio ( $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ ), carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) e de magnésio ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) (AWAAD et al., 2013; SURDEA-BLAGA et al., 2016; BOEING et al., 2016).

**Figura 8.** Vias de sinalização da secreção ácida gástrica e seus respectivos alvos farmacológicos.



Fonte: Adaptado de OLBE et al., 2003.

A estimulação da secreção ácida gástrica ocorre por meio de três vias distintas, a neuronal (mediada pela acetilcolina em seu receptor muscarínico – M3), a parácrina (mediada pela histamina em seu receptor histamínico do tipo 2 – H2) e a endócrina (mediada pela gastrina em seus receptores de colecistocinana do tipo 2 – CCK2)

O efeito local e instantâneo dos antiácidos promove alívio imediato, porém de modo paliativo, já que não agem diretamente na causa da doença, ou pelo menos em um dos mecanismos causadores, como a secreção ácida gástrica. Além de efeitos terapêuticos de curta duração, alguns efeitos colaterais inviabilizaram o uso dos antiácidos para o tratamento de úlceras gástricas, sendo usados apenas para aliviar sintomas dispépticos. Dentre os principais efeitos colaterais têm-se as interações farmacocinéticas na absorção, metabolização e excreção, causadas pela mudança do pH estomacal, inativação de enzimas e formação de quelatos não absorvíveis, os quais resultam na constipação ou diarreia, hipercalemia, insuficiência renal, alcalose metabólica e hipermagnesemia (MEJIA; KRAFT, 2009, SCHUBERT., 2014; SINGH; BHIMJI, 2018; PALIWAL et al., 2018).

Uma segunda classe, de medicamentos foi proposta baseada na importância da secreção de acetilcolina pela inervação vagal, os antagonistas dos receptores M<sub>3</sub>. Estes foram usados na tentativa de diminuir a secreção ácida gástrica por meio do

bloqueio de uma de suas vias, a via neuronal, e foram classificados como antissecretórios, e os protótipos usados foram a atropina e a pirenzepina, logo substituídos pela telenzepina. Por apresentar uma grande interação com diferentes tipos de receptores muscarínicos aliada a baixa eficácia, vários efeitos colaterais foram detectados como taquicardia, cefaleia, visão turva, constipação severa e confusão mental. Desta forma, o uso dos antagonistas dos receptores M<sub>3</sub> como agente antiulcerogênico se tornou obsoleto (HOOGERWERF; PASRICHA, 2005; SCHUBERT, 2009; BRAGA, 2011; SCHUBERT, 2014; BOEING et al., 2016).

Isso possibilitou o desenvolvimento de outros medicamentos como os antagonistas dos receptores H<sub>2</sub>, entre os quais cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina. Esses medicamentos ligam-se ao receptor H<sub>2</sub> e impedem a ligação da histamina, bloqueando o estímulo da secreção ácida gástrica, o que leva a redução do volume do suco gástrico e consequentemente da concentração de íons H<sup>+</sup> (WOLFE; SACHS, 2000; HSU et al., 2016; RANG; DALE, 2016).

Uma grande vantagem dessa classe é a segurança de seu uso e sua eficácia, sobretudo na secreção basal noturna, em que a cimetidina consegue inibir cerca de 50% e ranitidina 70% da secreção ácida, respectivamente, porém sua falta de eficácia frente às úlceras recorrentes limita seu uso, sobretudo em tratamentos prolongados (HSU et al., 2016).

Alguns efeitos colaterais também foram observados nessa classe, a exemplo de cefaleia, tontura, dor muscular, prisão de ventre, náusea, alterações hematológicas, galactorréia (em mulheres) e ginecomastia (em homens), sendo esses dois últimos efeitos associados ao uso da cimetidina (STEWART; ACKROYD, 2011; EVANGELISTA, 2013; SCHUBERT, 2014; RANG; DALE 2016).

Na tentativa de aumentar a eficácia, os medicamentos desenvolvidos nos anos 80 tinham como alvo a H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, inibindo a secreção ácida no final de sua cascata. Estruturalmente, os agentes antissecretórios dessa classe são formados por um anel benzimidazol substituído e um anel de piridina ligados por uma cadeia de metilsulfonilo (KANTO et al., 2005; FEITOSA, 2012; NAUNTON et al., 2018; SPECHLER, 2018).

Os inibidores de bomba são bases fracas que se tornam ativas no baixo pH dos canalículos estomacais e formam ligações covalentes com resíduos de cisteínas expostos na subunidade  $\alpha$  da bomba, bloqueando-a. Entre os inibidores de bomba

tem-se o omeprazol, esomeprazol (isômero geométrico do omeprazol), lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol (STEWART; ACKROYD, 2011; BRAGA et al., 2011; SPECHLER, 2018).

Embora sejam a classe mais usada hoje em dia, vários efeitos colaterais foram relatados na clínica, o que dificulta a adesão ao tratamento além de seu uso possibilitar o surgimento de outros distúrbios tais como cefaleia, diarreia, erupções cutâneas, surgimento de demência, osteoporose, infecções entéricas e pólipos gástricos (HAIGH et al., 2003; FOSSMARK et al., 2005; SPECHLER, 2018; NAITO et al., 2018).

Aliado a essa terapia, alguns agentes farmacológicos são capazes de estimular os fatores protetores da mucosa a exemplo dos compostos de bismuto como o sucralfato que, após liberação do metal é capaz de formar géis complexos com o muco, diminuindo sua degradação, limitando a retrodifusão de íons  $H^+$ , além de inibir a ação da pepsina e estimular a secreção de muco,  $HCO_3^-$  e prostaglandinas (JAIN et al., 2007; BRUNTON et al., 2012).

O misoprostol (análogo das PGE e PGI) atua nos receptores de prostaglandinas presentes nas células gástricas e inibe a secreção de ácido, aumentando o fluxo sanguíneo e a secreção de muco e de bicarbonato, entretanto ocasiona diarreias, cólicas abdominais e abortos (JAIN et al., 2007; BRUNTON et al., 2012).

A carbenoxolona é um derivado semissintético do ácido glicirrízino presente nas raízes de *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) e sua ação citoprotetora preserva a integridade da camada de muco pela capacidade de alterar a composição e quantidade de mucina além de estimular a produção, secreção e viscosidade do muco. Não é usada na terapêutica por causa da necessidade de altas doses para conseguir o efeito esperado, além de apresentar alguns efeitos colaterais como: hipertensão, retenção de líquidos e hipocalemia, preconizando seu uso como ferramenta farmacológica (BRUNTON et al., 2012; JOHN et al., 2012; KIM et al., 2015).

Quando a úlcera está associada a infecção por *H. pylori* é necessário fazer uso de associações de medicamentos de diferentes classes, tanto pra combater a infecção, quanto para tratar as complicações causadas pela instalação do bacilo (LANAS; CHAN, 2017; KIM et al., 2019).

O tratamento atual para a erradicação do *H. pylori*, consiste em uma terapia tripla que combina dois antimicrobianos e um inibidor da bomba de prótons (IBPs) e também podem ser utilizados medicamentos citoprotetores no auxílio da terapêutica. Além disso, pode ser utilizada uma terapia tripla com metronidazol em casos de resistência ou alergias provocadas pelo uso de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, compostos bismúticos e tetraciclina ou amoxicilina por duas semanas (MALFERTHEINER et al., 2009; LANAS; CHAN, 2017; KIM et al., 2019).

A terapia clássica inclui o inibidor de bomba associado com amoxicilina e claritromicina ou metronidazol com claritromicina administrados de 7-14 dias (WANG et al., 2017). Entretanto o bacilo *H. pylori* tem desenvolvido mecanismos de resistência a claritromicina, sob essas circunstância foi proposto como terapêutica uma terapia tripla formada por lansoprazol (Inibidor de bomba de prótons), amoxicilina (antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico) e levofloxacino (antimicrobiano pertencentes à classe das quinolonas) que mostrou ter uma menor eficácia que o regime terapêutico clássico (DA SILVA et al., 2016).

As úlceras relacionadas às infecções por *H. pylori* também pode ser tratadas por uma terapia quádrupla (IBP, bismuto, metronidazol e tetraciclina) ou (IBP, claritromicina, amoxicilina e metronidazol), ambos os regimes tem uma taxa de erradicação de mais de 90% (LANAS; CHAN, 2017) e a duração do tratamento varia de 10 a 14 dias, o que pode ocasionar resistência em virtude do uso prolongado (LEE; KIM, 2011; LANAS; CHAN, 2017). Além disso, observa-se que náuseas, dor abdominal, vômito, diarreia, fadiga, dor de cabeça, tonturas e sensações amargas na boca que constituem limitações a esta terapêutica (KIM et al., 2017).

A melhora na qualidade de vida dos portadores de úlceras pépticas é bastante evolutiva, estando intrinsecamente ligada ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Entretanto, limitações como o alto índice de recidiva da doença, a diversidade de efeitos colaterais, interações medicamentosas, alto custo de internações dos indivíduos e acesso limitado aos medicamentos, remetem a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento das úlceras, a exemplo dos produtos naturais, que têm demonstrado uma ampla diversidade de composição química e biologicamente ativa (LI et al., 2015; BOEING et al., 2016).

## 2.6 Produtos naturais

Os produtos naturais são compostos químicos de origem animal, mineral, vegetal e de microrganismos (fungos, bactérias) (DUTRA et al., 2016; WANG et al., 2018). Apresentam uma diversidade de moléculas biologicamente ativas com grande capacidade de se tornarem novas alternativas terapêuticas para o tratamento convencional existente, podendo superar suas limitações, seja de modo individual ou por meio de sinergismo (NEWMAN; CRAGG. 2014; SHEN, 2015; AHN, 2017).

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, em seu território são encontradas cerca de 20% de todas as plantas que se tem conhecimento no mundo, e sua população usa diversas fontes naturais como forma de combater doenças de caráter agudo ou crônico, porém novas pesquisas e tecnologias são necessárias para otimização do uso de fontes naturais como tratamento, como forma de isolar componentes responsáveis pelos efeitos biológicos a fim de minimizar possíveis efeitos colaterais provindos da complexidade dos compostos (HARVEY et al., 2015; DUTRA et al., 2016).

De acordo com dados da literatura cerca de 30% dos medicamentos usados na terapêutica são oriundos de produtos naturais, em especial microrganismos e plantas. Em áreas como a oncologia, o uso de produtos naturais pode chegar a 60% (NEWMAN; CRAGG., 2014; DUTRA et al., 2016; KHAN, 2018).

Os produtos naturais compreendem os metabólitos secundários e possuem estruturas químicas complexas que apresentam múltiplas atividades biológicas. Os metabólitos secundários podem ser caracterizados de acordo com sua via de síntese em diferentes classes, como os alcaloides, flavonoides (SHAO; BAO, 2019), terpenos, esteroides, compostos fenólicos e fenilpropanóides (GUO 2017).

Diversas espécies vegetais e compostos bioativos já foram estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, objetivando investigar possível atividade gastroprotetora, antiulcerogênica, cicatrizante, antidiarreica e anti-inflamatória intestinal. Entre as espécies estudadas tem-se *Syngonanthus arthrotrichus* (BATISTA et al., 2004; BATISTA et al., 2015), *Herissantia crispa* (LIMA, 2008), *Maytenus rígida* (SANTOS, 2008), *Maytenus obtusifolia* (MOTA, 2009), *Praxelis clematidea* (FALCÃO, 2011), *Combretum duarteanum* (LIMA et al., 2013), *Xylopia langsdorffiana* (MONTENEGRO et al., 2014), *Hyptis suaveolens* (JESUS et al., 2013), *Maytenus distichophylla* (CALDAS-FILHO, 2013), *Syngonanthus macrolepis* (BATISTA et al., 2014),

*Syngonanthus bisulcatus* (BATISTA et al., 2013; BATISTA et al., 2015), *Cissampelos sympodialis* EICHL (SALES, 2015), *Syngonanthus arthrotrichus* e *Syngonanthus bisulcatus* (BATISTA et al., 2016), *Maytenus erythroxylon* Reissek (FORMIGA et al., 2017), bem como substâncias de origem vegetal obtidas em escala de síntese como o *p*-cimeno (LEITE, 2014, FORMIGA, 2017), ácido rosmarínico (NASCIMENTO, 2015; FORMIGA, 2017), (-) fenchona (GUEDES, 2018) e hesperetina (SILVA, 2018).

Alguns metabólitos secundários estão sob forma de óleos essenciais, que tem como características a volatilidade e o forte odor. Nesses óleos essenciais são encontradas misturas de substâncias complexas (metabólitos secundários) presentes em diversas concentrações, tais como constituintes os terpenos, os flavonoides, os alcaloides, os glicosídeos e os fenilpropanóides (BAKKALI et al., 2008; SÁ et al., 2014).

Os fenilpropanóides são uma classe de compostos produzidos pelas plantas medicinais e são biossintetizados a partir da fenilalanina via ácido cinâmico. Em sua composição encontra-se um anel benzeno ligado a uma cadeia de 3 átomos de carbono, sendo responsáveis pelos aromas característicos de algumas plantas (SÁ et al., 2014, VANIN, 2016).

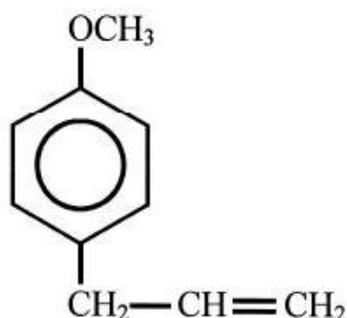
Os fenilpropanóides são metabolizados pela enzima amônia-liase sob o aminoácido fenilalanina e são classificados em ácidos hidroxicinâmicos (ácido cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido 5-hidroxiferúlico e o ácido sinapílico) quando são produzidos a partir de hidroxilações e metilações enzimáticas do ácido cinâmico, ou Aldeídos cinâmicos (eugenol, safrol, chavicol e o estragol) quando a ocorre redução do grupo funcional ácido carboxílico da fenilalanina, fornecendo o aldeído correspondentes (SÁ et al., 2014, VANIN, 2016).

## **2.7 Estragol**

É um fenilpropanoide que consiste em um anel de benzeno substituído por um grupo metoxi e um grupo propenil e está presente como constituinte de óleos essenciais de muitas espécies vegetais, como *Ravensara anisata*, *Ocimum basilicum* e *Croton zehntneri*. Estas espécies são amplamente utilizadas tanto na medicina quanto na culinária. Seus óleos essenciais são muito empregados em aromaterapia e também é utilizado como agente aromatizante nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia como conservante (SILVA-ALVES et al., 2013).

O estragol (Figura 9) é um fenilpropanoide com fórmula molecular  $C_{10}H_{12}O$ , cuja sinonímia são metil-chavicol, p-alilanol, chavicol metiléter, 4-metoxialilbenzeno (R&D CHEMICALS, 2017).

**Figura 9.** Estrutura química do estragol



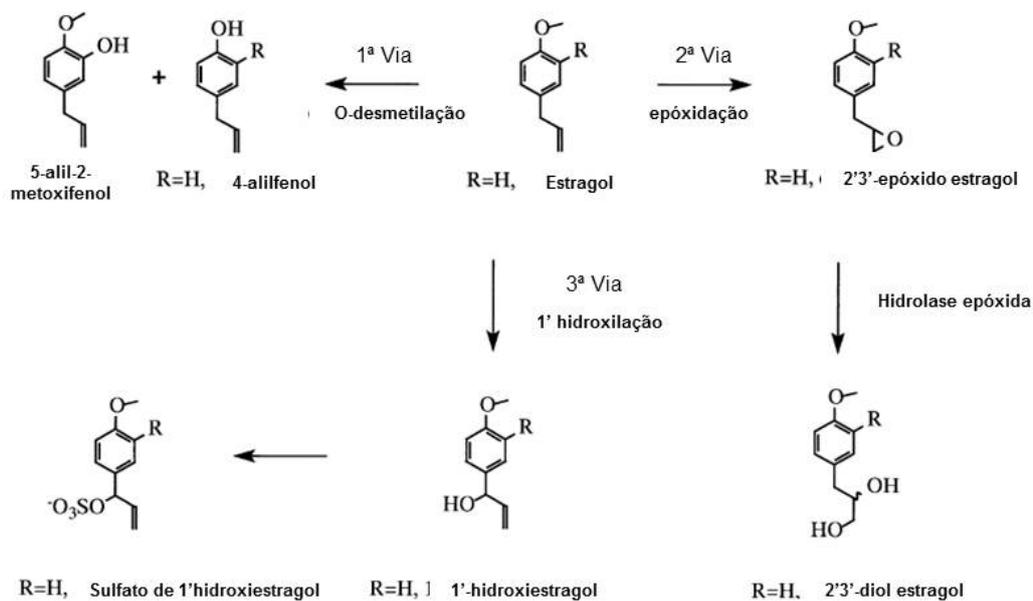
Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8815#section=Top>

O estragol possui várias atividades biológicas descritas na literatura, entre as quais atividade antioxidante e antimicrobiana (FRIEDMAN et al., 2002; MORAIS et al., 2006), ansiolítica (COSENTINO ET AL., 2004), contrátil do músculo esquelético (ALBURQUEQUE et al, 1995) relaxante do músculo visceral (COELHO-SE-SOUZA et al, 1997; SOARES et al, 2007) e anti-inflamatória nas doses de 3-30 mg/kg (PONTE et al., 2012). Apresenta DL50 de 2800 mg/kg para ratos e 2250 mg/kg para camundongos (SILVA-ALVES et al, 2013).

Estudos farmacocinéticos afirmam que o estragol possui rápida absorção por via oral e sua metabolização é dependente de dose, sendo que em baixas doses o radical metóxi é metabolizado e em altas doses são necessárias oxidações na cadeia lateral (SMITH et al., 2002).

O estragol apresenta três vias de metabolização (Figura 10). A primeira é pela via de O-desmetilação, a qual favorece a formação de um metabólito que pode ser excretado com ácido glicurônico sendo considerada a principal via quando ingerido em baixas doses; a segunda via é da epoxidação, a qual é conduzida pela enzima hidrolase epóxida e a terceira via é pela 1'hidroxilação, sendo considerada uma sinalização tóxica do estragol em altas doses, de caráter hepatotóxico por formar o metabólito tóxico sulfato de 1'hidrociestragol (SMITH et al., 2002).

**Figura 10.** Vias de metabolização do estragol



Fonte: adaptado de Smith et al., 2002.

# *OBJETIVOS*

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar a atividade gastroprotetora do estragol em modelos animais que mimetizam a úlcera gástrica no homem.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- ❖ Realizar estudo comportamental por meio da toxicidade aguda e estimar a dose letal 50% (DL50) do estragol;
- ❖ Avaliar a atividade gastroprotetora do estragol em modelos clássicos de indução aguda de úlceras gástricas por agentes lesivos (etanol, estresse, anti-inflamatório não-esteroidal e contensão do suco gástrico);
- ❖ Realizar as análises histológicas e imunohistoquímico a partir do modelo de úlceras gástricas induzida por etanol;
- ❖ Avaliar o efeito da administração oral e intraduodenal do estragol sobre os parâmetros da secreção gástrica (pH, concentração de íons H<sup>+</sup> e volume do suco gástrico);
- ❖ Elucidar os prováveis mecanismos de ação relacionados a atividade gastroprotetora frente ao efeito citoprotetor (grupamentos sulfidríla, óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP, muco e prostaglandinas), efeito antioxidante (GSH, MPO e MDA) e imunorregulatório (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10).

*MATERIAL E*

*MÉTODOS*

## **4.0 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Local da pesquisa**

Os estudos de investigação da atividade gastroprotetora do estragol foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal (LFTGI), sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leônia Maria Batista, vinculado ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Ativos (PgPNSB/UFPB) e localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM/UFPB) e ao) em parceria com

O Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL) do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) sob responsabilidade das Professoras Dra. Aurigena Antunes de Araujo e Dra. Gerlane Coelho Guerra (doseamentos de citocinas e avaliação do efeito antioxidante);

E o Laboratório de Investigação do Câncer e da Inflamação (LAICI) do Centro de Biociências da UFRN sob a responsabilidade do Prof. Dr. Raimundo Fernandes de Araújo Júnior (imunohistoquímica).

#### **4.1.2 Substância teste**

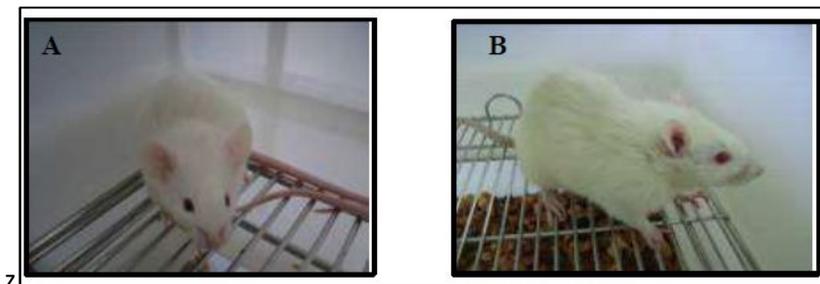
O estragol utilizado nesse estudo foi adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co, U.S.A. com as seguintes especificações: pureza  $\geq 98\%$ , apresenta fórmula molecular  $C_{10}H_{12}O$ , com massa molar de 148.20 g/mol, se configurando em um líquido incolor a temperatura ambiente com ponto de ebulição 215°C e número de CAS 140-67-0.

#### **4.1.3 Animais**

Para realização dos modelos experimentais foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) albinos machos, linhagem Swiss com peso entre 25-35 g e ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, linhagem Wistar pesando entre 180-250g todos procedentes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB). Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por 24h, antes dos ensaios experimentais, sob

temperatura ( $23 \pm 2$  °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Esses animais foram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Presence®) com acesso a água *ad libitum*, sendo distribuídos nos diferentes grupos experimentais, ao acaso (Figura 11).

**Figura 11:** Animais utilizados nos modelos experimentais: camundongo Swiss (*Mus musculus*) (A) e rato Wistar (*Rattus norvegicus*) (B). Fotos pertencentes ao arquivo do LFTGI.



Fonte: Arquivo TGI

Os animais foram submetidos a um jejum com variação de 5 à 24h, a depender do protocolo ao qual foram submetidos e foram distribuídos nos seguintes grupos: controle negativo (tween 80 5%), controle positivo (droga de referência ou ferramenta farmacológica) e grupos testes (Estragol em doses crescentes ou dose mais efetiva). Esses animais foram acomodados em gaiolas com fundo falso para evitar coprofagia, com água *ad libitum* até 1 hora antes dos testes.

Os animais foram eutanasiados por método complementar após anestesia prévia conforme a resolução nº 1.000/2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária com as recomendações da Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA, 2013). Após a realização do protocolo experimental os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 5% (70 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p), e após observação da ausência do reflexo corneal, foi realizado o procedimento de deslocamento cervical. Todos os protocolos experimentais seguiram os princípios internacionais para o estudo com animais de laboratório (ZIMMERNAM, 1983) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/UFPB) sob o registro com nº 134/2017 (Anexo A).

#### 4.1.4 Drogas utilizadas

Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas as seguintes drogas: Acetato de sódio (SIGMA Chemical Co, U.S.A), acetonitrila (SIGMA Chemical Co, U.S.A), (Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinaethanosulfônico (HEPES) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido clorídrico (MERCK, Germany), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), albumina sérica bovina (BSA) (SIGMA Chemical Co, U.S.A), alcian blue (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido acético glacial (SIGMA Chemical Co, U.S.A), ácido tricloroacético (SIGMA Chemical Co, U.S.A), anticorpos para os doseamentos (RD systems), carbenoxolona (SIGMA Chemical Co, U.S.A), carbonato de sódio (MERCK, Germany), cimetidina (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cloreto de potássio (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cloreto de magnésio (SIGMA Chemical Co, U.S.A), cloreto de sódio P.A. (QUIMEX-MERCK, Brasil), etanol (MERCK, Germany), éter etílico (MERCK, Germany), fenolftaleína (RIEDELDE HAËN, Germany), fosfato de sódio monobásico (SIGMA Chemical Co, U.S.A), fosfato de sódio bibásico (SIGMA Chemical Co, U.S.A), fluoreto de sódio (SIGMA Chemical Co, U.S.A), glibenclamida (SIGMA Chemical Co, U.S.A), hidróxido de sódio (QUIMEX-MERCK, Brasil), indometacina (SIGMA Chemical Co, U.S.A), lansoprazol (SIGMA Chemical Co, U.S.A), Metil-Fenilindole (SIGMA Chemical Co, U.S.A), Misoprostol (ALVAC®) Netilmaleimida (SIGMA Chemical Co, U.S.A), N-nitro-L-arginina-metil-éster (SIGMA Chemical Co, U.S.A), omeprazol (SIGMA Chemical Co, U.S.A), piroxicam 20 mg (HEXAL, Brasil), quetamina 5% (VETANARCOL), sacarose (SIGMA Chemical Co, U. S. A), Tampão Tris (Vetec ®), Tampão Trizma (SIGMA Chemical Co, U.S.A) e xilazina 2 % (DORCIPEC).

O estragol foi solubilizado em solução de tween 80 5%. As substâncias utilizadas como controle positivo, carbenoxolona, cimetidina e misoprostol, assim como, os bloqueadores do óxido nítrico (N-nitro-L-arginina-metil-éster - L-NAME), dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) (glibenclamida) e grupamentos sulfidrílicos (N-etilmaleimida - NEM), também foram solubilizadas em solução salina 0,9%.

## 4.2 Métodos

As metodologias empregadas nesse estudo seguiram o fluxograma experimental da Figura 12.

Figura 12. Fluxograma experimental desenvolvido no presente estudo com o estragol.



Legenda: DL50, dose letal para 50%; AINEs, anti-inflamatório não esteroidal; pH, potencial hidrogeniônico; [H<sup>+</sup>], concentração dos íons H<sup>+</sup>; compostos -SHs, compostos sulfidrilas; NO, óxido nítrico, canais K<sub>ATP</sub>, canais de potássio sensíveis ao ATP; PGs, prostaglandinas; GSH, glutatona reduzida; MDA, malonaldeído; MPO, mieloperoxidase; IL-1β, interleucina 1β; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; IL-10, interleucina 10. Fonte: Arquivo LFTGI.

#### **4.2.1 Ensaio toxicológico não clínico agudo de estragol (OECD, 2001)**

O estragol foi submetido ao protocolo de toxicidade aguda por meio do ensaio de triagem comportamental, em busca de possíveis sinais de toxicidade e/ou alterações comportamentais frente ao Sistema nervoso central (SNC) e ao Sistema nervoso autônomo (SNA), seguindo parâmetros descritos por Almeida e colaboradores (1999) (Anexo B). Concomitantemente, foi avaliado o consumo de água e ração, alterações macroscópicas e peso dos órgãos e estimativa da DL50 conforme preconizado pelo guia da OECD nº 423, o qual estabelece categorias de toxicidade de acordo com o *Globally Harmonized Classification System* (OECD, 2001).

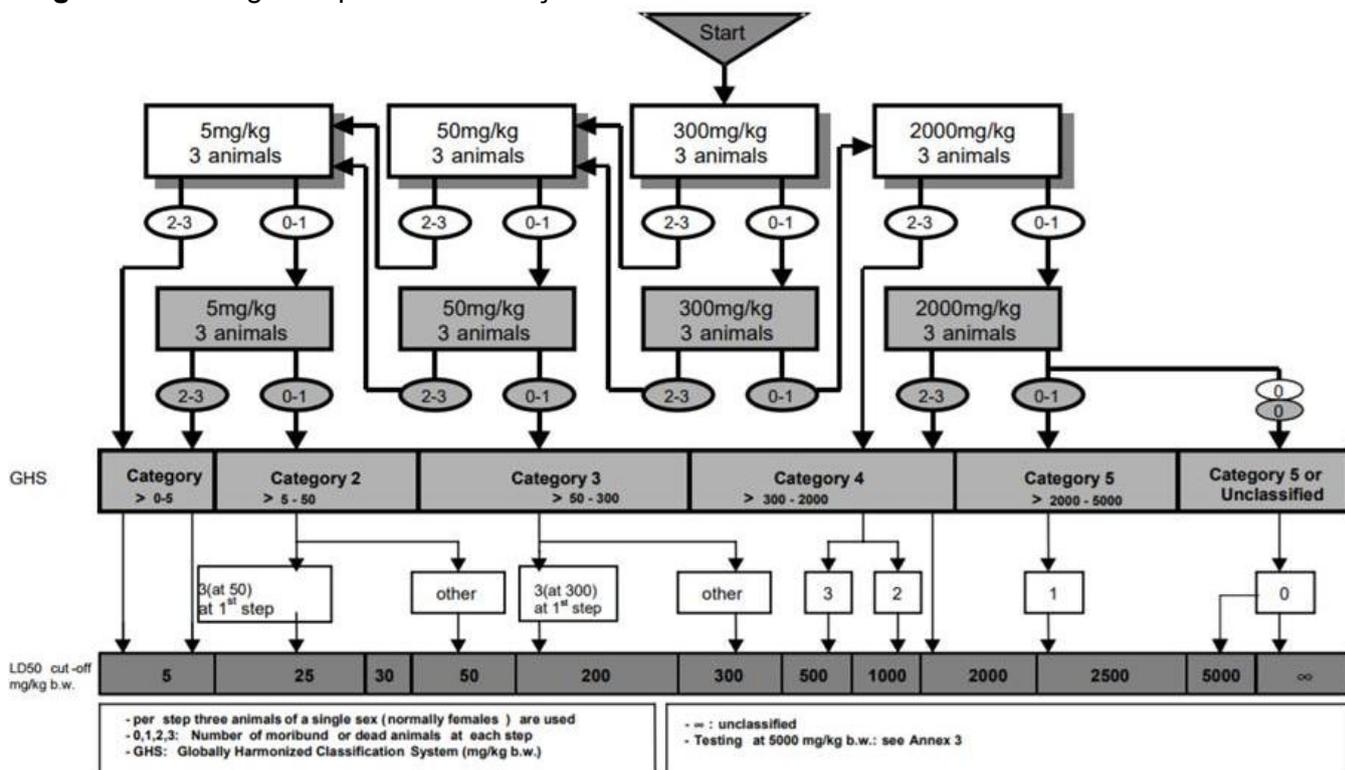
Os animais utilizados para este protocolo foram camundongos swiss machos submetidos a um jejum de 5h e distribuídos em dois grupos (n=3): grupo controle (tween 80 5% - 10 mL/kg) e grupo teste (estragol) nas doses de 300 mg/kg ou 2000 mg/kg, tratados por via oral (v.o). Após o tratamento foram observados os efeitos comportamentais nas primeiras quatro horas, nos intervalos de 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas no primeiro dia, e uma vez ao dia até completar 72 horas sempre comparado ao grupo controle.

Durante 14 dias após a administração do estragol foram avaliados outros parâmetros como o consumo de água e ração, com renovação diária do estoque. A pesagem dos animais foi realizada no 1º dia antes da administração da substância teste e no 14º dia. No 15º dia os animais foram eutanasiados, os órgãos (coração, fígado, baço e rins) foram removidos e avaliados macroscopicamente para verificar sinais de alterações como hipertrofia, presença de tumores ou coloração atípica, em seguida foram pesados em balança analítica para obtenção do índice de órgãos, calculado dividindo o peso em miligrama (mg) do órgão pelo peso em grama (g) do animal.

A avaliação comportamental foi realizada de acordo com Almeida e colaboradores (1999) e tem por finalidade identificar possíveis alterações no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso autônomo (SNA) após a administração da substância teste.

A presença ou não de morte dos animais durante o desenvolvimento do protocolo foi utilizada para estimar a DL<sub>50</sub> do estragol conforme o fluxograma da figura 13.

**Figura 13.** Fluxograma para determinação da DL<sub>50</sub>



Fonte: OECD 2011

#### 4.2.2 Investigação da atividade gastroprotetora

A escolha das doses testadas de estragol teve como base dados da literatura, especialmente de atividade anti-inflamatória (PONTE et al., 2012) em que foi observada atividade na dose de 30 mg/kg, e na DL<sub>50</sub>, desta forma, as doses estabelecidas para a condução do estudo foram de em 31,25, 62,5, 125 e 250 mg/kg.

Na avaliação da atividade gastroprotetora foram utilizados protocolos clássicos para indução aguda de úlcera gástrica, tais como: modelo de etanol, estresse por imobilização e frio, anti-inflamatório não esteroideal (AINEs) e contensão do suco gástrico (ligadura do piloro).

Os mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora foram avaliados frente a atividade antissecretória ou neutralizantes da secreção ácida

gástrica com base em parâmetros bioquímicos do suco gástrico (pH, concentração de  $H^+$  e volume do suco gástrico) a partir do modelo de contensão do suco gástrico. Para os mecanismos citoprotetores foram investigados a possível participação de vias de citoproteção, tais como grupamentos sulfidrilas, óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP, muco e prostaglandinas. Já para os mecanismos antioxidantes foram avaliados por meio de determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), mieloperoxidase (MPO) e malondialdeído (MDA), os mecanismos imunorregulatórios foram avaliados por meio do doseamento das interleucinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10), a partir de fragmentos do tecido de estômagos do protocolo de etanol.

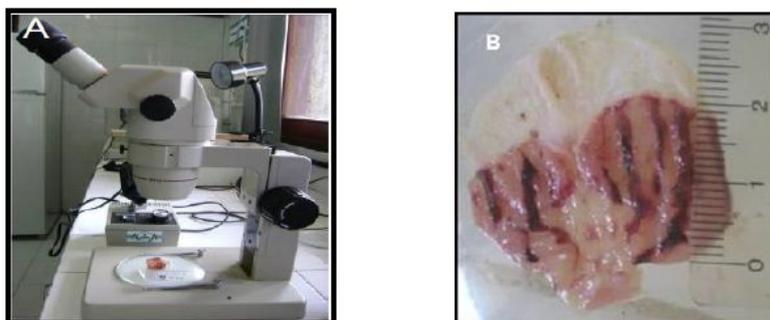
Após a eutanásia dos animais os estômagos foram retirados e abertos ao longo da grande curvatura, as lesões em camundongos foram quantificadas usando uma lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40 (Figura 14) e macroscopicamente quantificadas em scores, de acordo com a severidade da lesão:

- nível 1: pontos hemorrágicos e ulcerações até 1 mm;
- nível 2: ulcerações com 2 mm;
- nível 3: ulcerações profundas com 3 mm ou mais.

Após quantificação das lesões, foi realizado um somatório que correspondeu ao índice de lesão ulcerativa (ILU), servindo de parâmetro para calcular a porcentagem de inibição das lesões gástricas, por meio de resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (d.p), de acordo com a seguinte equação:

$$ILU = \sum (\text{lesões nível 1} \times 1) + (\text{lesões nível 2} \times 2) + (\text{lesões nível 3} \times 3)$$

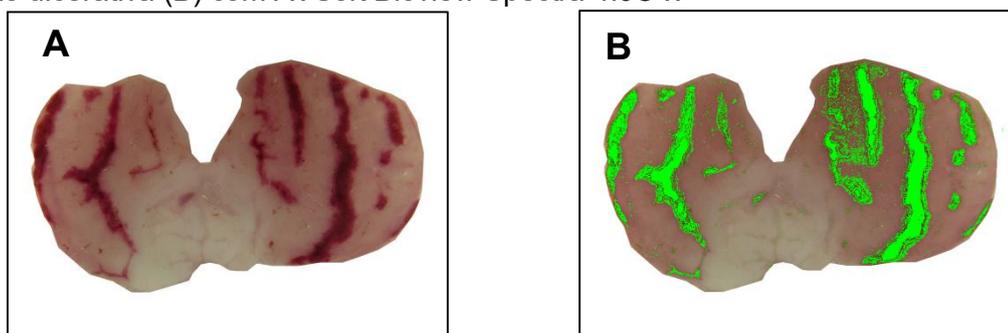
**Figura 14.** Lupa OLYMPUS Optical TL3-SZ40 (A) e estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (B) para determinação do ALU



Fonte: arquivo LFTGI

Nos modelos experimentais realizados em ratos a quantificação das lesões ulcerativas foram expressas em área de lesão ulcerativa (ALU) obtida a partir de fotografia do estômago e análise no software AVSoft Bioview Spectra 4.0® (Figura 15).

**Figura 15.** Estômago de rato ulcerado com etanol absoluto (A e B) e quantificação da área de lesão ulcerativa (B) com AVSoft Bioview Spectra 4.0® x



Fonte: Arquivo LFTGI

#### **4.2.2.1 Modelos de indução aguda de úlcera gástrica**

##### **4.2.2.1.1 Indução de úlceras por etanol absoluto**

Na avaliação da atividade gastroprotetora do estragol foi utilizada a metodologia descrita por to e colaboradores (1991), em que ratos Wistar (n=6) foram submetidos a um jejum de 24h e distribuídos em grupos: controle normal (não recebeu tratamento e foi utilizado como grupo basal para comparações, com os demais grupos, para análise histológica e imunorregulatória bem como para os doseamentos de antioxidantes e de citocinas), controle negativo (pré-tratado com tween 80 5% 10ml/kg), controle positivo (carbenoxolona 100 mg/kg) e estragol nas doses de 31,25, 62,5, 125 e 250 mg/kg, por via oral (gavagem). Uma hora após o pré-tratamento com o estragol nas diferentes doses foi realizada a administração do agente lesivo (etanol absoluto 4mL/kg v.o.). Após 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos foram abertos ao longo da grande curvatura e as lesões ulcerativas foram quantificadas na forma de ALU.

Os fragmentos de tecido foram coletados, pesados, imerso imediatamente em nitrogênio líquido e congelado a -80°C para o doseamento dos níveis de GSH, MPO,

MDA e interleucinas, assim como para análise histológica e imunohistoquímica das doses mais efetivas do estragol.

#### **4.2.2.1.2 Análise histológica**

A partir do modelo de etanol foram coletados fragmentos de tecido dos estômagos com aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> de comprimento, fixados em solução ALFAC (álcool 80% + ácido acético + formol) por um período de 24h e posteriormente preservados em etanol 80% até o processamento histológico.

O material coletado foi armazenado em formol tamponado para melhor conservação dos constituintes celulares e teciduais, interrupção dos efeitos post mortem do tecido, manutenção da sua arquitetura normal e maior resistência para as próximas etapas. Os tecidos foram desidratados em ordens crescentes de concentração de álcool (70, 80, 90 e 100%) e clarificados em xilol. Em seguida, os tecidos foram incorporados em parafina histológica e seccionados a uma espessura de 5µm. A partir dos tecidos seccionados, foram realizadas três colorações: hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e azul de toluidina (ATO), segundo protocolo de Behmer e colaboradores (1976). A análise dos tecidos foi realizada em microscópio óptico, aleatoriamente, sem conhecimento dos grupos analisados pelo examinador.

As lâminas que melhor representarem a arquitetura tecidual foram selecionadas para demonstrar as reais condições histológicas de cada grupo sob devidos tratamentos. As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticom 5.0 MP acoplada a um microscópio óptico. As imagens foram calibradas no programa MOTIC PLUS em definições específicas conforme a objetiva utilizada 10x. A análise histológica foi realizada por um operador capacitado, o qual analisava qualitativamente os parâmetros histológicos.

#### **4.2.2.1.4 Indução de úlceras por estresse (Imobilização e frio)**

Esse protocolo foi realizado conforme descrito por Levine (1971), em que camundongos swiss machos (n=8) foram submetidos a um jejum de 24h e logo após

foram pré-tratados com Tween 80 5% 10 mL/kg (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) um antagonista dos receptores H<sub>2</sub> ou estragol (31,25, 62,5, 125 ou 250 mg/kg) por via oral. Trinta minutos após o tratamento, os camundongos foram imobilizados pelas patas dianteiras e traserias e colocados em contêntores de PVC (9 cm de comprimento x 3,5 cm de diâmetro) e submetidos a uma temperatura de 4 °C durante 3 horas para indução das úlceras gástricas. Após esse tempo os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura e as úlceras foram quantificadas para determinação do índice de lesão ulcerativo (ILU).

#### **4.2.2.1.5 Indução de úlceras por Anti-inflamatório não esteroideal (Piroxicam)**

Esse protocolo foi realizado conforme descrito por Puscas e colaboradores (1997). Camundongos swiss machos (n=8) foram submetidos a um jejum de 24h e logo após foram pré-tratados por via oral com Tween 80 5% 10mL/kg (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg ((controle positivo) um antagonista dos receptores H<sub>2</sub> ou estragol (31,25, 62,5, 125 ou 250 mg/kg). Trinta minutos após o tratamento, os camundongos receberam piroxicam (30 mg/kg – s.c) como agente lesivo, após 4h da indução das lesões os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos ao longo da grande curvatura e as ulcerações foram quantificadas para determinação do índice de lesão ulcerativo (ILU).

#### **4.2.2.1.6 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico (Ligadura do piloro)**

Esse protocolo foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido por Shay e colaboradores (1945) com algumas modificações. Os animais, ratos Wistar machos (n=8), foram submetidos a um jejum de 24h e logo após anestesiados com cloridrato de quetamina 5% (70 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg), por via intramuscular, e após ausência de reflexo, foram submetidos a uma incisão longitudinal abaixo da apófise xifóide para ligadura do piloro (contensão do suco gástrico) e em seguida os estômagos foram internalizados novamente e feito o

procedimento de sutura. Trinta minutos antes cirurgia os animais forma pré-tratados por v.o com Tween 80 5% (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) ou estragol na dose mais efetiva (250 mg/kg). Outra via avaliada foi intraduodenal (i.d), com tratamento feito logo após a ligadura do piloro e utilizando o mesmo número de grupos e animais que o protocolo usado pela via oral. Após 4h da ligadura, os ratos foram eutanasiados, os estômagos retirados e aberto ao longo da grande curvatura para determinação do ILU.

### **4.2.3 Investigação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora do estragol**

#### **4.2.3.1 Mecanismo antissecretório ou neutralizante**

##### **4.2.3.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após ligadura do piloro (v.o/i.d)**

Este protocolo baseou-se na metodologia descrita por Shay e colaboradores (1945). Após a eutanásia dos animais submetidos a ligadura do piloro, os estômagos foram retirados e abertos, o conteúdo gástrico foi coletado em placas de petri e determinado os seguintes parâmetros bioquímicos: potencial hidrogeniônico (pH), concentração dos íons  $H^+$  na secreção gástrica e volume, determinado indiretamente pelo peso do conteúdo gástrico, o qual foi pesado em balança analítica, e logo após calculado o volume do suco gástrico em g/4h, a este conteúdo foi acrescentado 10mL de água destilada e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. A verificação do pH foi feita pelo pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil). Do sobrenadante foram retirados 10 mL e distribuídos em alíquotas de 5 mL em erlenmeyers para o procedimento de titulação do conteúdo e determinação da concentração de íons  $H^+$  que foi expressa em mEq/mL/4h. Em seguida foi realizada a titulação utilizando bureta de vidro graduada, e como agente titulante o hidróxido de sódio (NaOH) 0,01N e fenolftaleína como indicador de viragem.

#### **4.2.3.2 Mecanismos citoprotetores**

##### **4.2.3.2.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidrílicos (SHs) na gastroproteção**

De acordo com protocolo descrito por Matsuda et al. (1999), ratos Wistar machos foram submetidos a jejum de 24h e separados em seis grupos. No pré-tratamento, três grupos receberam por via intraperitoneal solução salina 0,9% (10 mL/kg) e os outros três grupos receberam N-etilmaleimida (NEM) 10 mg/kg, um bloqueador dos grupamentos sulfidrilas, pela mesma via. Trinta minutos após os animais foram tratados por via oral com Tween 80 5% (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo) ou estragol 250 mg/kg.

Uma hora após o tratamento, foi administrado o agente lesivo, etanol absoluto (4 mL/kg), por gavagem. Após 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos removidos, abertos ao longo da grande curvatura e fotografados. A área de lesão ulcerativa (ALU) foi estimada pelo software AVSoft Bioview Spectra 4.0®.

##### **4.2.3.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na gastroproteção**

Para investigar a participação do NO na atividade gastroprotetora do estragol, seguiu-se o protocolo segundo Sikiric e colaboradores (1997), em que ratos Wistar machos foram submetidos a jejum por 24h e separados em seis grupos. No pré-tratamento, três grupos receberam por via intraperitoneal solução salina 0,9% 10mL/kg e os outros três grupos receberam N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) 70mg/kg, um bloqueador da enzima sintase do óxido nítrico, pela mesma via. Trinta minutos após os animais foram tratados por via oral com Tween 80 5% (controle negativo), carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo) ou estragol 250 mg/kg.

Uma hora após o tratamento, foi administrado o agente lesivo, etanol absoluto (4 mL/kg), por gavagem. Após 60 minutos, os animais foram eutanasiados, estômagos removidos, abertos ao longo da grande curvatura e fotografados. A área de lesão ulcerativa (ALU) foi estimada pelo software AVSoft Bioview Spectra 4.0®.

#### **4.2.3.2.3 Avaliação da participação dos canais para íons potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) na gastroproteção**

Para investigar a participação dos  $K_{ATP}$  na atividade gastroprotetora do estragol, foi desenvolvido o protocolo segundo Olinda e colaboradores (2008), em que ratos Wistar machos foram submetidos a jejum por 24h e separados em seis grupos. No pré-tratamento, três grupos receberam por via intraperitoneal solução salina 0,9% 10mL/kg e os outros três grupos receberam glibenclamida 5mg/kg, um bloqueador de  $K_{ATP}$ . Decorridos 30 minutos, os animais foram tratados por via oral com Tween 80 5% (controle negativo) ou estragol 250 mg/kg e por via intraperitoneal com diazóxido (3mg/kg), um ativador de  $K_{ATP}$ . Uma hora após o tratamento, foi administrado o agente lesivo, etanol absoluto (4 mL/kg – v.o). Após 60 minutos, os animais foram eutanasiados, os estômagos removidos, abertos ao longo da grande curvatura e fotografados. A área de lesão ulcerativa (ALU) foi estimada pelo software AVSoft Bioview Spectra 4.0®.

#### **4.2.3.2.4 Determinação da concentração de muco aderido à parede gástrica**

Este protocolo experimental baseou-se no modelo descrito por Rafatullah et al., 1990. Ratos Wistar (n=10) em jejum por 24h foram submetidos ao pré-tratamento com Tween 80 5% 10 mL/kg (controle negativo), carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo) e estragol 250 mg/kg.

Após 60 minutos os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 5% e cloridrato de xilazina 2% nas doses de 70 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular, e em seguida, o abdômen foi aberto e o piloro ligado. Após 4 horas, os ratos foram eutanasiados, os estômagos removidos e abertos ao longo da grande curvatura. A porção glandular do tecido foi separada e em seguida pesada e imersa, por duas horas, em 10 mL de solução de *alcian blue* (fixador de muco). O excesso de *alcian* foi removido lavando o tecido por duas vezes seguidas com 7 mL de solução sacarose 0,25 mol/L por 15 min e posteriormente 7 mL de solução sacarose 0,25 mol/L por 45 minutos. O corante complexado ao muco aderido à parede estomacal foi extraído com 10 mL de cloreto de magnésio 0,5 mol/L, agitando-se intermitentemente por um minuto, a cada 30 min, durante 2 horas. Em seguida os

fragmentos de tecidos foram retirados e as soluções emulsificadas foram armazenadas em refrigerador por aproximadamente 18 horas.

No dia seguinte as amostras foram resuspensas durante um minuto (1 min) e retirada uma alíquota de 4 mL da mistura e adicionados a 4 mL de éter etílico. Em seguida, essas soluções foram submetidas à agitação por aproximadamente 2 minutos. Desta forma, a emulsão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 3600 rpm e o sobrenadante foi descartado. Aliquotas de 200 µL do branco, solução padrão e dos grupos testes foram pipetadas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (modelo MULTISCA, MARCA LABSYSTEMS®) com comprimento de onda de 590 nm. A determinação da concentração de alcian blue foi feita por interpolação em uma curva padrão com várias concentrações de alcian blue. Os resultados foram expressos em mg de alcian blue/g de tecido.

#### **4.2.3.2.5 Avaliação da participação das prostaglandinas na gastroproteção**

A fim de avaliar a participação das prostaglandinas na atividade gastroprotetora do estragol, foi desenvolvido o protocolo segundo Rodrigues et al., 2010. Ratos Wistar machos foram submetidos a jejum de 24h e separados em seis grupos. No pré-tratamento, três grupos receberam por via oral solução salina 0,9% 10 mL/kg e os outros três grupos receberam indometacina (30 mg/kg), um bloqueador de ciclooxigenase (COX). Decorridos 30 minutos, os animais foram tratados por via oral com Tween 80 5% (controle negativo), misoprostol 50 µg/kg (análogo da prostaglandina – controle positivo) ou estragol 250 mg/kg. Uma hora após o tratamento, foi administrado o agente lesivo, etanol absoluto (4 mL/kg), por gavagem. Após 60 minutos, os animais foram eutanasiados, estômagos removidos, abertos ao longo da grande curvatura e fotografados. A área de lesão ulcerativa (ALU) foi estimada pelo software AVSoft Bioview Spectra 4.0®.

### **4.2.3.3 Atividade antioxidante**

#### **4.2.3.3.1 Determinação dos níveis de grupamento sulfidrílico não proteico (GSH)**

Para determinar os níveis de GSH, seguiu-se o protocolo segundo Faure e Lafond (1995). Por meio da reação com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) as amostras de tecidos foram suspensas em EDTA 0.02M 1:10 (v/v) e picotadas com tesoura durante 15 segundos sobre uma placa em contato com gelo. A suspensão resultante foi homogeneizada durante 2 minutos por meio de um homogeneizador. A partir deste homogenato, foram retirados 400 µL e adicionou-se 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético 50%, e centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 15 minutos. Em seguida, foram pipetados 100 µL do sobrenadante resultante em microplaca de 96 poços, e a estes adicionados 200 µL de Tris e 25 µL de DTNB. Esta microplaca foi encubada a temperatura ambiente e após 15 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm. A curva de calibração foi feita com L-glutathiona reduzida. Os valores de GSH das amostras foram calculados pela interpolação dos valores com a curva padrão e expressos em mg de NPHS (grupos de tióis não protéicos)/g tecido.

#### **4.2.3.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)**

No protocolo experimental para doseamento dos níveis de MDA (ESTERBAUER; CHEESEMAN; 1990) as amostras foram suspensas em tampão Trizma® (tris base) 1: 5 (p/v) e cortadas com tesoura durante 15 segundos sobre uma placa arrefecida com gelo. A suspensão resultante foi homogeneizada durante 2 minutos por meio de um de um homogeneizador e foi centrifugada a 2500 x g a 4°C durante 10 minutos. Logo após foram transferidos 150 µL dos sobrenadantes para tubos eppendorfes e adicionado 375 µL do cromogênico (10,3 mM de 1-metil-2-fenilindol) e 113 µL de ácido clorídrico e incubados numa temperatura de 45°C em banho maria por 30 minutos, e novamente centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 5 minutos. Em seguida foram transferidos 300 µL do sobrenadante para um microplaca de 96 poços e realizada a leitura no comprimento de onda 586nm. Considerando que a cada 300 µL do sobrenadante tem-se 0,06 g de tecido, foi necessário realizar ajuste

da concentração, dividindo por 0,06 e, assim, expressar os resultados como nmol de MDA/g de tecido.

#### **4.2.3.3.3 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)**

Para a quantificação da atividade da MPO foi utilizada a metodologia descrita por Krawisz et al. (1984). Os fragmentos de tecido foram homogeneizados no tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (0,5% em tampão fosfato sódico 50 mM, pH 6.0, 1:20 m/v) que tem função de detergente, lisando os grânulos dos neutrófilos que contém a mieloperoxidase liberada na proporção de 400 µL para 15 mg de tecido. O material foi centrifugado a 4500 rpm durante 12 minutos a 4°C e a amostra submetida a um triplo processo de congelamento e descongelamento para facilitar o rompimento das estruturas celulares e conseqüentemente a liberação da enzima, fora isso foram coletados 50 µL do sobrenadante, ao qual adicionou-se 150 µL do tampão de reação (cloridrato de o-dianisidina, tampão fosfato 50 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 33%). A leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda de 460 nm, nos tempos de 0, 30 e 78 segundos e 5 minutos. A curva foi obtida com os resultados nos tempos mencionados e selecionado o tempo de 1 minuto como aquele que melhor representou o evento. Os resultados foram expressos como unidades de mieloperoxidase por grama de tecido.

#### **4.2.3.4 Mecanismo imunorregulatório**

##### **4.2.3.4.1 Determinação das interleucinas**

Os níveis de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatória (IL-10) foram determinados por meio do ensaio imunoenzimático de ELISA (tipo sanduíche), de acordo com Kendall et al., (1983). Os anticorpos de captura de cada interleucina foram utilizados para sensibilizar microplacas de 96 poços de fundo chato. Após 18h, as placas foram lavada com solução tween 20 0,05% (tampão de lavagem) três vezes, bloqueada com uma solução de albumina sérica bovina 1% e lavada novamente por mais três vezes com o tampão de lavagem. Logo após, um macerado do tecido foi preparado em tampão fosfato salino (PBS) na proporção 100 mg de tecido para 600 µL de PBS, homogeneizado e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos a 4°

C. Os sobrenadantes (100 µL) foram adicionados na placa de 96 poços e também foi feita a curva padrão. Essa incubada por 2h e foi realizada a lavagem da placa com tampão de lavagem por três vezes. O anticorpo secundário biotilado (100 µL) foi adicionado em cada poço, seguido de incubação por 2 horas e três lavagens.

A placa foi incubada com estreptavidina durante 20 minutos e lavada três vezes, em seguida adicionado o substrato para revelação (Kit DuoSet® – R&D Systems Catalog – DY999) seguido de incubação por 20 minutos. Decorrido esse tempo, a reação foi interrompida adicionando 50 µL da solução de parada. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram obtidos pela interpolação com a curva padrão e expressos em pg de interleucina/mL.

#### **4.2.3.5 Análise imunohistoquímica dos estômagos submetidos ao modelo de úlceras induzidas por etanol**

A partir do protocolo de etanol, fragmentos de estômago (3 µm) de 5 animais por grupo (3 seções por animal) foram obtidas com um micrótomo e transferidas para lâminas silanizadas (Dako, Glostrup, Denmark), e submetidas a processos de desparafinização e hidratação. Em seguida, as lâminas foram lavadas com 0,3% de Triton X-100 em tampão fosfato, tratadas com peróxido de hidrogênio a 3%, e incubadas overnight a 4 °C com os seguintes anticorpos primários e diluições respectivas: ciclo-oxigenase 2 - COX-2 (1: 600); glutathione peroxidase – GPx (1: 800) e óxido nítrico sintase - iNOS (1: 500) (Santa Cruz Biotechnology, Interprise, Brasil). Depois de lavadas com tampão fosfato, as lâminas foram incubadas com um anticorpo secundário de estreptavidina-HRP-conjugado (Biocare médica, Concord, CA, EUA) durante 30 minutos e a imuno reatividade para COX-2, GPx e iNOS foi realizada por meio de um kit de detecção de base colorimétrica, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (Trek Avidina-HRP etiqueta + Kit de Biocare médica, Dako, EUA). As amostras foram visualizadas em microscópio óptico (Leica DM750, Suíça) com sistema Qwin acoplado a uma câmera (Leica ICC50 HD) com lente objetiva de 400x. A intensidade da imunocoloração foi determinada de forma semi-quantitativa, em que foram contadas as células marcadas da região das lesões (células epiteliais e da mucosa) para a posterior análise. De cada animal foram fotografados 5 campos (área real 327,68 x 245,76 µm) dentro das definições da área de análise e quantificado, pelo

programa AVSoft Bioview® versão 4.0.1, o percentual total de células presentes nessas regiões, totalizando uma área de 1.207.959,552  $\mu\text{m}^2$ .

### **4.3 Análises estatísticas**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (d.p.) ou média  $\pm$  erro padrão (e.p.m.) (doseamentos) para os valores paramétricos, e expressos em mediana (valor mínimo - valor máximo) para dados não-paramétricos. Para análise dos resultados obtidos a partir dos ensaios de toxicidade aguda foi realizado o teste “t” de Student não pareado. Já para os demais resultados farmacológicos foi utilizada a análise de variância de uma via “ANOVA” (dados paramétricos) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não-paramétricos), seguido pelos pós testes de Dunnett e/ou Tukey ou Dunns, respectivamente. O nível de significância mínimo foi de  $p < 0,05$ . Os resultados foram analisados com o software, GraphPad Prism 6.0, San Diego, CA, EUA.

# RESULTADOS

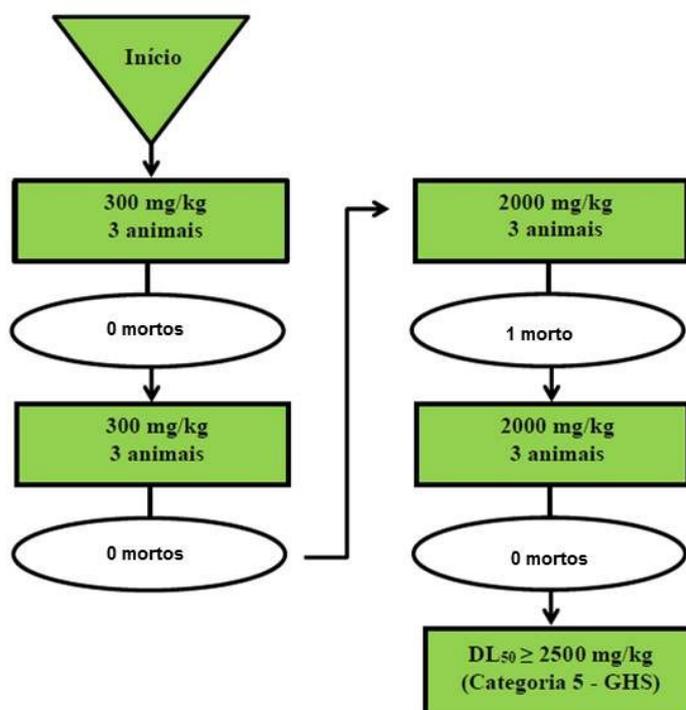
## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio toxicológico não clínico agudo do estragol

Após análise dos dados, não foram observadas alterações comportamentais dos animais tratados com estragol nas doses 300 ou 2000 mg/kg (v.o.) quando comparados ao grupo controle (tween 80 5%).

Não foi verificada morte no grupo de animais (n=3) tratados com estragol (300 mg/kg). Este procedimento foi repetido com a mesma dose, e novamente não houve morte dos animais. O próximo passo foi avaliar o grupo de animais tratados com estragol a 2000 mg/kg, em que foi constatada a morte de um animal. Após repetição do tratamento sob as mesmas condições, não foi observada morte dos animais. Com isto, foi possível estimar que a DL<sub>50</sub> do estragol é maior que 2000 e menor que 5000 mg/kg, se enquadrando na categoria 5 de acordo com Sistema de Classificação Harmonizada Global (GHS), como demonstrado na figura 16.

**Figura 16.** Estimativa da DL<sub>50</sub> do estragol de acordo com o guia 423 da OECD



Com relação a evolução ponderal e ao índice de órgãos não foram observadas alterações promovidas pelo estragol nas doses de 300 ou 2000 mg/kg em comparação ao grupo controle. Entretanto, foram observadas alterações no consumo de água e ração apenas no grupo tratado com estragol na dose de 2000 mg/kg quando comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito da administração oral do estragol na evolução ponderal, índice de órgãos, consumo de água e ração em camundongos Swiss machos

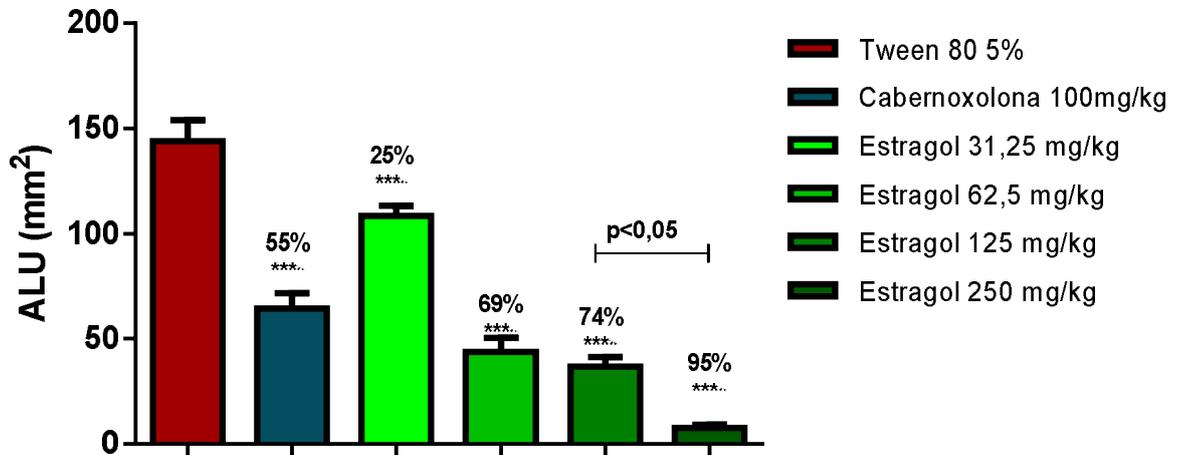
Parâmetros	Tratamentos		
	Tween 80 5%	Estragol 300 mg/kg	Estragol 2000 mg/kg
<b>Evolução ponderal (g)</b>			
Inicial	31,13 ± 2,12	29,75 ± 0,54	28,87 ± 0,99
Final	41,90 ± 2,04	37,93 ± 0,78	31,81 ± 2,74**
<b>Índice dos órgãos</b>			
Fígado	54,16 ± 2,77	49,72 ± 4,34	56,48 ± 2,52
Rins	14,02 ± 1,69	13,92 ± 1,14	14,94 ± 0,54
Baço	4,72 ± 0,95	4,09 ± 0,52	5,69 ± 0,47
Coração	4,95 ± 0,93	5,52 ± 0,51	5,87 ± 0,35
<b>Consumo de ração (g)</b>			
	20,57 ± 1,40	21,08 ± 1,69	12,45 ± 1,68**
<b>Consumo de água (mL)</b>			
	34,68 ± 4,10	33,86 ± 3,44	23,21 ± 1,89**

Os resultados estão expressos como média ± d.p. (n=6). Teste "t" de Student não-pareado comparado ao grupo controle (tween 80 5%), p<0,01. Para avaliação dos órgãos, os valores foram expressos como índice de órgãos que corresponde a divisão do peso dos órgãos (mg) pelo peso dos animais (g).

### 5.2.1 Úlceras gástricas induzidas por etanol

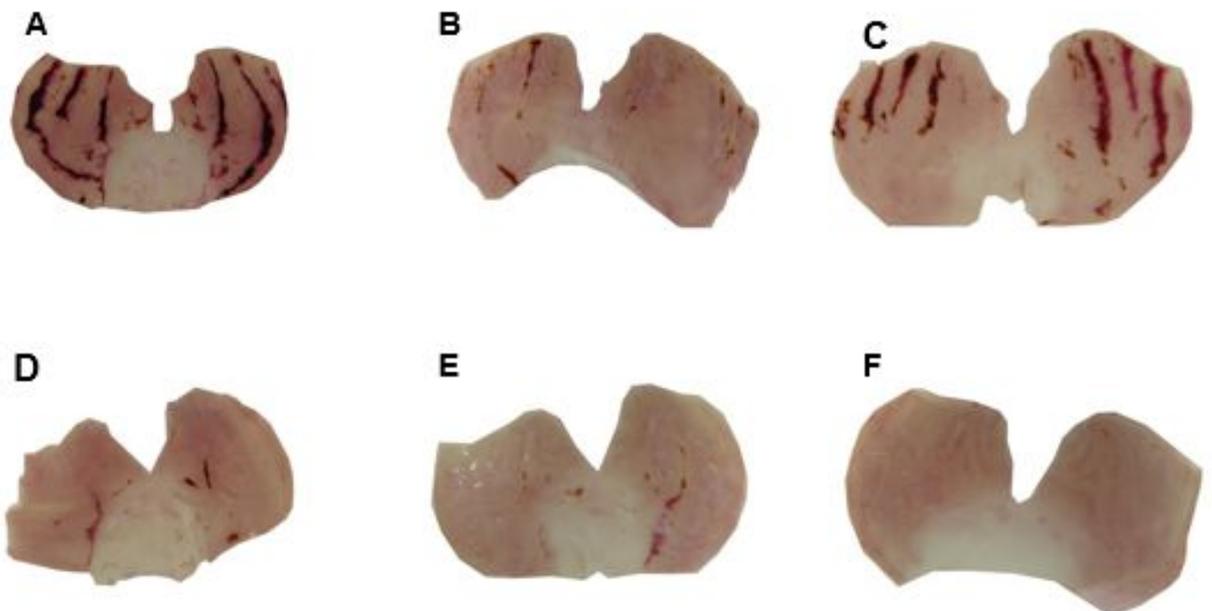
Os resultados obtidos do modelo de úlcera gástrica induzida por etanol demonstram que a administração oral de carbenoxolona (100 mg/kg) ou estragol (31,25, 62,5, 125 e 250 mg/kg) reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) a área de lesão ulcerativa (ALU) em 55 (64,49 ± 5,09), 25 (108,70 ± 4,78) 69 (43,93 ± 3,32), 74 (36,74 ± 2,34) e 95% (7,55 ± 1,58) respectivamente, quando comparado com o grupo controle negativo (Tween 80 5%), 144,2 ± 12,10. Esses resultados estão expressos no Gráfico 1 e ilustrados na Figura 17.

**Gráfico 1:** Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol em úlceras gástricas induzidas pelo etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA)  $F(5,34) = 226,5$ ; seguido do teste de Dunnett e Tukey. \*\*\*  $p < 0,01$ , comparado com o grupo controle negativo (tween 80 5%) ( $n = 6-8$ ). A barra acima dos tratamentos indica a diferença estatística no teste de Tukey. ALU=Área de Lesão Ulcerativa.

**Figura 17.** Aspectos macroscópicos da mucosa gástrica de ratos Wistar pré-tratados (v.o.) com tween 80 5% (A); carbenoxolona 100 mg/kg (B); estragol 31,25 mg/kg (C), 62,5 mg/kg (D), 125 mg/kg (E) e 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol



## **5.2.2 Análise histológica**

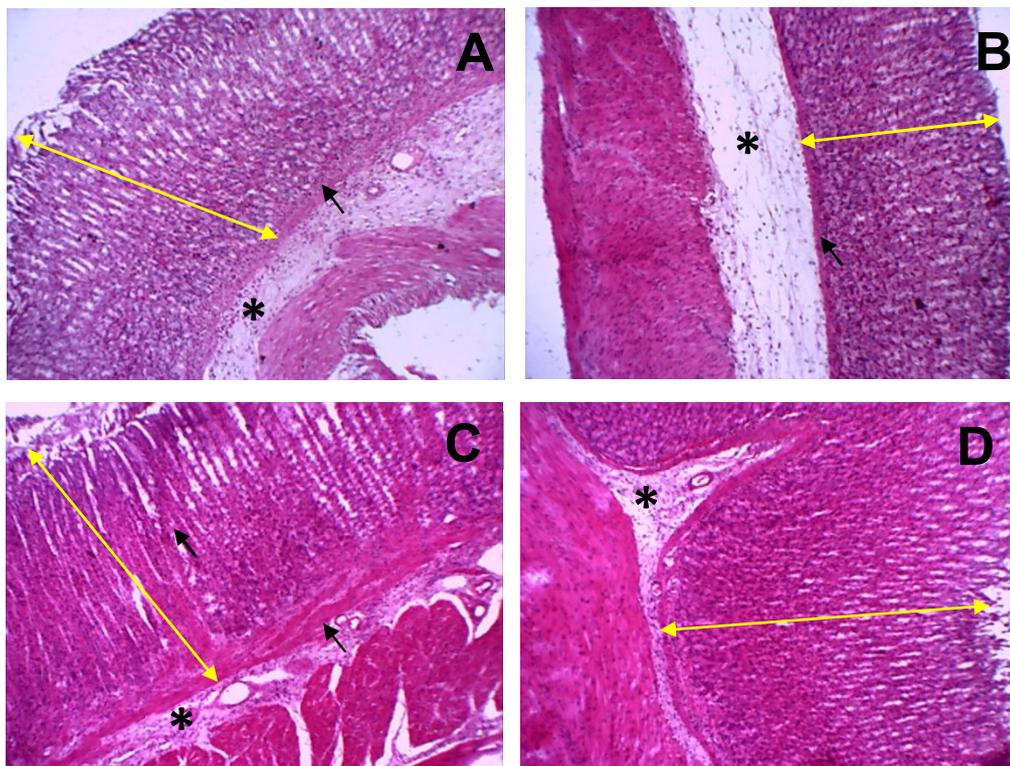
### **5.2.2.1 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)**

Os cortes histológicos de estômago dos grupos experimentais foram analisados inicialmente pela coloração HE. As camadas mucosa e submucosa do grupo normal apresentou conservação dos tecidos e de seus constituintes, porém a camada muscular externa apresentou uma espessura diminuída quando comparado aos demais grupos (figura 18A).

O grupo controle negativo apresentou perda e destruição de tecido epitelial na camada mucosa, nas criptas e glândulas gástricas, com consequente diminuição da espessura da camada. A muscular da mucosa apresentou-se mais delgada quando comparada ao grupo A. Na camada submucosa os vasos sanguíneos diminuíram em número e em várias regiões desapareceram, ocorrendo também diminuição das fibras colágenas e aparecimento de edema com consequente alargamento da camada. A muscular externa apresentou características normais (figura 18B).

O grupo tratado com carbenoxolona (100 mg/kg) apresentou preservação das camadas mucosa, submucosa e muscular externa. A camada mucosa com as criptas gástricas, glândulas gástricas e muscular da mucosa bem preservadas, a camada submucosa delgada e com presença de vasos sanguíneos e a muscular externa com características normais (figura 18C). No grupo tratado com estragol (250 mg/kg) foi possível identificar preservação dos tecidos na camada mucosa, com conservação das criptas e glândulas gástricas e consequente recuperação da camada com aumento da sua espessura. A muscular da mucosa apresenta constituição normal. Na camada submucosa os vasos sanguíneos estão presentes e as fibras colágenas preservadas com redução do edema. Na muscular externa os tecidos estão preservados sem alteração (figura 18D).

**Figura 18:** Fotomicrografias coradas com HE a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



Fotomicrografias representativas de estômago dos animais dos grupos experimentais: Normal (A), controle negativo (B), controle positivo (C), estragol 250 mg/kg (D). Camada mucosa (seta amarela), muscular da mucosa (seta preta), camada submucosa (asterisco preto). A, B, C, e D – H&E, A.T. x10, 1500µm. Fonte: CARVALHO, 2019.

### 5.2.2.2 Coloração ácido periódico de Schiff (PAS)

Na coloração histológica com ácido periódico de Schiff (PAS), o grupo normal apresentou epitélio de revestimento preservado com presença de muco sobre toda a superfície da mucosa, criptas gástricas e glândulas gástricas na região do istmo (Figura 19A).

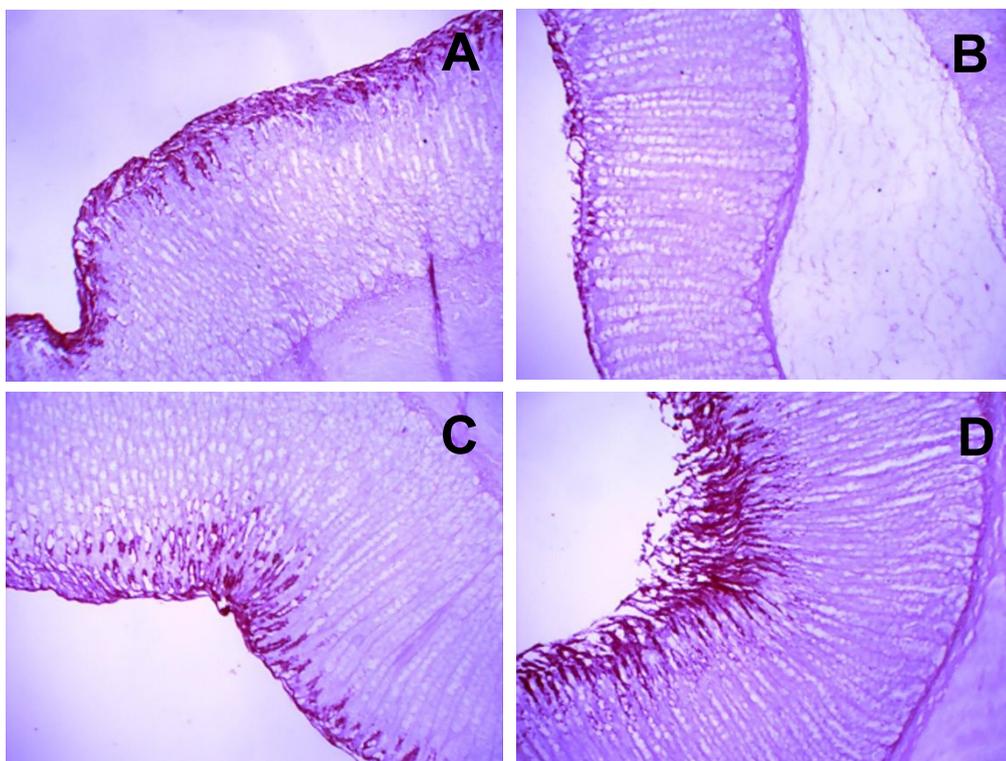
O grupo controle negativo apresentou diminuição da produção de muco observada pela diminuição do depósito de muco sobre a camada mucosa e nas criptas gástricas. A perda do número de células epiteliais na camada mucosa promove redução na produção de muco (figura 19B).

O grupo tratado com carbenoxolona 100 mg/kg apresentou produção de muco protetor da mucosa gástrica normal. Esse muco é produzido pelas células mucosas da superfície, também conhecidas por células de revestimento superficial. Com a

preservação do epitélio de revestimento da mucosa gástrica a produção de muco ocorre normalmente podendo ser analisado pelo depósito de muco observado sobre a camada mucosa e nas criptas gástricas. As células produtoras de muco não apresentaram modificação histológica (figura 19C).

O grupo tratado com estragol 250 mg/kg apresentou reconstituição do epitélio de revestimento superficial e nas criptas gástricas, aumento do número de células mucosas e consequente estímulo na produção de muco observada pelo aumento do depósito de muco sobre a camada mucosa, nas criptas gástricas e na porção inicial das glândulas gástricas, istmo (Figura 19D).

**Figura 19:** Fotomicrografias coradas com PAS a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



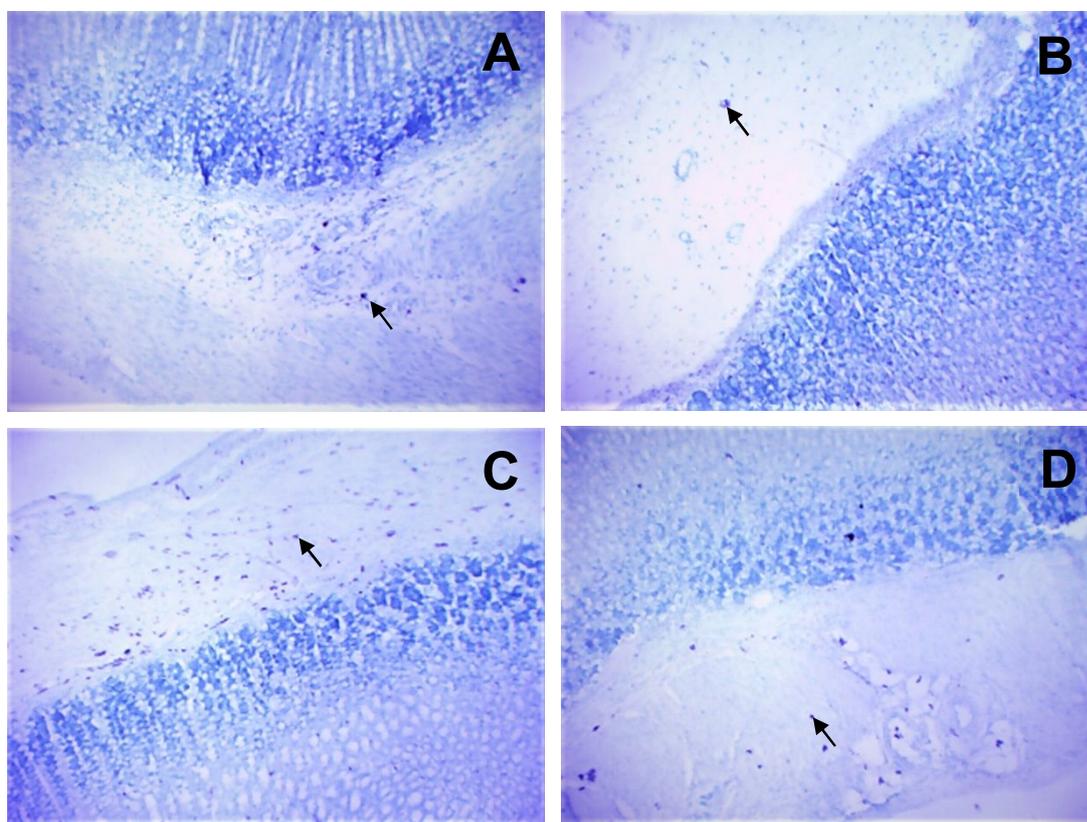
Fotomicrografias representativas de estômago dos animais dos grupos experimentais: grupo normal (A), grupo controle negativo (B), grupo controle positivo (C) e grupo estragol (D). Muco (cor vermelho-púrpura). A, B, C e D – PAS, A.T. x10, 1500 µm. Fonte: CARVALHO, 2019.

### 5.2.2.3 Coloração Azul de Toluidina (ATO)

Nos tecidos corados com ATO observou a concentração dos mastócitos em nível de camada submucosa. O grupo normal (figura 20A) apresentou leve quantidade

de mastócitos, enquanto que no grupo controle negativo (figura 20B), as granulações metacromáticas características de mastócitos diminuíram acentuadamente indicando diminuição no número de mastócitos por degranulação. O grupo tratado com carbenoxolona 100 mg/kg (figura 20C) apresentou acentuada quantidade de mastócitos presentes na camada submucosa pela observação dos grânulos presentes intracelularmente e no grupo tratado com estragol 250 mg/kg (figura 20D) ocorreu reaparecimento de mastócitos na camada submucosa.

**Figura 20:** Fotomicrografias coradas com ATO a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



Fotomicrografias representativas de estômago dos animais dos grupos experimentais: grupo normal (A), grupo controle negativo (B), grupo controle positivo (C) e grupo estragol 250 mg/kg (D). Mastócitos (cor violeta). A, B, C e D – A.T. x10, 1500 µm. Fonte: CARVALHO, 2019.

### 5.2.3 Úlceras gástricas induzidas pelo estresse (Imobilização e frio)

Os resultados obtidos do modelo de úlcera gástrica induzida por imobilização e frio demonstram que a administração oral de cimetidina (100 mg/kg) ou estragol (31,25, 62,5, 125 e 250 mg/kg) reduziram o índice de lesão ulcerativa (ILU) quando

comparados com o controle negativo em 42, 45, 53 59 e 65%, respectivamente. Esses resultados estão expressos na tabela 2.

**Tabela 2:** Efeito da administração oral da cimetidina e estragol em úlceras gástricas induzidas pelo estresse (Imobilização e frio) em camundongos swiss machos

Tratamentos	Doses	ILU	Inibição (%)
Tween 80 5%	--	196 ± 13,5	-
Cimetidina	100 mg/kg	114 ± 4,5**	42
Estragol	31,2 mg/kg	108 ± 5,7**	45
	62,5 mg/kg	91 ± 7,7***	53
	125 mg/kg	80 ± 2,3***	59
	250 mg/kg	69 ± 7,3***	65

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): F(5,30) = 210,4 seguido do teste de Dunnett: \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001, comparado com o grupo controle (Tween 80 5%) (n=8). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

#### 5.2.4 Úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não esteroidal (Piroxicam)

Os resultados obtidos do modelo de úlcera gástrica induzida por AINEs (Piroxicam) demonstraram que a administração oral de cimetidina (100 mg/kg) ou estragol (31,25, 62,5, 125 e 250 mg/kg) reduziram o índice de lesão ulcerativa (ILU) quando comparados com o controle negativo em 42, 45, 53 59 e 65%, respectivamente. Esses resultados estão expressos na tabela 3.

**Tabela 3:** Efeito da administração oral da cimetidina e estragol em úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatório não esteroidal (Piroxicam)

Tratamentos	Doses	ILU	Inibição (%)
Tween 80 5%	--	108 ± 11,3	-
Cimetidina	100 mg/kg	44 ± 9,6***	59
Estragol	31,2 mg/kg	59 ± 8,7***	46
	62,5 mg/kg	57 ± 6,6***	47
	125 mg/kg	48 ± 5,7***	56
	250 mg/kg	39 ± 7,9***	64

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): F(5,36) = 61,7 seguido do teste de Dunnett: \*\*\*p<0,001, comparado ao grupo controle (Tween 80 5%) (n=8). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

## 5.2.5 Úlceras gástricas induzidas por contensão do suco gástrico

Os resultados obtidos a partir do protocolo de úlcera gástrica induzida por contensão do suco gástrico demonstram que a cimetidina (100 mg/kg) ou estragol (250 mg/kg) administrado oralmente reduziram o ILU em 42 e 52%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Quando administrados pela via i.d, a cimetidina (100 mg/kg) e o estragol (250 mg/kg) reduziram o ILU em 42 e 43%, respectivamente, quando comparados ao controle negativo. Esses resultados estão expressos na tabela 4.

**Tabela 4:** Efeito da administração oral e intraduodenal da cimetidina e estragol, em úlceras gástricas induzidas por ligadura do piloro em ratos

Tratamento	Via de administração	Dose (mg/kg)	ILU	Inibição (%)
Tween 80 5%	Oral	-	304,90 ± 19,73	
Cimetidina	Oral	100	175,60 ± 15,29***	42
Estragol	Oral	250	145,40 ± 9,75***	52
Tween 80 5%	Intraduodenal	-	340,90 ± 9,02	
Cimetidina	Intraduodenal	100	194,6 ± 13,81###	42
Estragol	Intraduodenal	250	197,6 ± 6,34 ###	43

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): F(2,25) = 261,10 (v.o.) e F(2,21) = 258,90 (i.d.) seguido do teste de Dunnett: \*\*\*p<0,001 comparado ao grupo tween 80 5% via oral e ###p<0,001 comparado ao grupo tween 80 5% via intraduodenal, (n= 10). ILU= Índice de Lesão Ulcerativo.

## 5.3 Investigações dos mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do estragol

### 5.3.1 Mecanismo antissecretório ou neutralizante

#### 5.3.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos do suco gástrico após contensão do suco gástrico (Ligadura do piloro)

A partir do protocolo de contensão do suco gástrico foram avaliados os parâmetros bioquímicos do conteúdo estomacal de ratos, tais como: pH, concentração

de H<sup>+</sup> e volume do conteúdo gástrico após administração de Tween 80 5%, cimetidina 100 mg/kg ou estragol 250 mg/kg pelas vias oral e intraduodenal.

De acordo com os resultados obtidos em ambas as vias em que foram administrados o estragol não foram observadas alterações no pH nem na concentração de H<sup>+</sup> em comparação com o grupo controle negativo. Por via intraduodenal o estragol reduziu o volume do conteúdo gástrico quando comparado com o grupo controle negativo. Todavia, os grupos tratados com cimetidina (100 mg/kg) independente da via de administração, apresentaram aumento de pH, diminuição da concentração de H<sup>+</sup> e do volume do conteúdo gástrico quando comparado com os controles negativos. Os resultados estão expressos na tabela 5.

**Tabela 5:** Efeito da administração oral e intraduodenal da cimetidina e estragol nos parâmetros do conteúdo gástrico após ligadura do piloro

Tratamento	Via de administração	Dose (mg/kg)	pH	[H <sup>+</sup> ] (mEq/mL/4)	Volume (mL)
Tween 80 5%	Oral	-	3,26 ± 0,42	7,86 ± 1,42	1,59 ± 0,27
Cimetidina	Oral	100	6,23 ± 0,73***	3,32 ± 1,20***	0,92 ± 0,16***
Estragol	Oral	250	2,87 ± 0,35	7,72 ± 1,46	1,81 ± 0,08
Tween 80 5%	Intraduodenal	-	2,56 ± 0,32	9,68 ± 2,04	2,13 ± 0,55
Cimetidina	Intraduodenal	100	4,41 ± 0,45###	3,67 ± 0,47###	1,36 ± 0,29##
Estragol	Intraduodenal	250	2,67 ± 0,26	10,32 ± 1,77	1,39 ± 0,19#

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA): F(2,25) = 110,6, para o pH, F(2,25) = 34,57, para íons H<sup>+</sup> e F(2,16) = 35,94, para volume (v.o.) e F(2,23) = 73,37, para pH, F(2,23) = 41,97, para íons H<sup>+</sup> e F(2,20) = 9,80, para volume (i.d.) seguido do teste de Dunnett: \*\*\* p<0,001 comparado com o grupo tween 80 5% via oral e ### p<0,001, ##p<0,01, #p<0,05 comparado com o grupo tween 80 5% via intraduodenal (n=10).

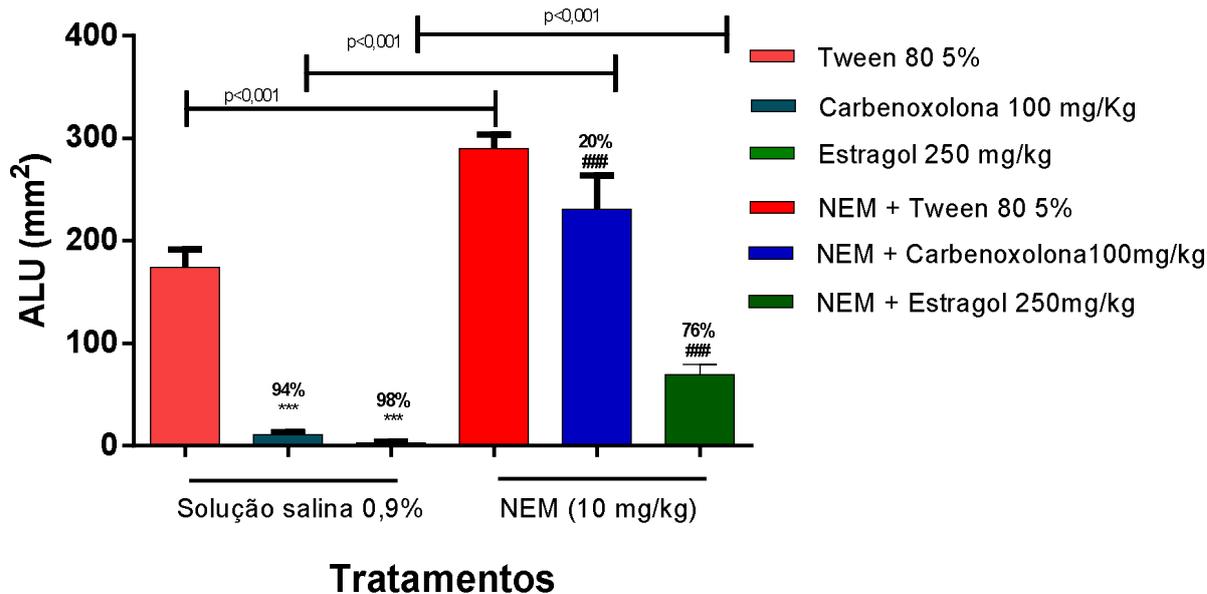
### 5.3.2 Mecanismos citoprotetores

#### 5.3.2.1 Avaliação da participação dos grupamentos sulfidril (SH) na atividade gastroprotetora do estragol

A partir do modelo experimental que investiga a participação dos grupamentos sulfidrilas na gastroproteção exercida pelo estragol, foi observado que nos grupos não bloqueados e tratados v.o com carbenoxolona (100mg/kg) ou estragol (250 mg/kg) ocorreu a redução da ALU em 94 e 98%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Entretanto, nos grupos em que os animais foram pré-tratados

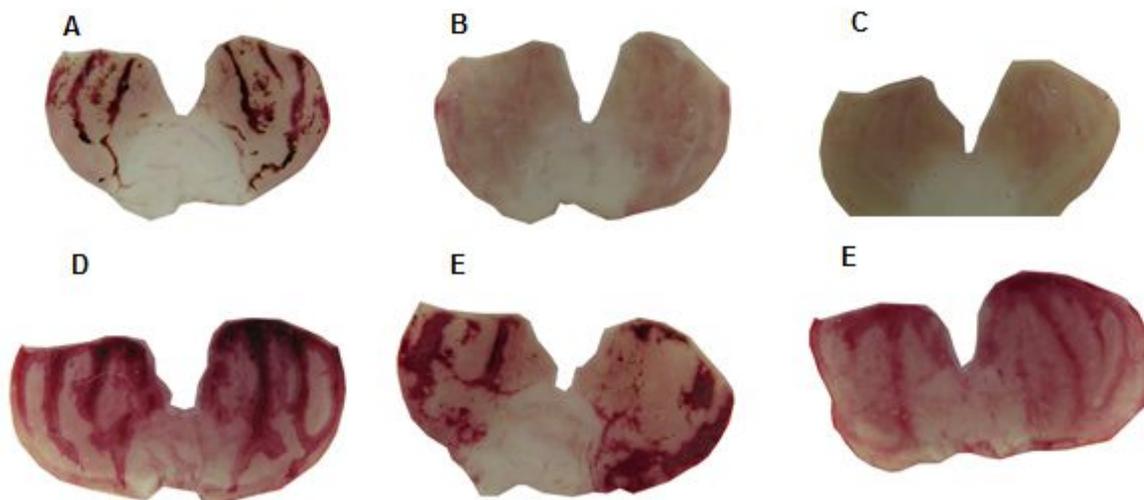
com NEM (10 mg/kg - i.p), foi observado o aumento da ALU com redução do efeito gastroprotetor da carbenoxolona (100mg/kg) e estragol (250mg/kg) para 20 e 76%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Os resultados estão expressos no gráfico 2 e ilustrados na figura 21.

**Gráfico 2:** Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol após pré-tratamento com salina e NEM (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA):  $F(5,31) = 328,5$ ; seguido do teste de Dunnett. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%) ###  $p < 0,001$ , comparado ao grupo NEM + controle negativo (tween 80 5%) ( $n = 6-8$ ). A diferença estatística entre os grupos não bloqueados e bloqueados estão expressos nas barras horizontais acima de cada grupo e foi verificada pelo teste de Tukey. A percentagem de inibição foi calculada em relação ao respectivo controle negativo.

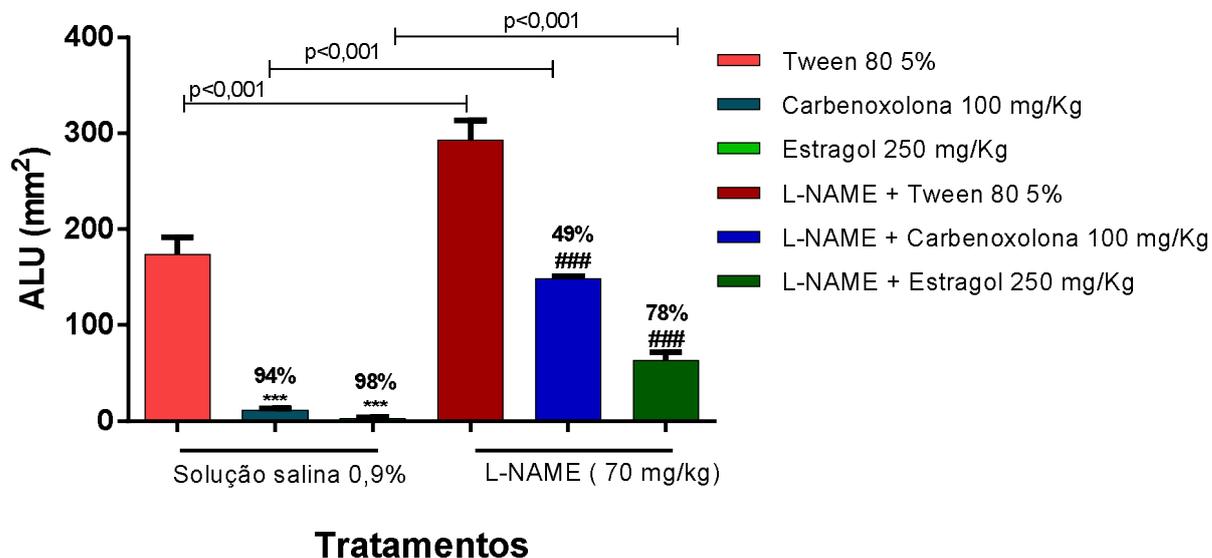
**Figura 21:** Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), estragol 250mg/kg (C) ou pré-tratados com NEM e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e estragol 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos grupamentos sulfidrilas



### 5.3.2.2 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na atividade gastroprotetora do estragol

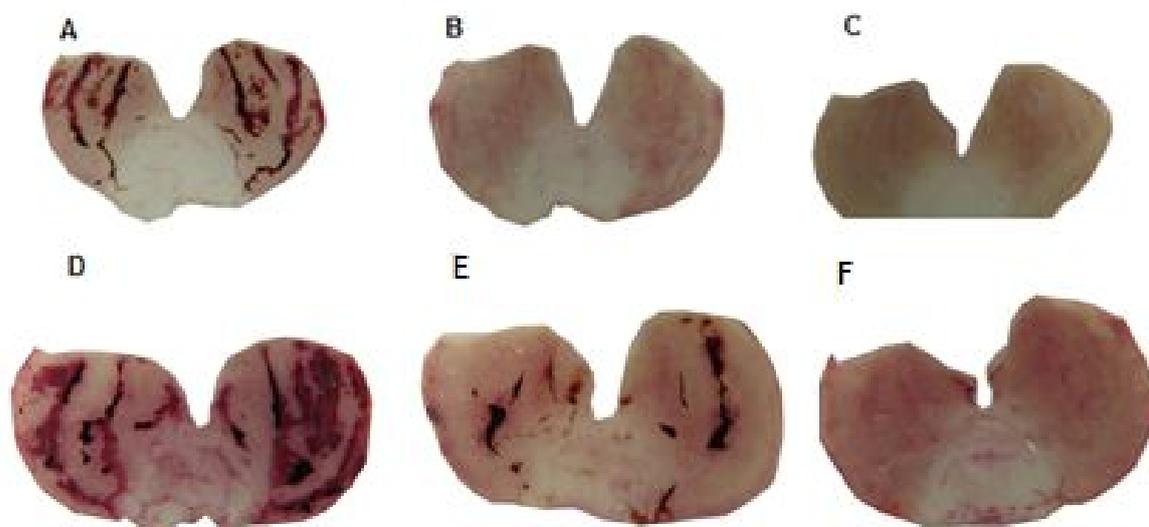
A partir do resultado obtido, foi possível observar que nos grupos não bloqueados e tratados v.o com carbenoxolona (100 mg/kg) ou estragol (250 mg/kg) ocorreram redução da ALU em 94 e 98%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Porém, nos grupos pré-tratados com L-NAME (70 mg/kg) i.p, foi observado o aumento da ALU com redução do efeito gastroprotetor da carbenoxolona (100mg/kg) e estragol (250mg/kg) para 49 e 78%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle negativo. Os resultados estão expressos no gráfico 3 e ilustrados na figura 22.

**Gráfico 3:** Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol após pré-tratamento com salina e L-NAME (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA):  $F_{(5,30)} = 538,9$  seguido do teste de Dunnett. \*\*\* $p < 0,001$ , comparado com o grupo controle negativo (tween 80 5%) ### $p < 0,001$ , comparado com o grupo L-NAME + controle negativo (tween 80 5%) (n= 6-8). A diferença estatística entre os grupos não bloqueados e bloqueados estão expressos nas barras horizontais acima de cada grupo e foi verificada pelo teste de Tukey. A percentagem de inibição foi calculada em relação ao respectivo controle negativo.

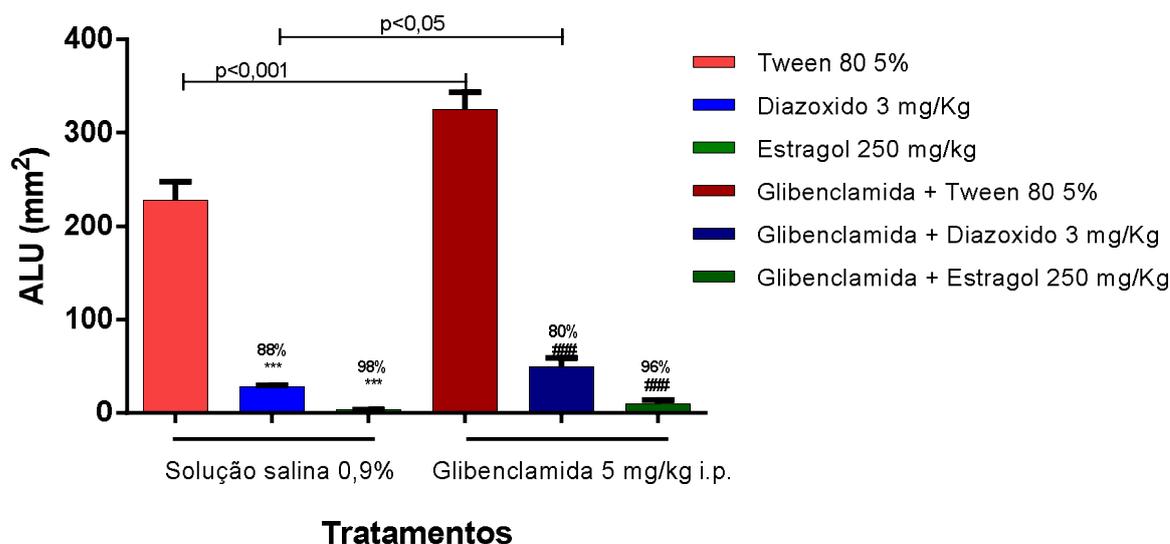
**Figura 22:** Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), carbenoxolona 100 mg/kg (B), estragol 250mg/kg (C) ou pré-tratados com L-NAME e tratados com Tween 80 5% (D), carbenoxolona 100 mg/kg (E) e estragol 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação do óxido nítrico



### 5.3.2.3 Avaliação da participação dos canais para íons potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) na atividade gastroprotetora do estragol

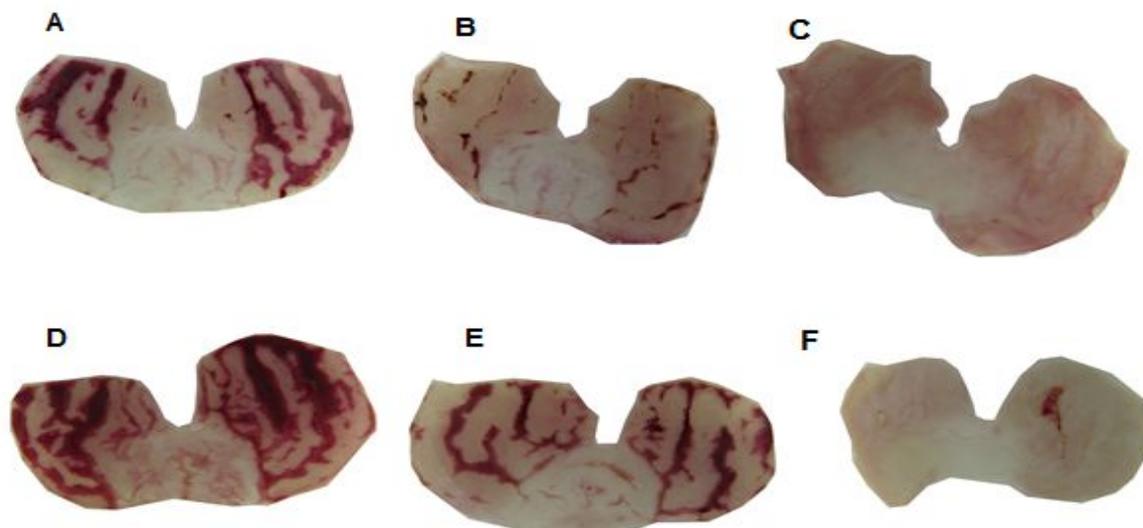
Os resultados obtidos demonstram que a atividade gastroprotetora nos grupos não bloqueados e tratados i.p. com diazóxido (3 mg/kg) ou v.o com estragol (250 mg/kg) reduziram a ALU em 88 e 98%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Quando os animais foram pré-tratados com glibenclamida (i.p), um bloqueador dos  $K_{ATP}$ , o grupo que foi tratado com estragol manteve sua gastroproteção, com ALU de 96%, enquanto que o grupo tratado com diazóxido, um ativador dos  $K_{ATP}$ , teve uma redução da ALU para 80%, ambos comparados aos respectivos controles negativos. Os resultados estão expressos no gráfico 4 e ilustrados na figura 23.

**Gráfico 4:** Efeito da administração oral do diazóxido e estragol após pré-tratamento com salina e Glibenclamida (i.p.) em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA):  $F_{(5,30)} = 887,9$  seguido do teste de Dunnett. \*\*\* $p < 0,001$ , comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%), e ####  $p < 0,001$ , comparado com o grupo glibenclamida + controle negativo (tween 80 5%) ( $n = 7-8$ ). A diferença estatística entre os grupos não bloqueados e bloqueados estão expresso nas barras horizontais acima de cada grupo e foi verificada pelo teste de Tukey. A percentagem de inibição foi calculada em relação ao respectivo controle negativo

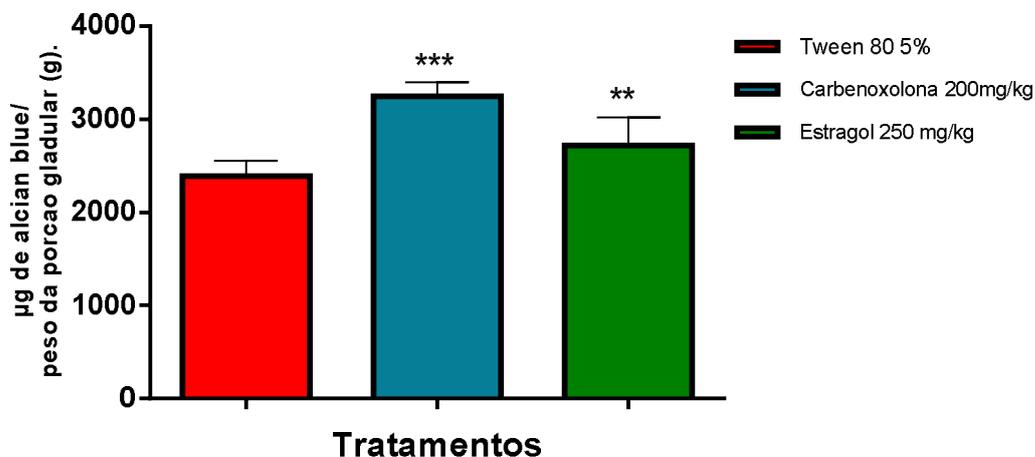
**Figura 23:** Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), diazóxido mg/kg (B), estragol 250mg/kg (C) ou pré-tratados com glibenclamida e tratados com Tween 80 5%, diazóxido 3mg/kg (E) e estragol 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação dos canais de potássio sensíveis a ATP



#### 5.3.2.4 Quantificação do muco aderido à mucosa gástrica

No modelo experimental para quantificação de muco gástrico, medido indiretamente pela quantidade de *alcian blue* na porção glandular estomacal, a carbenoxolona (200 mg/kg) e o estragol (250 mg/kg) (v.o) aumentaram a quantidade de muco aderido à mucosa gástrica em  $3.247 \pm 152,6$  e  $2.723 \pm 299,1$   $\mu\text{g}$  de *alcian blue*/peso da porção glandular (g) quando comparada com o grupo controle negativo:  $2393 \pm 157$   $\mu\text{g}$  de *alcian blue*/peso da porção glandular (g). Os resultados obtidos nesse modelo estão expressos no Gráfico 5.

**Gráfico 5.** Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol na concentração de muco aderido à mucosa gástrica após ligadura do piloro

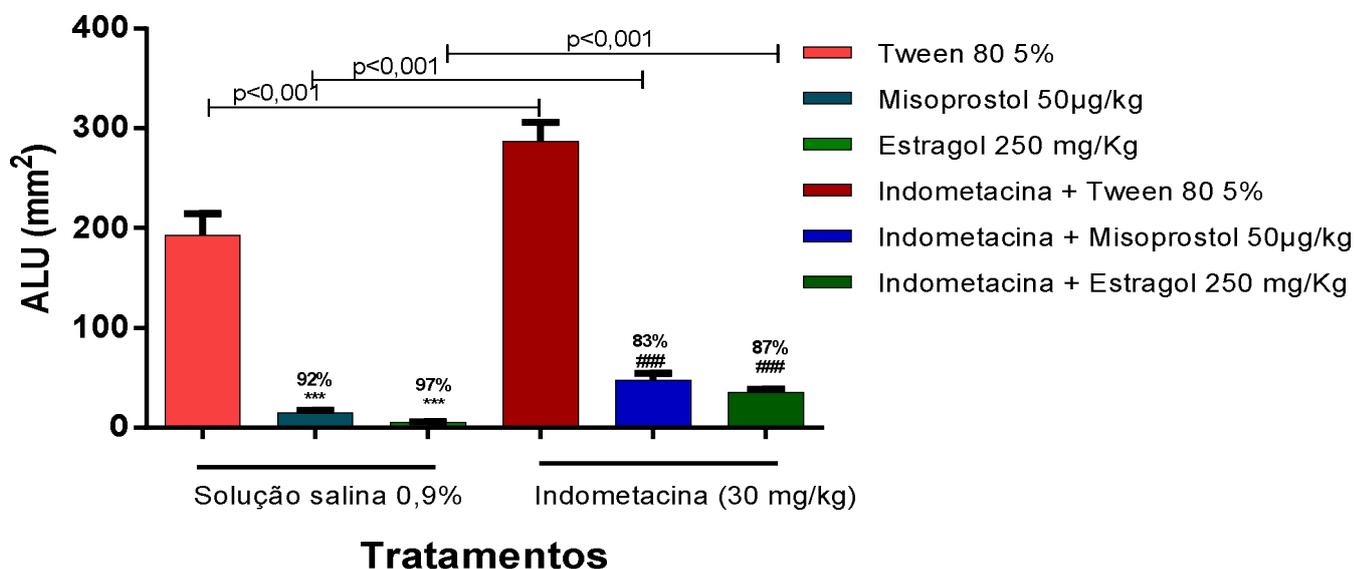


Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA):  $F(2, 19) = 27,4$  seguido do teste de Dunnett. \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo controle negativo (tween 80 5%) ( $n = 10$ ).

### 5.3.2.5 Avaliação da participação das prostaglandinas no efeito gastroprotetor do estragol

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a atividade gastroprotetora nos grupos não bloqueados e tratados v.o com misoprostol (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ou estragol (250  $\text{mg}/\text{kg}$ ) reduziram a ALU em 92 e 97%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle negativo. Entretanto, quando no pré-tratamento os animais receberam indometacina (v.o), um bloqueador das COX, foi observado o aumento da ALU com redução do efeito gastroprotetor do misoprostol (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e estragol (250  $\text{mg}/\text{kg}$ ) para 83 e 87%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo. Os resultados estão expressos no gráfico 6 e ilustrados na figura 24.

**Gráfico 6:** Efeito da administração oral de misoprostol e estragol após pré-tratamento com salina e Indometacina em úlcera gástrica induzida por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA):  $F(5,37) = 584,2$  seguido do teste de Dunnett.  $***p < 0,001$ , comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%), e  $####p < 0,001$ , comparado ao grupo indometacina + controle negativo (tween 80 5%) ( $n = 6-7$ ). A diferença estatística entre os grupos não bloqueados e bloqueados está expressa nas barras horizontais acima de cada grupo e foi verificada pelo teste de Tukey. A percentagem de inibição foi calculada em relação ao respectivo controle negativo.

**Figura 24:** Estômagos de ratos pré-tratados com solução salina 0,9% e tratados com Tween 80 5% (A), misoprostol 50µg/kg (B), estragol 250mg/kg (C) ou pré-tratados com indometacina e tratados com Tween 80 5% (D), Misoprostol 50µg/kg (E) e estragol 250 mg/kg (F) no modelo de úlceras induzidas por etanol para avaliação da participação das prostaglandinas



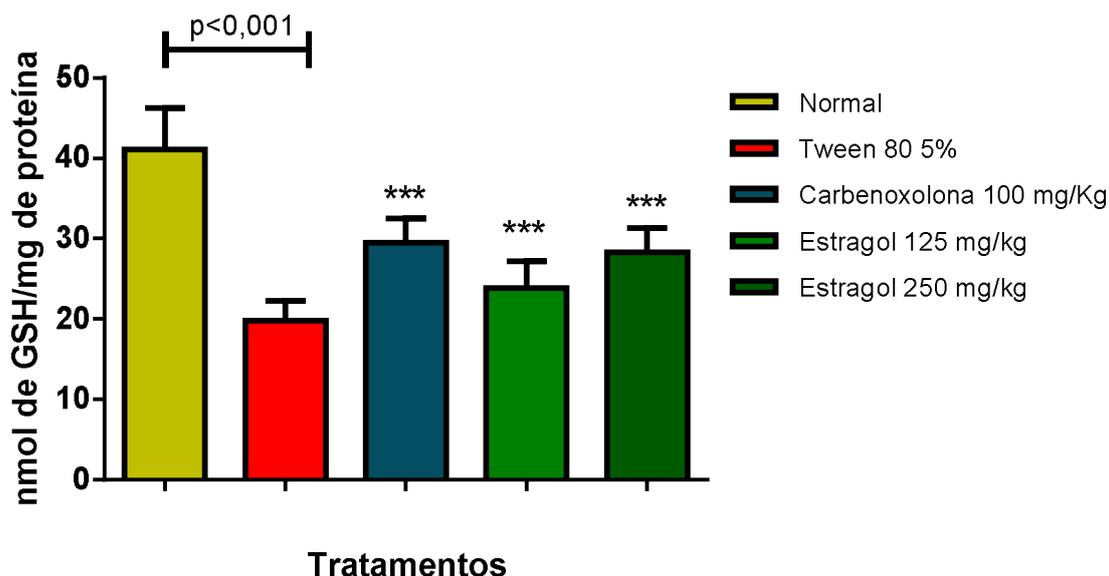
### 5.3.3 Atividade antioxidante

A partir do protocolo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol foram obtidos os tecidos para doseamento dos níveis de GSH, MDA e MPO na mucosa gástrica.

#### 5.3.3.1 Determinação dos níveis de grupamentos sulfidrílicos não proteicos (GSH)

De acordo com os resultados obtidos foi observado que no grupo controle negativo ( $19,82 \pm 2,4$  nmol de GSH/mg de proteínas) houve redução dos níveis de GSH quando comparados ao do grupo normal ( $41,07 \pm 5,1$  nmol de GSH/mg de proteínas). Entretanto, a carbenoxolona (100mg/kg) ou o estragol (125 e 250 mg/kg) administrados por via oral aumentaram os níveis de GSH para  $29,46 \pm 3,1$  e  $23,90 \pm 3,3$  nmol e  $28,30 \pm 2,89$  de GSH/mg de proteínas, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo ( $19,82 \pm 2,4$  nmol de GSH/mg de proteínas). Os resultados estão expressos no gráfico 7.

**Gráfico 7:** Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol nos níveis de GSH a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos

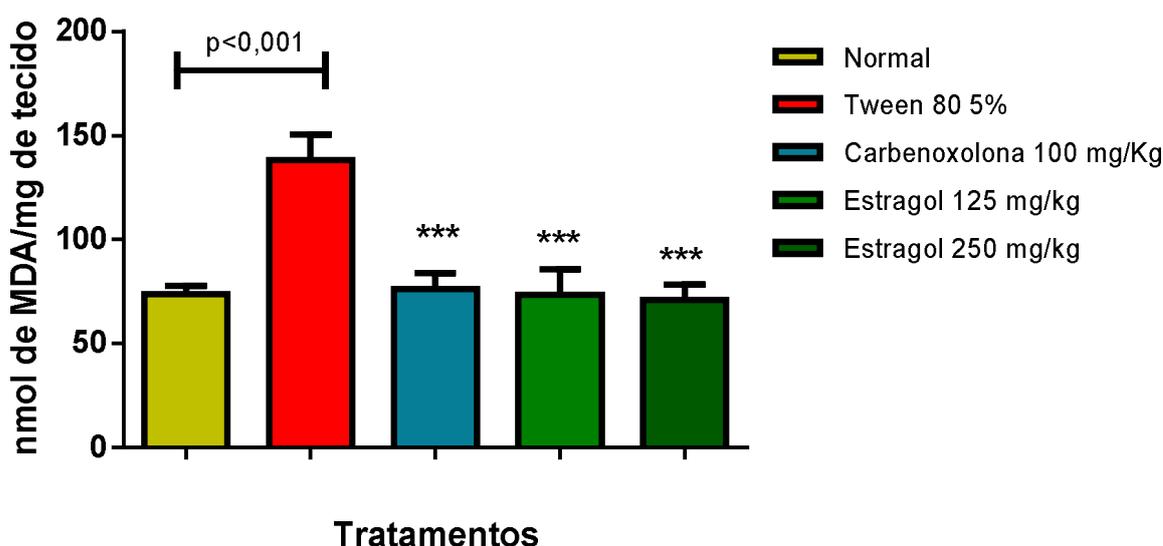


Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise de variância de uma via (ANOVA):  $F(4,24) = 29,1$ ; seguido do teste de Dunnett. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%) ( $n = 6$ ).

### 5.3.3.2 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

De acordo com os resultados obtidos foi observado que no grupo controle negativo ( $138,50 \pm 11,94$  nmol de MDA/g de tecido) os níveis de MDA aumentaram quando comparados ao do grupo normal ( $73,81 \pm 3,9$  nmol de MDA/g de tecido). Entretanto a carbenoxolona (100 mg/kg) ou o estragol (150 e 250 mg/kg) quando administrados via oral reduziram os níveis de MDA para  $76,30 \pm 7,55$ ;  $73,41 \pm 12,32$  e  $70,98 \pm 7,36$  nmol de MDA/g de tecido, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo Tween 80 5% ( $138,50 \pm 11,94$  nmol de MDA/g de tecido). Os resultados estão expressos no gráfico 8.

**Gráfico 8.** Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol nos níveis de MDA a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise de variância de uma via (ANOVA):  $F(4,30) = 73,7$ ; seguido do teste de Dunnett. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%) ( $n = 6$ ).

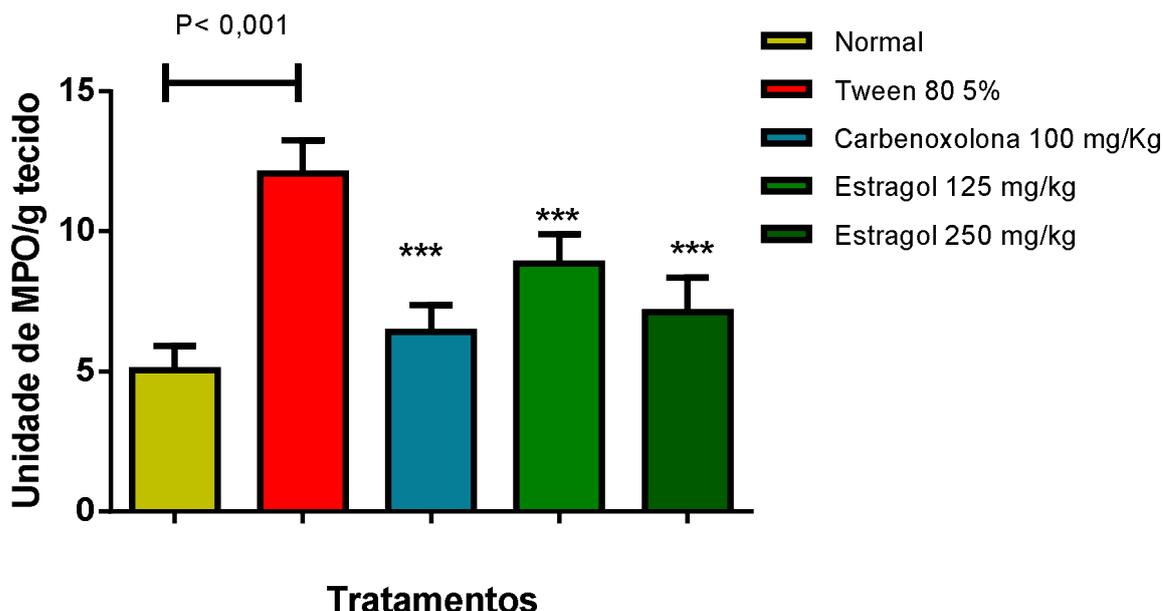
### 5.3.3.2 Determinação dos níveis de mieloperoxidase (MPO)

Os resultados demonstraram que no grupo controle negativo ( $12,06 \pm 1,20$  unidade de MPO/g de tecido) os níveis de MDA aumentaram quando comparados ao grupo normal ( $5,04 \pm 0,87$  unidade de MPO/g de tecido).

Os grupos tratados v.o com carbenoxolona (100 mg/kg) e estragol (150 e 250 mg/kg), reduziram os níveis de MPO para  $6,40 \pm 0,97$ ;  $8,85 \pm 1,06$  e  $7,11 \pm 1,24$

unidade de MPO/g de tecido, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo, Tween 80 5%, 12,06 ± 1,20 unidade de MPO/g de tecido. Os resultados estão expressos no gráfico 9.

**Gráfico 9.** Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol nos níveis de MPO a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Análise de variância de uma via (ANOVA): F(4,25) = 36,8; seguido do teste de Dunnett. \*\*\*p < 0,001 comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%) (n= 6).

### 5.3.4 Investigação da atividade imunorregulatória

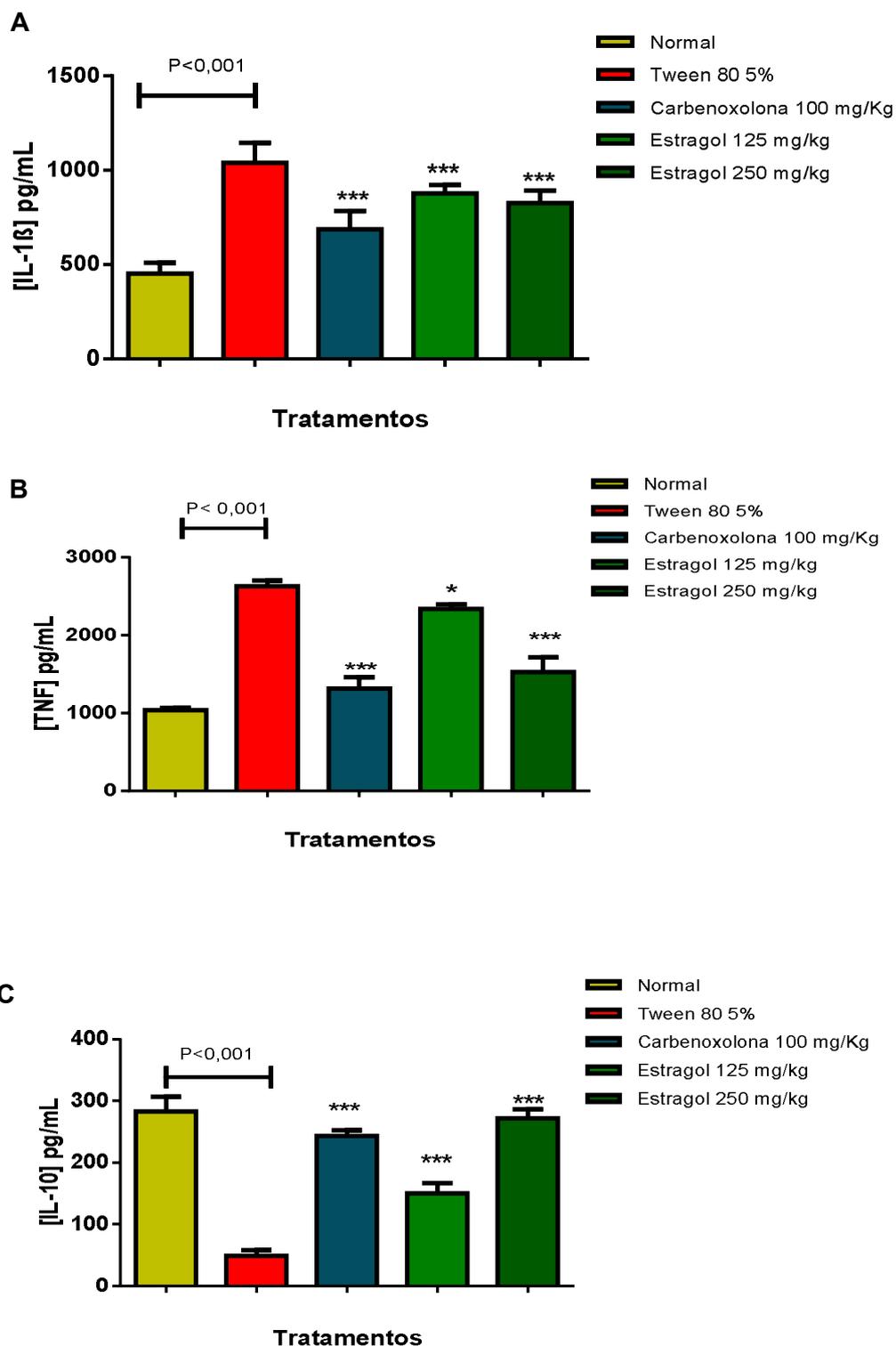
#### 5.3.4.1 Quantificação das citocinas IL-1β, TNF-α e IL-10 teciduais

De acordo com os resultados obtidos para os níveis de IL-1β, o grupo controle negativo (Tween 80 5%) apresentou um aumento dos níveis de IL-1β para 1.041 ± 103,40 pg de IL-1β/mL quando comparado ao grupo normal (452,3 ± 55,59 pg de IL-1β/mL). Os tratamentos v.o com carbenoxolona (100 mg/kg) ou o estragol (150 e 250 mg/kg), reduziram os níveis dessa interleucina pró-inflamatória para 687,7 ± 95,33; 877,6 ± 44,68 e 825,0 ± 66,51 pg de IL-1β/mL, respectivamente, quando comparados com o grupo controle negativo (Tween 80 5%), 1.041 ± 103,40 pg de IL-1β/mL. Esses resultados se assemelham ao encontrado para os níveis de TNFα, no qual para o grupo controle negativo apresentou um aumento dos níveis de TNFα para 2.628 ±

219,9 pg de TNF $\alpha$ /mL quando comparado ao grupo normal ( $1.033 \pm 98,33$  pg de TNF $\alpha$ /mL). Para os tratamentos com carbenoxolona (100 mg/kg) e o estragol (150 e 250 mg/kg) ocorreu uma redução dos níveis do fator de necrose tumoral para  $1.316 \pm 143,70$ ;  $2.338 \pm 222,40$  e  $1.527 \pm 226,9$  pg de TNF $\alpha$ /mL, respectivamente, quando comparados ao grupo tratado apenas com Tween 80 5%,  $2628 \pm 219,9$  pg de TNF $\alpha$ /mL.

A avaliação da capacidade imunomoduladora anti-inflamatória foi realizada a partir dos níveis de IL-10. O grupo controle negativo apresentou uma redução dos níveis de IL-10 para  $48,64 \pm 9,88$  pg de IL-10/mL quando comparado ao grupo normal ( $282,8 \pm 24,45$  pg de IL-10/mL). Os tratamentos com carbenoxolona (100 mg/kg) ou o estragol (150 e 250 mg/kg), aumentaram os níveis de IL-10 para  $242,9 \pm 10,04$ ;  $150,6 \pm 31,10$  e  $271,6 \pm 14,7$  pg de IL-10/mL, respectivamente, quando comparados com o grupo tratado apenas com Tween 80 5%,  $48,64 \pm 9,88$  pg de IL-10/mL. Os resultados correspondentes à imunomodulação estão representados no gráfico 10.

**Grafico 10.** Efeito da administração oral da carbenoxolona e estragol nos níveis de IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-10 (C) a partir do modelo de úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m. Análise de variância de uma via (ANOVA): (A)  $F(4,23) = 43,6$ ; (B)  $F(4,22) = 50,81$ ; (C)  $F(4,20) = 123,6$ , seguido do teste de Dunnett. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle negativo (tween 80 5%) ( $n = 6$ ).

### **5.3.5 Análise imunohistoquímica dos estômagos submetidos ao modelo de úlceras por etanol**

A partir dos resultados foi possível observar uma redução da expressão de GPx nos animais do grupo controle negativo (Tween 80 5%) para 33,15 (25,9-54,2) quando comparado ao grupo normal 106,0 (86,3-136,5). O tratamento com o estragol aumentou a imunomarcação com GPx para 80,3 (69,0-102,5) quando comparado ao grupo controle negativo. Esses dados estão expressos na tabela 6 e representados na figura 25.

Na avaliação da imunomarcação com iNOS os resultados mostraram que houve um aumento da imunomarcação com essa enzima nos animais do controle negativo para 415,8 (400,0-450,7) quando comparado ao grupo normal 25,32 (17,4-38,1). O tratamento com estragol diminui a imunomarcação com iNOS para 346,7 (323,0-369,1) quando comparado ao grupo controle negativo, conforme representado na tabela 6 e expressos na Figura 26.

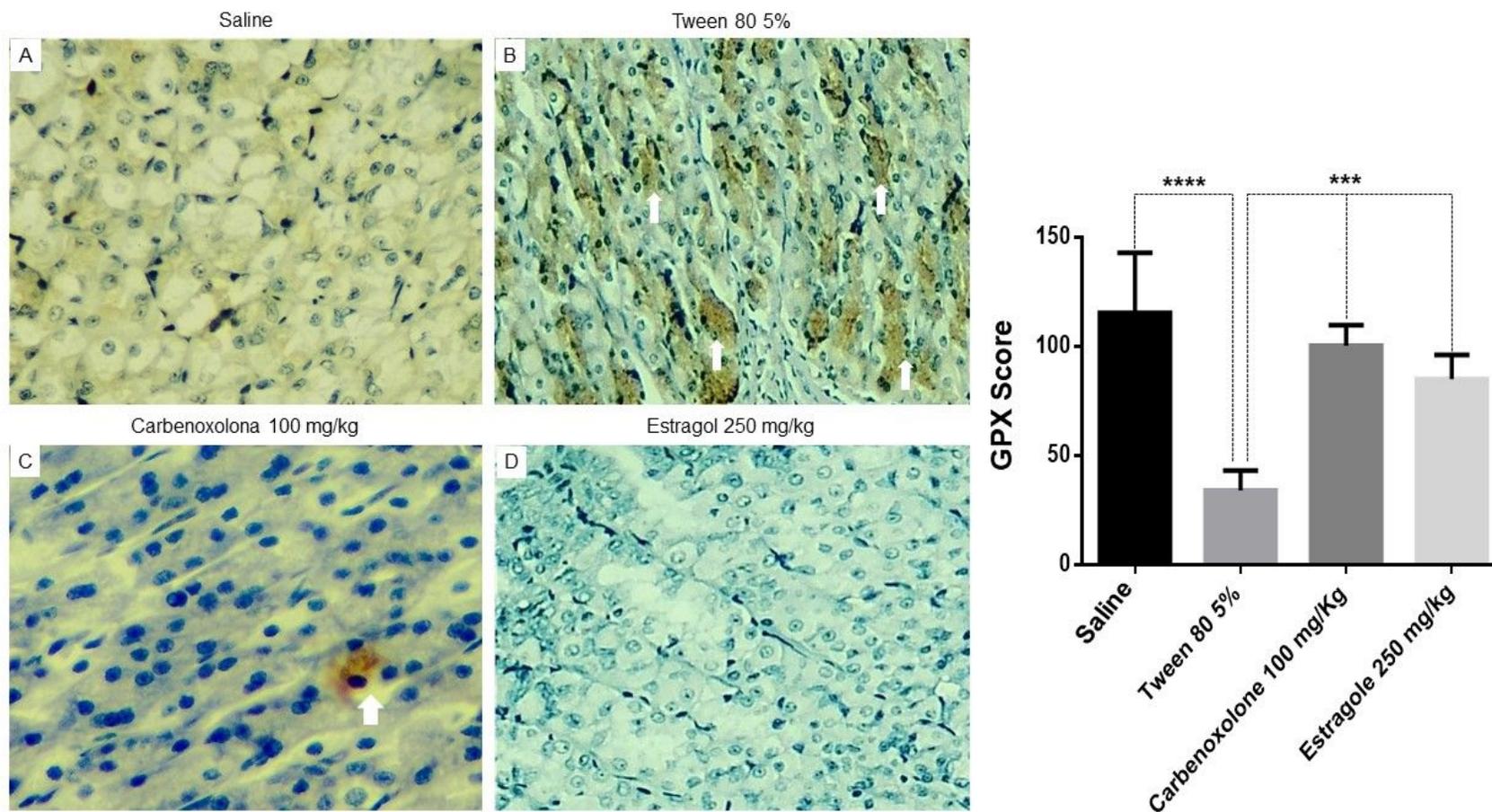
Já os resultados para avaliação da imunomarcação com COX-2 mostraram um aumento da sua imunomarcação nos animais do grupo controle negativo para 408,6 (358,5-472,3), quando comparado ao grupo normal 130,0 (112,8-153,4). O tratamento com estragol (250 mg/kg-v.o) aumentou a imunomarcação com COX-2 para 951,2 (903,4-1093,0) quando comparado aos grupo controle negativo. Conforme apresentados na tabela 6 e expressos na figura 27.

**Tabela 6.** Efeito da administração oral do estragol sobre a imunomarcção com glutathiona peroxidase (GPx), sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) e cicloxigenase 2 (COX-2) em amostras de estômago de ratos

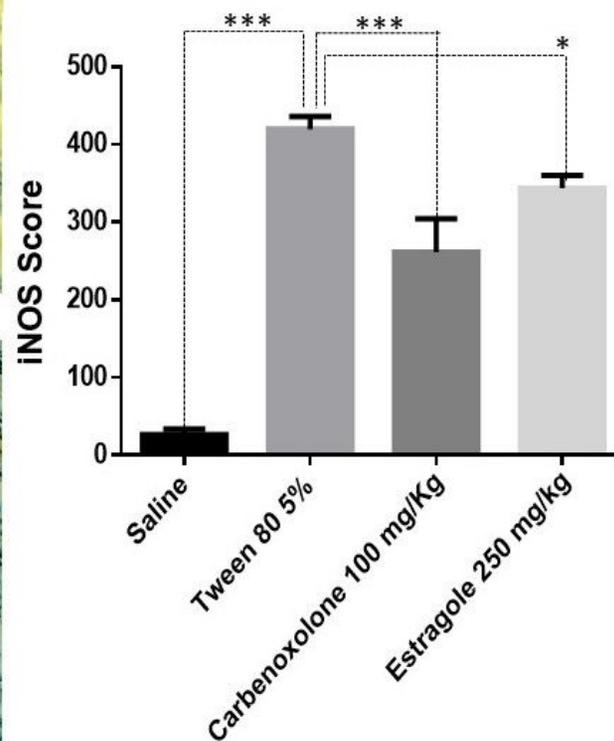
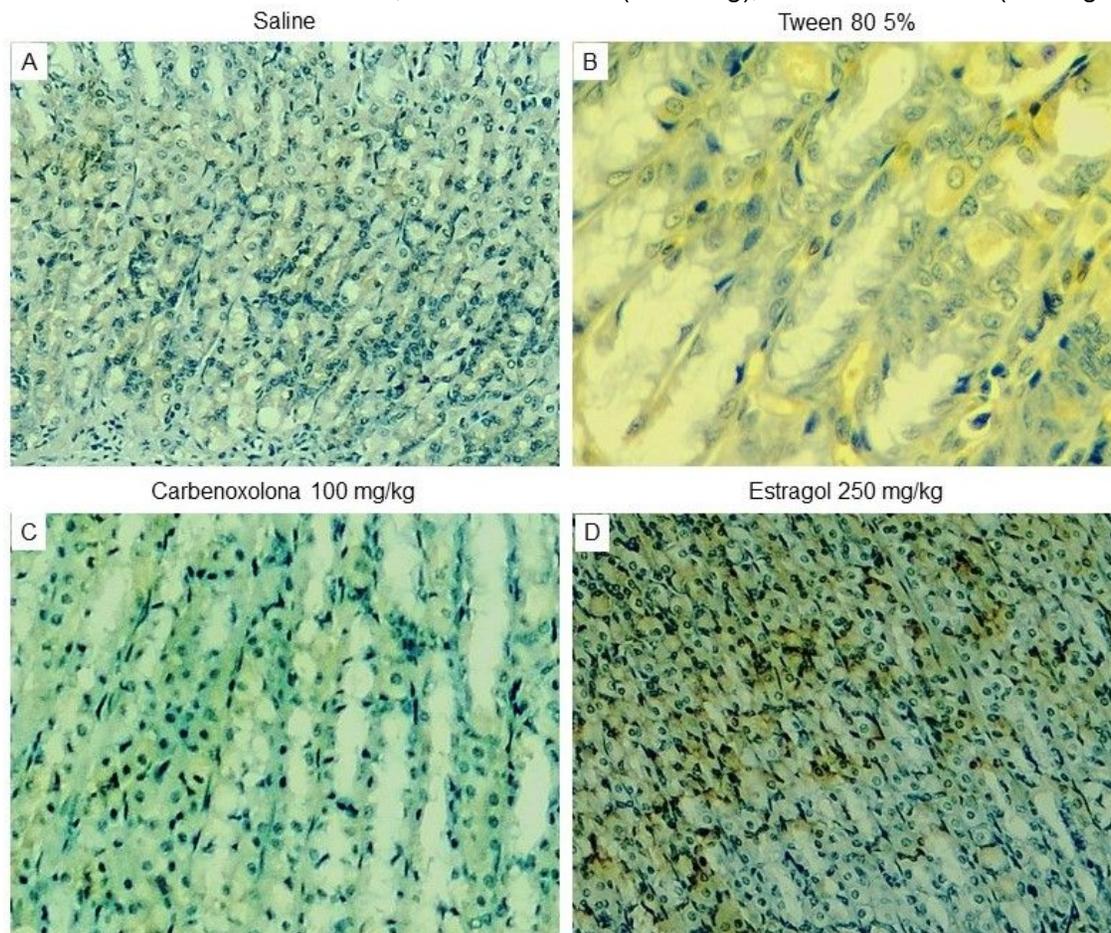
Tratamento	Dose	GPx ( $\mu\text{m}^2$ )	iNOS ( $\mu\text{m}^2$ )	COX-2 ( $\mu\text{m}^2$ )
Normal	-	106,0 (86,3-136,5)	25,32 (17,4-38,1)	130,0 (112,8-153,4)
Tween 80 5%	10 mL/kg	33,15 (25,9-54,2)###	415,8 (400,0-450,7)###	408,6 (358,5-472,3)###
Carbenoxolona	100 mg/kg	99,1 (89,4-119,7)***	263,2 (213,7-334,7)***	1028 (947,6-1155,0)***
Estragol	250 mg/kg	80,3 (69,0-102,5)***	346,7 (323,0-369,1)*	951,2 (903,4-1093,0)***

Os resultados estão expressos em mediana (mínimo-máximo) dos parâmetros analisados (n = 5, 3 sessões por animal). Teste de Kruskal Wallis e teste a posterior de Dunn. \*\*\*p<0,001 \*p<0,05 comparado ao grupo controle negativo (Tween 80 5%); ###p<0,001, comparado ao normal.

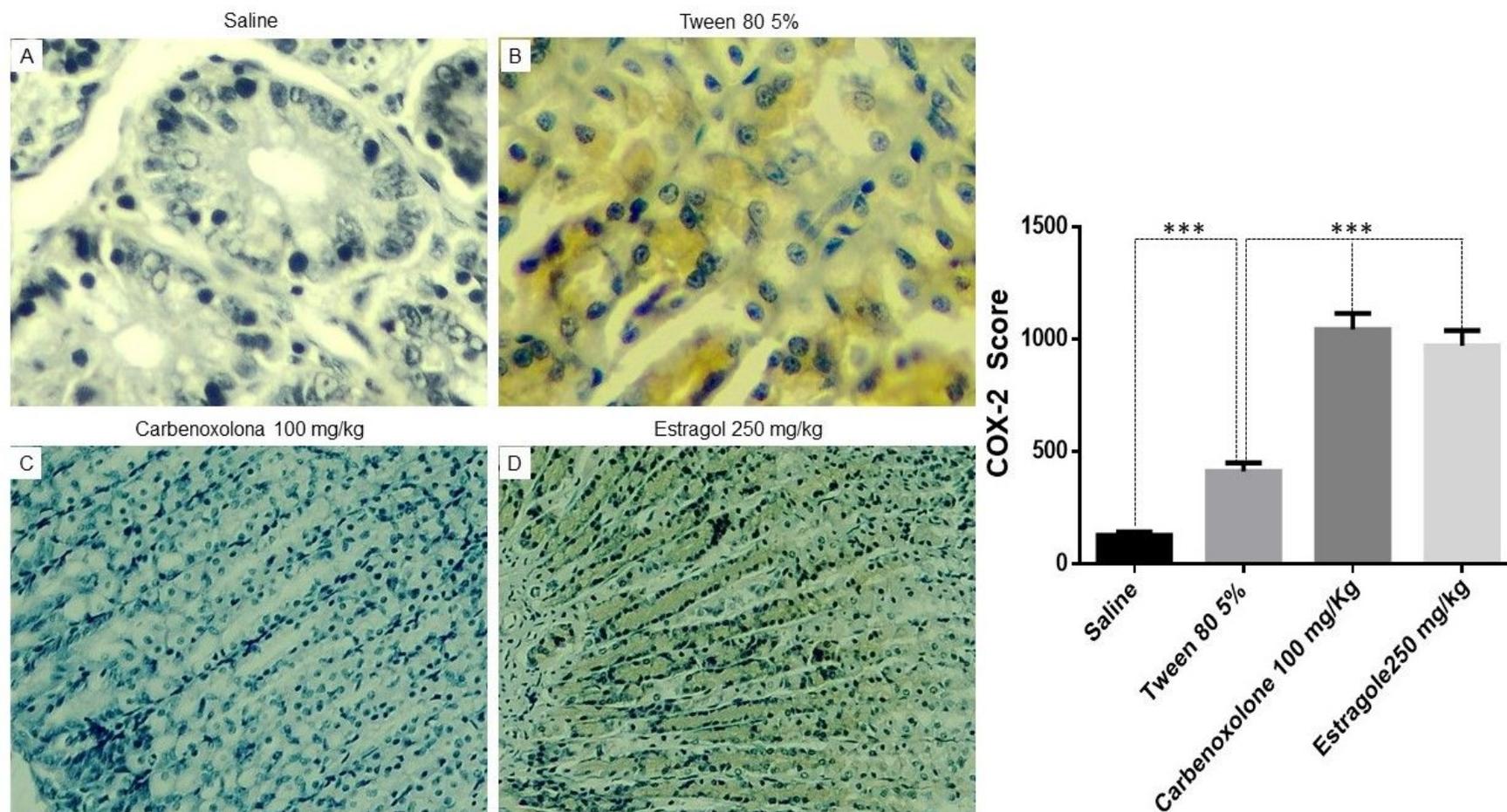
**Figura 25.** Fotomicrografias com marcação imunohistoquímica para glutathiona peroxidase (GPx) em amostras de estômago de ratos submetidos ao etanol. A-Normal; B- Tween 80 5% (10 mL/kg); C- Carbenoxolona (100 mg/kg); D- Estragol (250 mg/kg). Escala: 50 µm. 400x



**Figura 26.** Fotomicrografias com marcação imunohistoquímica para sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) em amostras de estômago de ratos submetidos ao etanol. A-Normal; B- Tween 80 5% (10 mL/kg); C- Carbenoxolona (100 mg/kg); D- Estragol (250 mg/kg). Escala: 50 µm. 400x



**Figura 27.** Fotomicrografias com marcação imunohistoquímica para ciclooxygenase 2 (COX-2; →) em amostras de estômago de ratos submetidos ao etanol. A-Normal; B- Tween 80 5% (10 mL/kg); C- Carbenoxolona (100 mg/kg); D- Estragol (250 mg/kg). Escala: 50 µm. 400x



# *DISCUSSÃO*

## 6.0 DISCUSSÃO

Entre os produtos naturais mais estudados estão as plantas medicinais e seus metabólitos, dotados de diversas atividades terapêuticas ou até efeitos tóxicos desencadeados pelo seu uso irracional, diante disto se faz necessário pesquisas que tanto comprovem sua atividade farmacológica quanto garanta seu uso seguro e eficaz (MAJEED et al., 2012; RODRIGUES et al., 2016).

Devido as inúmeras atividades biológicas que as plantas medicinais apresentam, cada vez mais tem sido despertado o interesse da indústria farmacêutica, servindo ora como protótipo para desenvolvimento de moléculas sintéticas semelhantes as moléculas existente na natureza (produtos sintéticos), ou a produção do mesmo em escala industrial, ora como substrato pra o aperfeiçoamento ou minimização de custos de moléculas, devido ao complexo processo de síntese (BRAZ-FILHO, 2010; NEWMAN; CRAGG, 2016).

O avanço de técnicas mais modernas, a exemplo da biologia molecular e engenharia genética, tem proporcionado uma melhor manipulação dos metabólitos secundários com relação a obtenção de uma maior quantidade desses compostos ou como marcadores moleculares para a escolha de plantas medicinais com menores propriedades tóxicas, ou até mesmo clonar enzimas essenciais na via biossintética de fenilpropanoides (LEMOS, 2006; SÁ et al., 2014).

Os metabólitos secundários embora não participem diretamente no crescimento e no desenvolvimento de plantas, são de fundamental importância para sua defesa diante das mais adversas condições (LEMOS 2006; RODRIGUES et al., 2016) e podem ser caracterizados de acordo com sua via de síntese em diferentes classes, como os alcaloides, flavonoides (SHAO; BAO, 2019), terpenos, esteroides, compostos fenólicos e fenilpropanóides (GUO 2017).

Os fenilpropanoides fazem parte de uma classe de compostos orgânicos sintetizadas em microrganismos e organismos vegetais a partir do aminoácido fenilalanina e composto por uma junção do grupo fenila (anel aromático) e uma cadeia lateral de três carbonos (grupo propila), que é sintetizado a partir da fenilalanina na primeira etapa na biossíntese de fenilpropanoides (GUO 2017). São fontes de pesquisas devido a ampla diversidade de atividades biológicas, como: antioxidante (MATSUDA et al., 2003; SOKMEN et al., 2005; MATEEN et al., 2018; LIMA FILHO et

al., 2018), vasodilatadora (ANDRADE et al., 2017) anti-inflamatório (WANG; ZHANG., 2005; PONTE et al., 2012) e imunomodulador (SÁ et al., 2014; LEMOS et al., 2016).

O estragol é um composto orgânico de ocorrência natural como constituinte de óleos essenciais de muitas espécies vegetais, como *Ravensara anisata*, *Ocimum basilicum* e *Croton zehntneri*. Pertencente a classe dos fenilpropanoides pela via biossintética do ácido chiquímico sendo classificado como aldeídos cinâmicos (LEVORATO et al., 2018). Várias atividades biológicas já foram descritas na literatura, com destaque para atividade antioxidante (MORAIS et al., 2006) e anti-inflamatória (PONTES et al., 2012; IUNKLAUS; ALMEIDA 2018). Entretanto, não foram encontrados estudos de atividade gastroprotetora, o que motivou o desenvolvimento desse estudo.

Na perspectiva de validar o uso do estragol, inicialmente foi realizada uma investigação toxicológica de acordo com as diretrizes da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD 423, 2001). Esses estudos são necessários para prever e prevenir os efeitos colaterais e/ou adversos, bem como definir uma faixa terapêutica segura para sua utilização (BRANNEN et al., 2016).

No Brasil esses estudos são recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução Nº 80 e no Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários para o desenvolvimento de medicamentos. Esses protocolos estabelecem a investigação e avaliação de sinais tóxicos provindos da administração de uma substância teste por um período de tempo de 24 horas, durante 14 dias após a administração, sob rigorosa observação. É recomendada a utilização de duas espécies de mamíferos e duas vias de administração, a via parenteral (primária) e a via pretendida para administração da droga teste em humanos, que seja também utilizado métodos alternativos para determinação da dose letal 50% (DL50) conforme citado no guia 423 da OECD guide (ANVISA, 2013).

O valor da DL50 foi estimado por meio da classificação de substâncias químicas (OECD, 2001). Para isso seguiu-se os anexos 2C e 2D da OECD 423, 2001 em que foram utilizados camundongos *swiss* machos para observação de possíveis sinais toxicológicos.

A OECD 423 preconiza a avaliação de toxicidade aguda em duas etapas, utilizando um número amostral reduzido de três animais do mesmo sexo e

identificando se há toxicidade pela constatação de morte ou qualquer debilidade em seu estado fisiológico normal após a administração da substância teste nas doses de 300 e 2000 mg/kg. Isso visa garantir a reprodutibilidade e confiabilidade do método e auxiliar na escolha das doses para estudos farmacológicos subsequentes (OECD, 2001).

De acordo com os parâmetros avaliados pelo protocolo, pode inferir que a morte constatada no grupo tratado com a maior dose foi um caso isolado, deste modo, a  $DL_{50}$  foi estimada como sendo maior que 2000 e menor que 5000 mg/kg e enquadrada na categoria 5 do guia da OECD, podendo afirmar que o estragol tem uso seguro, quando administrado nas condições avaliadas.

Resultados semelhantes foram observados em um estudo desenvolvido por Silva-Alves e colaboradores (2013) que estimaram a  $DL_{50}$  do estragol em 2000 mg/kg por via oral em ratos sem presença de mortes. Outros fenilpropanoides também possuem  $DL_{50}$  na categoria 5 da OECD, a exemplo do anetol (MATEEN et al., 2018), a siringina (SÁ et al., 2014) e o eugenol (ANDRADE et al., 2017) quando avaliados quanto a sua toxicidade.

Na avaliação ponderal dos animais foi observado que o grupo tratado com estragol (300 mg/kg - v.o) não apresentou alterações no índice de ganho de massa corporal, porém, os animais tratados com estragol na dose de 2000 mg/kg apresentaram redução do ganho de massa corporal em comparação ao grupo controle, o que pode ser atribuído à diminuição do consumo de água e ração deste grupo.

O índice de órgãos é calculado considerando a razão entre o peso do órgão pelo peso do animal e vem sendo utilizado como uma ferramenta preditiva de toxicidade, sendo considerado um parâmetro mais sensível do que o peso do órgão (DEMMA et al., 2007). Diante dos resultados obtidos não foram observadas diferenças nos índices de órgãos dos animais tratados com estragol nas doses de 300 e 2000 mg/kg quando comparado ao grupo Tween 80 5%, assim como também não foram evidenciadas mudanças macroscópicas nos órgãos após 14 dias da administração da substância teste, o que sugere que a administração oral do estragol possui boa margem de segurança, quando analisada nas condições avaliadas.

Os resultados observados corroboram com estudo realizado por Abdalla e colaboradores (2018) diante da investigação da toxicidade do fenilpropanoide

acetóxichavicol em modelos de toxicidade aguda e subaguda em ratos, em que não houve diferença do índice de órgãos dos animais tratados com a substância teste, quando comparado com o grupo controle.

Em relação ao consumo de água e ração dos animais tratados via oral com estragol (2000 mg/kg), a redução do consumo pode significar envolvimento da substância teste em alguma via de inibição do apetite e/ou sede, porém estudos mais específicos se fazem necessários.

Os resultados obtidos corroboram com os descritos por Coelho-de-Souza e colaboradores (2018) ao investigar a toxicidade do trans-anetol (isômero de posição do estragol), em que foi observado uma diminuição da ingestão de água e ração dos animais tratados com anetol e consequente diminuição do ganho de peso em altas doses, sugerindo portanto uma possível ação de inibição do apetite e sede por problemas relacionadas a palatabilidade quando adicionado a dieta.

Diante dos resultados é possível inferir que o estragol apresentou baixo grau de toxicidade nas condições avaliadas. Esses resultados indicam que existe uma relativa margem de segurança para o uso do estragol como possível agente terapêutico, embora estudos toxicológicos adicionais sejam necessários, principalmente o de doses repetidas (ANVISA, 2013).

Um estudo feito por Smith e colaboradores em 2002 demonstrou o uso seguro para consumo de derivados do alilalcóxibenzeno (estragol e metil eugenol) como flavorizantes de diversos produtos, sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia.

Além disso, esses resultados corroboram com estudos descritos por (ABDALLA et al., 2018; KOLAJ et al., 2018) que confirmam a baixa toxicidade de fenilpropanoides em modelos murinos, a exemplo do eugenol em que foi estabelecida a DL50 em 1,93 g/kg para ratos (OLIVEIRA et al 2014) e 3000 mg/kg para camundongos (SAX, 2004).

Considerando a DL50 estimada do estragol, a falta de estudos da atividade gastroprotetora e os dados existentes na literatura, especialmente referentes a atividade anti-inflamatória a partir da dose de 30 mg/kg (PONTE et al, 2012), serviram como escolha das doses (31,25, 62,5, 125 e 250 mg/kg) para o desenvolvimento dos nossos estudos farmacológicos.

Nessa perspectiva esse estudo foi realizado com o objetivo de investigar a atividade gastroprotetora do estragol a partir de modelos experimentais de indução aguda de úlcera gástrica pelos agentes lesivos etanol absoluto, estresse por imobilização e frio, por AINEs e por contensão do suco gástrico, além de investigar os mecanismos de ação relacionados a essa atividade gastroprotetora.

O modelo experimental a ser utilizado para avaliar o estragol foi o de úlceras gástricas induzidas por etanol absoluto. Esse modelo busca mimetizar as lesões gástricas causadas pela ingestão de bebidas alcólicas em humanos. Embora não seja um modelo específico, uma vez que está relacionado com diferentes mecanismos, a exemplo do antissecretório, citoprotetor e antioxidante, ele nos permite uma visão geral sobre a capacidade gastroprotetora da substância teste e sua reprodutibilidade garante uma melhor compreensão do surgimento dessas lesões gástricas (SUZUKI et al., 2011; DA SILVA et al., 2018).

A patogênese do tecido epitelial gástrico em decorrência do uso de álcool pode ser justificada pelo aumento da expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias nos processos de peroxidação lipídica, da geração de espécies reativas de oxigênio ocasionando dano oxidativo celular, alterações na permeabilidade vascular e despolarização da membrana mitocondrial e inibição da expressão de proteínas envolvidas na citoproteção (HSPs e PGE<sub>2</sub>) (IBRAHIM et al., 2016; STEVEN et al., 2016).

O etanol causa dano à mucosa gástrica por mecanismos relacionados a redução dos fatores protetores da mucosa, sendo rapidamente absorvido e em contato direto com as células epiteliais causa necrose e desestabilização da camada de muco com retrodifusão dos H<sup>+</sup> para a célula epitelial (CHOI et al., 2009; STEVEN et al., 2016) resultando em processos inflamatórios que agravam o tecido já lesionado (AMARAL et al 2013). Além disso, a perda da integridade vascular resulta em infiltração de células inflamatórias (leucócitos, mastócitos, eosinófilo), inibição dos fatores de crescimento celular, estimulação das vias de apoptoses e peroxidação lipídica (STEVEN et al., 2016).

A via de metabolização do etanol se dá por meio da enzima hepática do citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que induz sua oxidação e formação do acetaldeído. Esse metabólito diminui a disponibilidade do sistema antioxidante, como a glutathione peroxidase e reduzida, o que resulta na superprodução de EROs (radical hidroxila,

peróxido de hidrogênio e ânion superóxido) (ZHENG et al., 2014). Esses produtos têm a capacidade de inibir ou esgotar antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos endógenos, causando estresse oxidativo e apoptose celular. Esse agente lesivo também estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6). O estímulo de modo contínuo dessas citocinas promovem disfunções imunes e ativa a via de sinalização do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), que sinaliza aumento da resposta inflamatória e dano tecidual (HUSSEIN et al., 2016; XU et al., 2018).

O reparo tecidual frente as lesões no epitélio gástrico envolve mecanismos de defesa, dentre eles a proliferação celular, renovação de glândulas (em especial as células caliciformes que são responsáveis pela produção e secreção de muco e conseqüentemente neutralização do HCl), formação de tecidos de granulação, angiogênese e reestruturação da matrix extracelular. Esse processo de recuperação tecidual também é controlado pelas citocinas interleucina-4, interleucina-10 e interleucina-13; pelo fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); e por hormônios, como a gastrina, a colecistocinina e os peptídeos exógenos (a grelina, a orexina A e a obestatina). Todos esses mecanismos resultam na cicatrização do tecido lesionado, porém ocorre perda parcial tanto da função quanto da arquitetura do tecido (TARNAWSKI, 2010; SATO et al., 2014; NIU et al., 2016; CHEN et al., 2017).

Com base dos resultados avaliados é possível inferir que o estragol exerce efeito gastroprotetor sobre a mucosa gástrica, e isso pode estar relacionado a mecanismos citoprotetor, antissecretório, antioxidante e/ou imunorregulatório. Esses resultados corroboram aos estudos com outros fenilpropanoides: Acetochavicol (MATSUDA et al., 2003), ácido isoferúlico (MIRANDA et al., 2015) e eugenol (CAPASSO et al., 2000), que reduziram tanto a quantidade quanto a gravidade das lesões gástricas quando avaliados no modelo de etanol.

Estudos realizados com o óleo essencial de *Croton zehntneri* (FREIRE et al., 2005) e com anetol (COELHO-DE-SOUZA et al., 2012) também apresentaram atividade gastroprotetora frente ao modelo de indução de úlceras gástricas por etanol, com redução da área de lesão ulcerativa.

O estragol reduziu a área de lesão ulcerativa (ALU) de acordo com o aumento das doses testadas. A partir desse resultado foi observado que a dose mais efetiva do estragol foi a de 250 mg/kg.

Com relação à análise histológica foi observado que os animais tratados apenas com etanol (grupo controle negativo) foram marcados por lesões extensas com corpos apoptóticos e com destruição da arquitetura tecidual, associado a uma redução e esfoliação da camada mucosa do estômago. Entretanto, o tratamento com o estragol (250 mg/kg) reduziu os parâmetros inflamatórios em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de schiff (PAS) e azul de toluidina (ATO) quando comparados ao controle negativo e pôde estimular a substituição de grânulos de mastócitos, sem alterações inflamatórias significativas nas camadas tissulares da mucosa, com proteção e deposição de muco nas paredes gastrointestinais, protegendo a camada epitelial do estômago contra os efeitos lesivos do conteúdo gástrico.

Estudos anteriores com os fenilpropanoides seringina (SUNDARAM; RAO, 2016) e *p*-cumarato (FILHO LIMA et al., 2018) demonstraram suas capacidades de protegerem o revestimento mucoso do estômago dos danos oxidativos por inibição da peroxidação lipídica e eliminação dos radicais livres, importantes agentes causadores de úlceras gástricas (SAGUN et al., 2017).

Deste modo, pode-se inferir que a redução das lesões ulcerativas produzidas pelo estragol pode estar intimamente relacionada com uma possível atividade citoprotetora, antioxidante e/ou imunorregulatória (SINGH et al., 2016; SAGUN et al., 2017).

Diante dos resultados promissores obtidos, o próximo passo foi investigar a atividade do estragol sobre os reflexos vago-vagais a partir do modelo de úlcera gástrica induzida pelo estresse por imobilização e frio para investigar se a atividade gastroprotetora pode estar relacionada a uma possível atividade antissecretória.

A fisiopatologia das úlceras gástricas induzidas pelo estresse em animais manifesta-se como lesões gástricas hemorrágicas e assemelha-se aos danos na mucosa relacionados a condição de estresse em indivíduos que passam por cirurgias, traumas, sepse, queimaduras graves ou outras doenças de grave intensidade (BREGONZIO et al., 2003).

O estresse induz lesões na mucosa gástrica por meio de diversos fatores, dentre eles a vulnerabilidade individual, estimulação de vias cerebrais específicas reguladoras da função autonômica, diminuição do fluxo sanguíneo para a mucosa, aumento da contratilidade muscular, degranulação de mastócitos, ativação de leucócitos e aumento da geração de radicais livres resultando em aumento da peroxidação lipídica (OVERMIER; MURISON, 2000; BREGONZIO et al., 2003; SAXENA; SINGH, 2017).

As úlceras causadas pelo protocolo de estresse por imobilização e frio são mais acentuadas na região do fundo do estômago e apresentam semelhanças com as úlceras causadas por estresse no homem quando comparada a outros protocolos experimentais a exemplo do nada forçado. Nesse modelo, as condições impostas de temperatura influencia acentuadamente a diminuição do fluxo sanguíneo, o que resulta em isquemia seguida de reperfusão e aumento da permeabilidade microvascular gástrica. A isquemia seguida de reperfusão e diminuição dos níveis de hexosamina, um marcador da integridade da mucosa, são estados patológicos de danos à mucosa gástrica (MOJZIS et al., 1996; BREGONZIO et al 2003; SAXENA; SINGH, 2017).

Diante o processo de estresse ocorre a estimulação do eixo hipotalâmico-pituitário adrenal (HPA) e ativação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, bem como ativação do sistema imunológico central e periférico, com consequente isquemia, estresse oxidativo, redução dos níveis de prostaglandinas, produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da secreção gástrica e diminuição da secreção de muco (MORSY et al., 2012; DOSTAL et al., 2017). Os níveis sanguíneos do hormônio estimulante da tireoide (TSH) aumentam durante o estresse por contenção e submissão ao frio, desempenhando um papel patogênico por meio do aumento na secreção ácida gástrica e motilidade do TGI devido a degranulação de mastócitos e liberação exacerbada de histamina sinergicamente com a liberação de acetilcolina pelo sistema parassimpático (CHO; OGLE, 1979; TANAKA et al., 2007; SHAH et al., 2016).

O aumento da peroxidação lipídica, de EROs e citocinas pró-inflamatórias (NF-kB, Mieloperoxidase e TNF- $\alpha$ ) no tecido gástrico são características da patogênese de lesões gástricas nesse modelo experimental, a isso também está associado o aumento da secreção gástrica, motilidade intestinal, permeabilidade da

mucosa e função de barreira, sensibilidade visceral e uma alteração no fluxo sanguíneo mucoso, com danos estruturais da mucosa que resultam em apoptose celular (YE et al., 2013; SHAH et al., 2016; POLAT et al., 2017).

Deste modo, considerando que o estragol reduziu as lesões ulcerativas no modelo de indução de úlcera por estresse por imobilização e frio, pode-se inferir que a atividade gastroprotetora do estragol possivelmente envolve os mecanismos antissecretório (por regulação da secreção excessiva de H<sup>+</sup>), antioxidante (por inibição da formação de EROs e peroxidação lipídica), bem como anti-inflamatório (por regulação de citocinas pró-inflamatórias) (SHAH et al., 2016; POLAT et al., 2017).

Os resultado corroboram aos estudos realizados com o óleo essencial de *Croton zehntneri* e do anetol (Coelho-de-souza et al., 2012) nesse mesmo modelo de estresse em que reduziram a área de lesão ulcerativa. Estudos realizado com extrato da folha de *Cinnamomum tamala* (ESWARAN et al., 2010) contendo o fenilpropanoide eugenol também apresentou atividade gastroprotetora quando avaliado no modelo de indução de úlcera pelo estresse por imobilização e frio.

O próximo passo desse estudo foi avaliar a atividade gastroprotetora do estragol no modelo de indução aguda de úlceras gástricas pelo uso de anti-inflamatório não esteroidal (AINE), utilizando o piroxicam como agente lesivo. A ação gastroprotetora avaliada nesse modelo envolve possíveis atividades citoprotetora e/ou antissecretória.

As úlceras gástricas resultante do uso contínuo dos AINEs pode estar relacionada aos mecanismos que incluem a permeabilização da membrana celular do epitélio gástrico, a inibição da enzima ciclooxigenase (COX) e conseqüentemente das prostaglandinas gastroprotetoras e a produção de mediadores pró-inflamatórios adicionais. Atualmente, devido ao aumento da expectativa de vida os AINEs são considerados um dos principais agentes etiológicos da úlcera gástrica, e pode estar relacionado ao tipo de medicamento usado (seletivo ou não seletivo), dose e tempo de uso (SINHA et al., 2013; SOSTRES; LANAS, 2016).

A fisiopatologia das úlceras gástricas induzidas pelo uso contínuo de AINEs pode ser justificada pela sua ação local ou sistêmica. Efeitos lesivos locais podem ser justificados pela ligação dos AINEs a monocamada de fosfolípídeos (MATSUI et al., 2010; SINHA et al., 2013; SCHEIMAN, 2016) resultando em desestabilização da camada de muco e inibição da secreção de bicarbonato, vasoconstricção (causando

hipóxia do tecido local), atividade pró-oxidante (gerando espécies reativas de oxigênio ROS), peroxidação lipídica e atenuação dos sistemas antioxidantes endógenos do muco (SINHA et al., 2013; SCHEIMAN, 2016; BASTAKI et al., 2017). Já no efeito sistêmico ocorre inibição das isoformas da enzima ciclooxigenase (COX), a COX-1 e COX-2, que resulta no enfraquecimento da barreira epitelial da mucosa e consequente lesão pela ação corrosiva do ácido clorídrico e ação proteolítica (pepsina). A diminuição das prostaglandinas na mucosa é considerada a mais importante causa das lesões gástricas induzidas por AINEs, sobretudo pela inibição da prostaglandina da série E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) que tem um papel essencial na manutenção da integridade da defesa da mucosa gástrica, estimulando a síntese e a secreção de muco e bicarbonato, aumentando o fluxo sanguíneo da mucosa e promovendo a proliferação epitelial (GUDIS; CHOITSU SAKAMOTO, 2005; MATSUI et al., 2010; ZHENG et al., 2014).

Além disso, as prostaglandinas também atuam na regulação dos processos de reparo das células da mucosa e suprime os fatores agressivos, como a secreção de ácido e pepsina, inibe a infiltração de células pró-inflamatórias e melhora a resistência das células epiteliais contra danos potenciais por citotoxinas (HEEBA et al., 2009; ZAKARIA et al., 2016).

A inibição da COX e da síntese de PG pelos AINEs promove ativação simultânea da via da lipooxigenase e aumento da síntese de leucotrienos do tipo B<sub>4</sub> e de fatores quimiotáticos (GHOSH et al., 2015). Os leucotrienos causam inflamação e isquemia dos tecidos levando a lesão da mucosa gástrica, bem como aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios a exemplo dos fatores de necrose tumoral (TNFs), resultando em oclusão dos microvasos gástricos, redução do fluxo sanguíneo e liberação de radicais livres derivados do oxigênio mediada pelos neutrófilos. Os radicais livres de oxigênio reagem com ácidos graxos poliinsaturados da mucosa, causando à peroxidação lipídica e o dano tecidual (SINHA et al., 2013; ZHENG et al., 2014; GHOSH et al., 2015; BOEING et al., 2016).

O estresse oxidativo causado pelos AINEs é acentuado pelo dano mitocondrial causado por sua retenção intracelularmente no interior das mitocôndrias, promovendo o desacoplamento da fosforilação oxidativa, liberação do citocromo c do espaço intracelular e liberação de ROS, como superóxido e peróxido de hidrogênio, causando ativação de caspase 9, caspase 3 e peroxidação lipídica celular, resultando

em apoptose celular e ruptura da barreira epitelial (TOMISATO et al., 2001; OTT et al., 2007; SINHA et al 2013; UTZERI; USAI, 2017).

No modelo experimental de úlceras gástricas induzidas por AINEs (piroxicam) o estragol apresentou atividade em todas as doses avaliadas, o que sugere que um dos mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do estragol possa envolver a modulação positiva da síntese de PGs, o que pode levar ao aumento na síntese de muco e bicarbonato, bem como ao aumento do fluxo sanguíneo gástrico, da atividade antioxidante e redução na secreção de ácido gástrico (GHOSH et al., 2015; BOEING et al., 2016; LANAS, 2016) .

Esse resultado corrobora com os achados para o óleo essencial de *Croton zehntneri* e anetol (COELHO-DE-SOUZA et al., 2012) em que ocorreu redução da área de lesão ulcerativa. Já estudos realizados com o eugenol (MORSY; FOUAD, 2008; SANTIN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014) e o ácido caféico (LEE et al., 2010) demonstraram que o pré-tratamento com as doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente, também reduziram as úlceras gástricas por redução da secreção de ácido gástrico e a atividade de pepsina e aumentou a concentração de mucina gástrica no modelo de úlcera induzida por indometacina em murinos.

O próximo passo deste estudo foi avaliar a atividade do estragol no modelo agudo de úlcera gástrica induzida pela contensão do suco gástrico pela via oral e intraduodenal. Para isso foi utilizado o modelo de ligadura do piloro que é um procedimento padrão para avaliar a ação do estragol sobre o suco gástrico após obstrução mecânica (DA SILVA et al., 2018).

As lesões gástricas causadas pela ligadura do piloro são resultantes de secreções exacerbadas de ácido gástrico e pepsina (XU et al., 2016), provocando redução do pH gástrico pelo prolongado tempo de contato com a secreção de ácido. Essa obstrução induz a peroxidação lipídica e dano ao DNA, resultando em estresse oxidativo e lesões na mucosa gástrica (BISHR, 2016, WANG et al., 2018). O modelo escolhido simula a condição clínica de constipação crônica, resultando em baixo esvaziamento gástrico e maior tempo de contato do ácido com o lúmen, com danos na mucosa (SOFIDIYA et al., 2015).

A patogênese das úlceras gástricas induzidas pela ligadura pilórica é resultado do aumento dos reflexos vago-vagais e estímulo da secreção de ácido gástrico, com redução do esvaziamento gástrico, o que resulta na exposição do lúmen

gástrico ao ácido retido na mucosa (SHAY et al., 1945; DA SILVA et al., 2018; WANG et al., 2018). A secreção ácida excessiva estimula a liberação da enzima pepsina e, em seguida, aumenta a autodigestão da mucosa gástrica (BISHR, 2016; ZHANG et al., 2014; WANG et al., 2018). O estímulo dos receptores de pressão (mecanorreceptores) do lúmen gástrico ocorre ativação do reflexo vago-vagal gerando uma hipersecreção de ácido gástrico. A distensão gástrica produz um sistema de retroalimentação positiva, gerado pela liberação do hormônio gastrina e do neurotransmissor acetilcolina, responsáveis pela ativação da célula parietal e ativação da bomba de prótons (SCHUBERT, 2016, DA SILVA et al., 2018; WANG et al., 2018).

As lesões ulcerativas induzidas neste modelo também estão associadas ao desequilíbrio nos níveis dos marcadores do estresse oxidativo (aumento de MDA e diminuição de SOD e GSH) diminuição da defesa da mucosa, aumento da descarga vagal, da degranulação de mastócitos e da liberação do hormônio histamina no tecido gástrico, o que resulta em danos às células superficiais da mucosa (BAFNA; BALARAMAN, 2011; ZAGHLOOL et al., 2015). Além disso, os danos causados pela ligadura da região pilórica alteram níveis de prostaglandinas e interleucinas protetoras da mucosa gástrica (SOFIDIYA et al., 2015).

O estragol quando administrado, tanto por via oral quanto por via intraduodenal, reduziu o índice de lesão ulcerativa, o que sugere que essa substância exerce seu efeito gastroprotetor por ação local e sistêmica.

Os resultados obtidos corroboram aos estudos obtidos por outros fenilpropanoides descritos na literatura, como anetol (COELHO-DE-SOUZA et al., 2012), seringina (SUNDARAM; RAO, 2016) e eugenol (SANTIN et al 2010; OLIVEIRA et al., 2014) em que também demonstraram gastroproteção quando avaliados no modelo de contensão do suco gástrico.

Para avaliar os mecanismos envolvidos na gastroproteção inicialmente foi avaliada a atividade antissecretória gástrica sobre os parâmetros bioquímicos da secreção ácida gástrica (pH, concentração de  $H^+$  e volume do suco gástrico), utilizando o modelo de ligadura do piloro pela via oral (efeito local) e via intraduodenal (efeito sistêmico).

O estragol não promoveu alteração no pH, na concentração de íons  $H^+$  e no volume do suco gástrico quando administrado por via oral. Entretanto, o estragol quando administrado por via intraduodenal reduziu o conteúdo gástrico. Portanto

pode-se inferir que a gastroproteção promovida pelo estragol não está relacionada aos mecanismos antissecretórios locais, porém está envolvida com mecanismos antissecretórios sistêmicos, mediante as condições avaliadas.

Um potencial candidato a fármaco deve ter a capacidade de reduzir a secreção ácida gástrica (seja por inibição das vias de estimulação da bomba de prótons, ou por inibição direta da bomba) sem modular o pH e concentração de  $H^+$ , porque são de fundamental importância para a ativação de proteínas (pepsina) e absorção de nutrientes essenciais (vitamina B12) (BOEING et al., 2016). Deste modo pode-se inferir que o estragol não alterou a concentração de  $H^+$  nem o pH e sua atividade antissecretória envolve mecanismos sistêmicos.

Os fenilpropanoides acetoxichavicol (MATSUDA et al., 2003), anetol (Coelho-de-Souza et al., 2012) e seringina (SUNDARAM; RAO, 2016) também não apresentaram alterações no pH e concentração de  $H^+$ , entretanto, a seringina (SUNDARAM; RAO, 2016) quando administrada pela via intraduodenal, conseguiu reduzir o volume gástrico, resultado semelhante ao encontrado neste estudo.

Na avaliação da participação de mecanismos citoprotetores envolvidos na gastroproteção induzida pelo estragol, foram investigadas a participação dos grupamentos sulfidrilas não proteicos (NP-SH), óxido nítrico, canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), muco e prostaglandinas.

Na perspectiva de avaliar o envolvimento dos grupamentos sulfidrilas não proteicos (NP-SH) presentes na mucosa gástrica na atividade gastroprotetora do estragol foi utilizado o agente lesivo etanol e analisado o efeito do tratamento com a substância teste na ausência e na presença do bloqueador específico dos grupamentos sulfidrilas, o N-etilmaleimida (NEM 10 mg/kg-i.p).

Os grupamentos sulfidrilas não proteicos são formados por grupos químicos denominados tióis que apresentam uma ligação covalente não-polar entre os átomos de enxofre ligados a átomos de hidrogênio em proteínas (BIANCHI; HAENEM, 2016). Eles são responsáveis por aumentar a produção e manutenção da estabilidade do muco, especialmente quando as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na formação danos teciduais (RADOVANOVIĆ et al., 2015; PARRA et al., 2015; OCHMANN, 2017).

Os grupamentos sulfidrilas endógenos (GSH) desempenham um papel importante na permeabilidade da membrana celular e podem atuar como agentes

antioxidantes, reguladores da síntese e degradação de proteínas, na manutenção de proteínas estruturais da membrana e ligando-se a receptores para impedir a secreção ou ação de mediadores lesivos da mucosa, a exemplo das aminas vasoativas (PARRA et al., 2015; SEPULVEDA et al., 2016; HUSSEIN et al., 2016; OCHMANN, 2017).

Na mucosa gástrica são encontrados altos níveis de glutathiona reduzida (GSH) o que garante uma defesa frente ao ácido gástrico e aos agentes oxidantes (PÉREZ et al., 2017). A GSH elimina EROs, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidróxido ( $HO\bullet$ ), dessa forma sua redução expõe as células epiteliais gástricas aos danos causados por indutores de EROs (PÉREZ et al., 2017; OCHMANN, 2017).

Os níveis fisiológicos de GSH reduz o estresse oxidativo e impede dano celular, já que sua adesão de forma contínua a camada de muco forma uma barreira estável frente a ação de agente corrosivos, como o ácido gástrico e a pepsina. Com a redução dos grupamentos tióis ligados a mucina (que são responsáveis pela estabilidade do muco) o muco torna-se solúvel e facilmente retirado por agente nocivos, incluindo o etanol (CHEN et al., 2015). Desta forma, o efeito prejudicial do etanol à mucosa gástrica está ligado a diminuição dos níveis de GSH (DA SILVA et al., 2016; PÉREZ et al., 2017; OCHMANN, 2017).

O etanol em contato com a mucosa gástrica, induz a distúrbio microcirculatório, hipóxia, e, portanto, uma superprodução de EROs. As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são os subprodutos do processo normal celular, porém, quando em altas concentrações, causam peroxidação lipídica e induzem danos aos componentes celulares (SUZUKI et al., 2012; ASOKKUMAR et al., 2014; VENDRAMINI-COSTA et al., 2014).

Como pode ser observado nos resultados obtidos no protocolo avaliado de úlcera induzida por etanol, previamente tratados com o bloqueador dos grupamentos sulfidrilas (N-etilmaleimida – 10 mg/kg i.p), a atividade gastroprotetora do estragol foi reduzida quando comparada ao grupo não bloqueado. Com isso, pode-se inferir que o efeito gastroprotetor desse fenilpropanoide envolve a participação dos grupamentos sulfidrilas, possivelmente em decorrência da atividade antioxidante (OCHMANN, 2017).

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram aos dados descritos na literatura para o acetoxichavicol (MATSUDA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2014) na presença e ausência do bloqueador dos grupamentos sulfidrílicos, em que foi

observada a participação dos grupamentos sulfidrilas na sua atividade gastroprotetora. Estudos com o chavicol (COINER et al., 2006) e com o eugenol (COINER et al., 2006; BINU et al., 2018) também apresentaram atividade gastroprotetora quando avaliados na ausência do bloqueador dos grupamentos sulfidrilicos não-proteicos, entretanto sua ação gastroprotetora foi diminuída na presença do bloqueador.

O próximo passo desse estudo foi investigar se existe a participação de óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação citoprotetor do estragol. Para isso foi utilizado o modelo experimental de úlcera gástrica induzida por etanol, na ausência ou presença de L-NAME, um bloqueador da ciclase de guanilil solúvel.

O óxido nítrico é um gás lipossolúvel produzido pela enzima sintase de óxido nítrico (NOS) a partir da L-arginina (GULATI et al., 2017). Essa enzima está localizada na mucosa gástrica e apresenta-se sob três isoformas distintas: sintase de NO endotelial (eNOS), sintase de NO neuronal (nNOS) e sintase de NO induzível (iNOS) (YANDRAPU, SAROSIEK, 2015; BISHR, 2016).

O NO produzido pelas isoformas constitutivas (eNOS e nNOS) auxilia na gastroproteção por meio de seu efeito vasodilatador e aumento da microcirculação gástrica, acelera o reparo e a cicatrização das úlceras gástricas, mantém a integridade do epitélio da mucosa do estômago (RIBEIRO et al., 2016; HANS et al., 2017), além de suprimir mediadores inflamatórios, inibir moléculas de adesão dos neutrófilos, aumentar secreção de muco por meio da elevação do GMP<sub>c</sub>, regular a secreção ácida gástrica e motilidade intestinal (YANDRAPU, SAROSIEK, 2015; BISHR, 2016; GULATI et al., 2017, WANG et al., 2018). Com isso, a redução das formas constitutivas da NOS aumenta a predisposição da mucosa gástrica a danos de agentes lesivos e tóxicos (HUSSEIN et al., 2016).

A isoenzima iNOS quando em processos inflamatórios produz maior quantidade de NO por longos períodos e tem um efeito prejudicial na mucosa gástrica, potencializando os danos causados por radicais livres e atuando como agente citotóxico nas células da mucosa gástrica por meio de processos mediados por macrófagos, promovendo exarcebação do estresse oxidativo e apoptose (BISHR, 2016; GULATI et al., 2017).

Nos sistemas neuronal, cardiovascular, gastrointestinal e outros, o NO medeia os seus efeitos biológicos pela ciclase de guanilil solúvel (GCs) e estimula a síntese

de monofosfato de guanosina ( $GMP_c$ ) (IGNARRO, 2002; BERRIDGE, 2016). O aumento de  $GMP_c$  ativa a proteína cinase dependente de  $GMP_c$ , que por sua vez promove o declínio da concentração de cálcio intracelular e promove relaxamento em células musculares, além da diminuição da secreção ácida gástrica em células parietais (YANDRAPU, SAROSIEK, 2015; GULATI et al., 2017, WANG et al., 2018).

As lesões ulcerativas formadas na mucosa gástrica quando induzidas por etanol são seguidas pelo aumento rápido do NO. O aumento da expressão de iNOS na mucosa após o tratamento com etanol pode ser suprimido após interrupção da indução ou pela administração de substâncias que estimulam os fatores de citoproteção gástrico (AMIRSHAHROKHI et al., 2015; ZHANG et al., 2016).

De acordo com os resultados obtidos foi verificado que no grupo tratado apenas com estragol (250 mg/kg – v.o) houve redução das lesões ulcerativas quando comparado ao grupo controle negativo, entretanto, na presença de L-NG-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) (inibidor da enzima NOS), a atividade gastroprotetora do estragol foi revertida em comparação ao grupo tratado apenas com estragol, o que sugere a participação do NO na gastroproteção mediada pela substância teste.

Esses resultados corroboram com o eugenol (IWAI et al., 2009; SANTIN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014) e com ácido cinâmico (KANG et al., 2011) em que apresentaram atividade gastroprotetora quando avaliado na presença do L-NAME e ausência do bloqueador da sintase do óxido nítrico o efeito gastroprotetor foi revertido.

A próxima etapa desse estudo foi investigar a participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), utilizando o modelo de indução de úlcera por etanol, no efeito gastroprotetor promovido pelo estragol.

Os canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) são complexos heterooctaméricos compostos por quatro subunidades internas ( $K_{ir}$ ) e quatro subunidades de sulfoniluréia (SUR), responsáveis pela ligação ao ATP (CURRÒ, 2016; CRICHTON, 2019). Diferentes vias de sinalização estão envolvidas na gastroproteção, uma delas é a sinalização via NO/ $GMP_c$  que ativa diversos alvos proteicos, dentre eles, a proteína quinase dependente de  $GMP_c$  (PKG), a qual pode ativar os canais para íons potássio sensíveis ao ATP (BONFANTI et al., 2015; WALLACE et al., 2016). A abertura desses canais promove o efluxo de potássio, a hiperpolarização da membrana celular e o fechamento dos canais de cálcio sensíveis a voltagem ( $Ca_v$ ), o qual resulta em redução da concentração desse íon no interior da

célula muscular e relaxamento (BONFANTI et al., 2015). Nesse estado, a microcirculação gástrica é melhorada, o que resulta em renovação de nutrientes, dos fatores de crescimento e renovação celular, ao mesmo tempo que as EROs são removidas (LAINE et al., 2008; TRISTE et al., 2014).

Essas proteínas favorecem mecanismos necessários para o relaxamento das células musculares lisas e estão envolvidos nos mecanismos de defesa gástrica (MEDEIROS et al., 2008; BONFANTI et al., 2015; WALLACE et al., 2016).

Os  $K_{ATP}$  são funcionalmente expressos nas células do músculo liso do estômago e quando são bloqueados com um inibidor específico, a exemplo da glibenclamida, o efeito gastroprotetor de substâncias é revertido em diferentes modelos animais, inferindo que a ativação da via  $NO/GMP_{\alpha}/K_{ATP}$  tem participação nos mecanismos de proteção da mucosa gástrica (HAN et al., 2016; CRICHTON, 2019).

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, foi observado que atividade gastroprotetora do estragol no grupo pré-tratado com um bloqueador dos  $K_{ATP}$  (glibenclamida 5 mg/kg – i.p) não foi revertida, desse modo, pode-se inferir que os  $K_{ATP}$  não estão envolvidos no mecanismo de gastroproteção do estragol uma vez que seu efeito gastroprotetor não foi reduzido.

Esses resultados corroboram ao estudo do 2-alilfenol (ASSIS, 2016), um fenilpropanoide com estrutura química semelhante ao estragol, que, mediante bloqueio dos  $K_{ATP}$  pela glibenclamida, continuou exercendo sua atividade gastroprotetora. Comportamento semelhante foi observado em outros compostos, a exemplo do Acetoxichavicol e Acetoxieugenol (MATSUDA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2014) os quais também apresentaram atividade gastroprotetora quando avaliados na ausência e presença da glibenclamida, um inibidor específico dos canais para íons potássio sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ).

A próxima etapa foi avaliar se o estragol exerce sua atividade gastroprotetor por meio da estimulação da secreção de muco, no lúmen gástrico.

O muco gástrico é secretado por células apicais das glândulas gástricas e por células caliciformes, o qual é constituído por água em sua grande maioria (95%) e glicoproteínas, que recobrem toda a mucosa gastrintestinal, sendo portanto, a primeira linha de defesa (BISHR, 2016). É um importante mecanismo de proteção da mucosa gástrica tanto pela sua viscosidade, protegendo de substâncias irritantes ou lesões mecânicas, quanto pelo seu caráter alcalino, impedindo a ação proteolítica da pepsina

e patógenos, além de bloquear a retrodifusão do  $H^+$  para a mucosa e neutralização do ácido gástrico (BISHR, 2016, ELSHAMY et al., 2017; WANG et al, 2018).

A barreira de muco mantém o pH 7 (neutro) no epitélio gástrico por meio da retenção de íons bicarbonato ( $HCO_3^-$ ), em contraste ao pH entre 1 e 3 (ácido) do lúmen gástrico, impedindo portanto, que as células epiteliais sejam lesionadas pela alta acidez do suco gástrico (YANDRAPU; SAROSIEK, 2015). Além do mais, o muco também pode reduzir os danos causado na mucosa por radicais livres, por meio de sua capacidade antioxidante (ELSAYED et al., 2016; QUINTANA-HAYASHI et al., 2018).

A presença de altas concentrações de agente lesivos da mucosa gástrica, a exemplo do etanol, destrói a continuidade da mucosa, com redução de bicarbonato e da secreção de muco, o que resulta na diminuição da circulação sanguínea e surgimento de lesões teciduais e hemorrágicas na cavidade gástrica (LINDÉN et al., 2008; QUINTANA-HAYASHI et al., 2018).

De acordo com os resultados obtidos foi observado que o estragol (250 mg/kg – v.o) aumentou os níveis de muco quando comparado ao grupo controle negativo, comportamente também observado no grupo tratado com carbenoxolona (200 mg/kg – v.o), uma ferramenta farmacológica, o que pode inferir que a atividade gastroprotetora do estragol pode ocorrer por meio da estimulação desse agente citoprotetor nas condições avaliadas.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram aos fenilpropanoides eugenol (SANTIN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014), ácido cinâmico (JUNG et al., 2011) e anetol (COELHO-SE-SOUZA et al., 2012), em que também estimularam a secreção de muco com diminuição de lesões gástricas quando avaliados no modelo de contensão do suco gástrico.

Diante deste resultado, o próximo passo foi avaliar a participação das prostaglandinas (PGs) como agente citoprotetor na atividade gastroprotetora estragol.

As prostaglandinas endógenas desenvolvem importante função na manutenção integridade e proteção da mucosa gástrica, com destaque para a prostaglandina da série  $E_2$  (BISHR, 2016; TAKEUCHI;AMAGASE, 2017; KE et al., 2017).

As prostaglandinas possuem diversas ações no estômago, dentre elas a inibição da secreção ácida, a estimulação da secreção de muco e bicarbonato, o

aumento do fluxo sanguíneo da mucosa e a redução do tempo de cicatrização das úlceras (SEPULVEDA et al., 2016; BISHR, 2016). Além disso, também inibem a ativação de mastócitos e a aderência de leucócitos ao endotélio vascular, mantêm e potencializam mecanismos de defesa celular pela estabilização do citoesqueleto celular, das membranas lisossômicas, mitocondrial e celular e previnem a apoptose (TARNAWSKI et al., 2013; SOFIDIYA et al., 2015; BISHR, 2016; KE et al., 2017).

A COX produz diversos tipos de prostaglandinas, a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e a prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub> ou prostaciclina) que são as principais prostaglandinas presentes na mucosa gástrica humana, desempenhando função gastroprotetora por diversos mecanismos, tais como pelo aumento do pH gástrico (em função do aumento de secreção de bicarbonato), diminuição da retrodifusão de H<sup>+</sup> (devido a diminuição da permeabilidade epitelial), manutenção do fluxo sanguíneo normal, inibição de mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e interleucina-1 (IL-1) (BIRUKOVA et al., 2015; SEPULVEDA et al., 2016).

As prostaglandinas também possuem propriedades vasodilatadoras e promovem a angiogênese, de modo que a sua supressão torna a mucosa mais sensível a fatores agressivos e também induz a adesão leucocitária. Os efeitos protetores de barreira gástrica das PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> são dependentes da via AMP<sub>c</sub>/PKA e pela via da Epac, contrarregulando a sinalização do NF $\kappa$ B (BIRUKOVA et al., 2015; SEPULVEDA et al., 2016; BISHR, 2016; KE et al., 2017).

A síntese de prostaglandinas é catalisada pela enzima ciclooxigenase (COX), existente em duas isoformas, COX-1 e COX-2 (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Inicialmente, a COX-1 era considerada constitutiva e a COX-2 estava relacionada na produção de prostaglandinas envolvida em processos inflamatórios (STEWART; ACKROYD, 2011). Entretanto, estudos indicam que ambas contribuem para a defesa da mucosa gástrica (TAKEUCHI, 2010; TARNAWSKI 2013).

Entre os diferentes mecanismos de gastroproteção, quase todos são estimulados ou facilitados pelas prostaglandinas, então a inibição de sua síntese pelos AINEs torna a mucosa mais suscetível ao aparecimento de lesões (TARNAWSKI et al., 2013, VENDRAMINI-COSTA et al., 2014).

Os resultados obtidos no grupo pré-tratado (v.o.) com indometacina (bloqueador das isoformas da ciclooxigenase), demonstram que o efeito gastroprotetor do estragol foi diminuído, quando comparado com o grupo não

bloqueado, o que sugere a participação das prostaglandinas na atividade gastroprotetora da substância avaliada.

Esses dados assemelham-se aos obtidos por Matsuda et al., 2003, em que foi verificado que a atividade gastroprotetora dos fenilpropanoides acetoxichavicol e acetoxieugenol está relacionada a participação das prostaglandinas, uma vez que nos grupos pré-tratados com indometacina, o efeito gastroprotetor foi revertido. Os estudos realizados com as mesmas condições com o eugenol (SANTIN et al., 2011), e a siringina (SUNDARAM; RAO, 2016) também reduziram às lesões ulcerativas gástricas devido às ações de prostaglandinas endógenas de modo significativo, quando comparados ao grupo controle.

Mediante aos resultados promissores frente aos mecanismos citoprotetores, o próximo passo foi relacionar a atividade gastroprotetora do estragol a um possível mecanismo antioxidante. Para isso foi realizada a quantificação de marcadores do estresse oxidativo, a exemplo da glutatona reduzida (GSH), da glutatona peroxidase (GPx) e do malondialdeído (MDA), e avaliação de possível modulação anti-inflamatória por meio de um marcador de infiltração neutrofílica, a mieloperoxidase (MPO) na mucosa gástrica a partir do modelo agudo de úlceras gástricas induzidas por etanol.

O sistema antioxidante auxilia na prevenção do surgimento de algumas doenças, grande parte de sua produção ocorre de modo fisiológico e podem combater o estresse oxidativo. Dentre eles, estão as enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e glutatona peroxidase (GPx), além de sistemas antioxidantes não enzimáticos composto pela glutatona reduzida (GSH), tioredoxinas, ácido úrico e bilirrubina que são antioxidantes endógenos (CALCABRINI et al., 2016; KIVRAK et al., 2017; SARANGARAJAN et al., 2017).

A glutatona redizuda (GSH) é um tripeptídeo regulador não enzimático (L-c-glutamil-L-cisteinil-glicina) que atua como agente protetor da mucosa gástrica por meio da regulação na homeostase redox intracelular e tem papel central na defesa contra o estresse oxidativo, pois canaliza e neutraliza de modo direto as EROs (KIVRAK et al., 2017). Esse antioxidante endógeno promove a inativação das espécies reativas de oxigênio e produtos de peroxidação lipídica, diminuindo o dano gástrico induzido pelo etanol. Deste modo, o aumento nos níveis de GSH pode estar relacionado a

diminuição na produção de radicais livres (SARANGARAJAN et al., 2017; JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2018).

A indução de úlcera usando como agente lesivo o etanol promove o estresse oxidativo pelo consumo excessivo de antioxidantes, bem como infiltrado de macrófagos que, por quimiotaxia, atraem neutrófilos para o local lesionado os quais favorecem o surgimento de EROs. As EROs são moléculas sinalizadoras e têm grande importância no desenvolvimento de processos inflamatórios, uma vez que promovem lesão celular por meio do estresse oxidativo, além de induzirem a peroxidação lipídica por desregulação do sistema antioxidante (MITTAL et al., 2014; JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2018).

Desta forma, pode-se concluir que o estragol (250 mg/kg – v.o) aumenta os níveis de GSH nas condições avaliadas quando comparados ao controle negativo e que, possivelmente, a atividade gastroprotetora desse fenilpropanoide está relacionada a mecanismos antioxidantes, uma vez que há uma possível participação dos grupamentos sulfidril a promovido pelo estragol no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol.

Os resultados obtidos nesse estudo assemelham-se aos descritos na literatura para o cinamaldeído e eugenol (MATEEN et al., 2018), acetoxicamicina (MATSUDA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2014) e ácido sinapínico (KHATTAB et al; 2009. ANDRADE et al., 2017) em que os tratamentos aumentaram os níveis de GSH, quando comparados ao grupo controle.

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima presente na superfície da mucosa gástrica e participa da eliminação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peróxidos lipídicos nas células da mucosa gástrica. Sua atividade antioxidante se dá por meio da oxidação de duas moléculas de glutathione reduzida que pode ser reduzida posteriormente pela glutathione reductase com NADPH como agente redutor (LAWRENCE et al., 2016).

Diante dos resultados obtidos foi observado que no grupo controle negativo o etanol promoveu diminuição dos níveis de GPx em relação ao grupo fisiologicamente sadio (normal), entretanto, o estragol aumentou os níveis de GPx. Desse modo, pode-se inferir que a atividade gastroprotetora do estragol possivelmente está relacionada ao aumento da disponibilidade do sistema antioxidante. Esses resultados corroboram

com a possível participação da GSH promovido pelo estragol no modelo agudo de úlcera gástrica induzida por etanol.

Esse resultado assemelha-se ao estudo desenvolvido por Linn e colaboradores (2018) e Kolaj e colaboradores (2018) no qual os fenilpropanoides ácido gálico e ácido ferúlico, respectivamente, aumentaram os níveis de glutatona peroxidase, quando avaliados sob modelos que induzam o estresse oxidativo.

O malondialdeído (MDA) é um marcador biológico do estresse oxidativo que pode ser quantificado em lesões ulcerativas e inflamatórias do trato gastrointestinal. Ele é o produto da degradação de lipídeos (peroxidação lipídica), e sua presença em grande quantidade reflete a severidade do estresse oxidativo (JOCHMANN et al., 2008; SARANGARAJAN et al., 2017; JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2018).

A formação de MDA pela via não enzimática baseia-se na geração de hidroperóxidos a partir de ácidos graxos insaturados presentes na membrana plasmática por causa da lesão celular modulada pelos radicais livres (SIDAHMED et al., 2013). Sua presença causa efeitos biológicos nocivos sobre o DNA, lipoproteínas e colágenos (ZULUAGA et al., 2016; SARANGARAJAN et al., 2017).

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que o estragol reduziu os níveis de MDA, inferindo que a gastroproteção promovida pelo estragol tem participação de mecanismos antioxidantes.

Esses resultados foram semelhantes aos descritos para os fenilpropanoides cinamaldeído e eugenol (ESWARAN et al., 2010; MATEEN et al., 2018), seringina (WEI et al., 2017) e *p*-cumarato (LIMA FILHO et al., 2018) em que reduziram os níveis de malondialdeído quando avaliado em modelos de lesão ulcerativas e inflamação intestinal.

A enzima mieloperoxidase (MPO) é secretada principalmente por neutrófilos e estocada em grânulos azurófilos citoplasmáticos, porém, também é secretada em menor quantidade por monócitos e macrófagos. Um dos efeitos principais da MPO e do seu produto final, o ácido hipocloroso, é a formação de espécies reativas, a exemplo das cloroaminas que estão envolvidas na produção de citocinas e ativação de quinases (JONES et al., 2016; SELDERS et al., 2017). Todos esses processos favorecem o aumento do dano na mucosa gástrica.

O presente estudo assemelha-se aos resultados observados para o *p*-cumarato (LIMA FILHO et al., 2018), a acetoxicamicina (MATSUDA et al., 2003;

OLIVEIRA et al., 2014) e o ácido sinapínico (KHATTAB et al; 2009), em que também reduziram os níveis de MPO e a infiltração neutrofílica, o que pode-se inferir a participação do mecanismo antioxidante na gastroproteção mediada pelo estragol.

O próximo passo do estudo foi avaliar uma possível atividade imunorregulatória do estragol.

O etanol ao induzir lesões gástricas, estimulam uma resposta inflamatória aguda mediada por eosinófilos e mastócitos que por meio da liberação de citocinas, quimiocinas e substâncias químicas neuroativas alteram o fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular, a produção de radicais livres, a motilidade e a sensibilidade gastrointestinal que estão envolvidos nos processos iniciais de inflamação aguda e na formação de úlceras gástricas (SAGUN et al., 2017).

Uma vez que a mucosa gástrica foi lesada, o processo inflamatório foi ativado, aumentando assim os mediadores inflamatórios, a exemplo do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que regula a expressão de genes envolvidos na respostas anti-inflamatórias e imune além de intensificar a produção de citocinas pró-inflamatórias a exemplo do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e da interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (WANG et al., 2018).

O TNF- $\alpha$  estimula a infiltração de neutrófilos e a apoptose de células epiteliais, reduz a microcirculação gástrica em torno da região da úlcera e atrasa a cicatrização da úlcera gástrica. A expressão exacerbada de IL-1 $\beta$  contribui para a formação de úlcera e estimula a produção de mais TNF- $\alpha$  (LIU et al., 2016; WANG et al., 2018).

A IL-10 é uma citocina que sinaliza resposta anti-inflamatória, diminuindo as respostas imune mediadas por células pró-inflamatórias e em respostas inflamatórias citotóxicas (LIU et al., 2016). Seu mecanismo de ação se dá por meio da inibição da retroalimentação do TNF- $\alpha$  e conseqüente diminuição das inflamações do tecido gástrico (EAMLAMNAM et al, 2006; NIU et al., 2016).

Diante dos resultados obtidos, constatou-se que no grupo controle houve um aumento dos níveis das citocinas inflamatórias, IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$ , seguido de uma diminuição dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 quando comparado ao grupo sadio. Entretanto, quando tratado com estragol, os níveis de IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  reduziram enquanto que os níveis de IL-10 voltaram ao nível basal, verificando que a substância teste possui efeito imunomodulador, e esse efeito está associado com a regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias (MATEEN et al., 2018).

Esses dados corroboram aos estudos imunomoduladores de outros fenilpropanoides como ácido sinapínico (KHATTAB et al., 2010), curcumina (ZHANG et al., 2006; WANG et al., 2010) em que foram capazes de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Além disso, esse estudo também assemelha-se aos encontrados para a acetoxicamicina (MATSUDA et al., 2003) e o ácido sinapínico (KHATTAB et al.; 2009), em que promoveram o aumento de expressão de IL-10 quando avaliados em modelos de inflamação. Outros estudos conduzidos por Mateen e colaboradores (2018) demonstraram efeitos semelhantes dos fenilpropanoides cinamaldeído e eugenol, em que reduziram os níveis das citocinas pró-inflamatória IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  e restabeleceram os níveis de IL-10 e IL-4, em um modelo de indução de inflamação.

Deste modo, é possível verificar a importância da imunomodulação nos mecanismos dos fenilpropanoides, os quais são considerados potentes anti-inflamatórios (MATEEN et al., 2018).

A partir desses resultados, o próximo passo foi avaliar a modulação do estragol em alvos proteicos envolvidos diretamente em processos inflamatórios da mucosa gástrica, a exemplo da sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) e da ciclooxigenase 2 (COX-2)

Os processos inflamatórios da mucosa gástrica são desencadeados pelo aumento da permeabilidade da barreira epitelial aos antígenos presentes no lúmen, ativando o sistema imunológico da mucosa de modo inadequado. Esses eventos propiciam a ativação e o influxo de neutrófilos e macrófagos com produção de mediadores inflamatórios, como as espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas, resultando na expressão de moduladores da resposta inflamatória, a exemplo da enzima sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) (SINGH et al., 2016).

A enzima sintase de óxido nítrico constitutiva (cNOS) é modulada pelo complexo cálcio-calmodulina e está localizada nos neurônios (nNOS) ou no endotélio vascular (eNOS). Essas enzimas produzem baixos níveis de NO, responsável pela produção de GMP<sub>c</sub> em vários locais do organismo, incluindo o trato gastrointestinal. Entretanto, a iNOS é induzida pelas citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , interferon  $\gamma$  e produz grande quantidade de NO, que por sua vez, em altos níveis é potencieamente tóxico, estando presente no estresse oxidativo, na deficiência do sistema antioxidante e apresenta potente ação na adesão de leucócitos e quimiotaxia (SÁ et al., 2014).

Diante dos resultados obtidos, a redução da expressão de iNOS sugere que a atividade gastroprotetora do estragol não estimula sua expressão, acentuando sua atividade anti-inflamatória. Nos resultados anteriores, foi observado a possível participação do NO como mecanismo de gastroproteção, em consequência deste resultado, pode-se inferir ainda que a estimulação do NO promovida pelo estragol pode estar relacionada com a expressão de sintase do óxido nítrico constitutiva.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram aos estudos imunomoduladores dos fenilpropanoides ácido cinâmico (TUNG et al., 2008; KONG et al., 2009), acetato de cinamilo (TUNG et al., 2008; SÁ et al., 2014) e anetol (KANG et al., 2013; DOMICIANO et al., 2013) que também reduziram a expressão da iNOS em modelos animais de inflamação aguda.

Um sistema complexo de moduladores da mucosa gástrica contribui para o processo de defesa da mucosa, dentre eles, destacam-se as prostaglandinas (TAKEUCHI, 2010). Inicialmente, a COX-1 era considerada de forma constitutiva, enquanto que a COX-2 produzia prostaglandinas pró-inflamatórias, porém estudos demonstram que ambas isoenzimas contribuem para a defesa da mucosa gástrica (TAKEUCHI, 2010; TARNAWSKI 2013).

A COX-2 está envolvida na formação da PGE<sub>2</sub> que agem em seus receptores nas células da mucosa gástrica, orquestrando processos como inibição da secreção ácida, aumento na produção de muco e bicarbonato e aceleração da cicatrização da úlcera (TAKEUCHI, 2010; TARNAWSKI 2013), a partir disso, o próximo passo foi avaliar se o estragol aumenta a expressão de COX-2 na mucosa gástrica.

Diante dos resultados obtidos observou-se aumento da expressão de COX-2, sugerindo que a atividade gastroprotetora do estragol possivelmente estimula a expressão de COX-2. De acordo com resultados anteriores, pode-se inferir como um dos possíveis mecanismo de ação do estragol a via da COX, produzindo prostaglandinas que se ligam aos receptores nas células caliciformes e aumentam a produção de muco e bicarbonato (via COX→PGs→Muco).

Esses resultados corroboram aos estudos desenvolvidos por Tung e colaboradores (2008), Kang e colaboradores (2013) e Sá e colaboradores (2014) em que verificaram o aumento da expressão de COX dos fenilpropanoides ácido cinâmico, anetol e asarona, respectivamente, quando avaliados em modelos de indução de inflamação.

Diante dos resultados expressos, é possível concluir que o estragol possui atividade gastroprotetora, sendo esta atividade relacionada a mecanismos citoprotetores, tais como a participação dos grupamentos sulfidrilícos, óxido nítrico, secreção de muco e prostaglandinas além de apresentar efeito antissecretório, antioxidante e imunorregulatório.

*CONCLUSÃO*

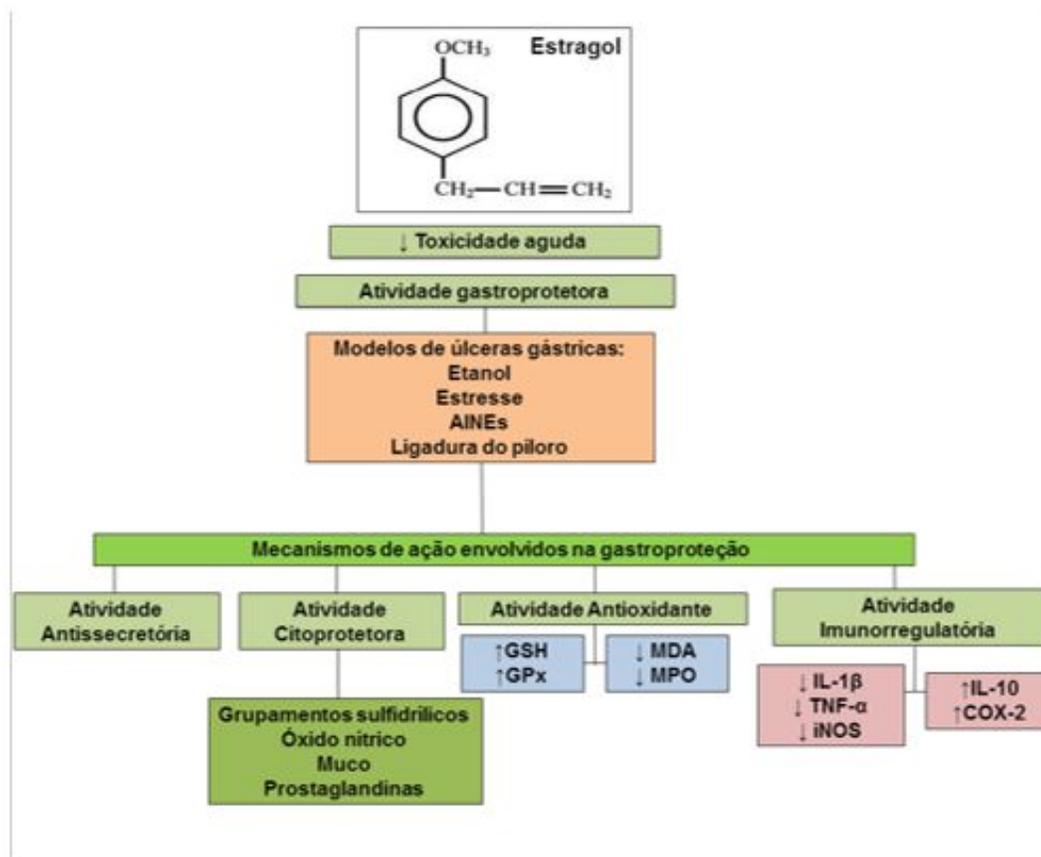
## 7.0 CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos para o fenilpropanoide estragol, frente aos diferentes modelos de indução aguda que reproduzem as úlceras gástricas no homem é possível concluir que:

- O estragol apresentou baixo grau de toxicidade aguda quando administrada por via oral nas condições experimentais avaliadas;
- Apresentou atividade gastroprotetora, nas diferentes doses testadas, frente aos protocolos de indução aguda de úlcera;
- A atividade gastroprotetora do estragol pode envolver mecanismos inibitórios da secreção ácida gástrica (antissecretórios), entretanto não modifica o pH ou a concentração de íons  $H^+$ ;
- A atividade gastroprotetora do estragol está relacionada a mecanismos citoprotetores com a participação dos grupamentos sulfidrílicos, óxido nítrico, aumento de secreção de muco e prostaglandinas;
- A atividade gastroprotetora do estragol também está relacionada a mecanismos antioxidantes e imunorregulatórios.

Na figura 28 está esquematizado as respostas encontradas nos modelos agudos de úlcera gástrica na investigação do efeito gastroprotetora do estragol para elucidar os mecanismos de ação da substância testada.

**Figura 28:** Representação esquemática das atividades farmacológicas encontradas para o estragol em modelos animais com ratos ou camundongos



Legenda: AINEs, Anti-inflamatórios Não Esteroidais; GSH, Glutathiona reduzida; GPx, Glutathiona reduzida; MDA, Malondialdeido; MPO, Mieloperoxidase; IL-1 $\beta$ , Interleucina 1 beta; TNF- $\alpha$ , Fator de necrose tumoral alfa; iNOS, sintase do óxido nítrico induzível; IL-10, Interleucina 10; COX-2, Ciclooxygenase 2.

0 PERSPECTIVAS

FUTURAS

## 8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS

Mesmo o estragol apresentando baixa toxicidade no modelo avaliado de toxicidade aguda, se faz necessário avaliar sua toxicidade em modelos de doses repetidas, bem como avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos para garantir a segurança do seu uso.

A partir dos resultados favoráveis do estragol na avaliação da atividade gastroprotetora, faz-se necessário investigar outros possíveis mecanismos de ação, tais como:

- Investigar o efeito cicatrizante no modelo de indução de úlceras gástricas por ácido acético e buscar os fatores envolvidos no processo de cicatrização da úlcera;
- Quantificação de outras citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias;
- Quantificar outros mecanismos antioxidantes (Catalase e superóxido dismutase).

Além disso, investigar a provável atividade em outros modelos experimentais de doenças que acometem o trato gastrointestinal, já que os mecanismos percorridos também afetam de modo positivo as outras doenças.

*REFERÊNCIAS*

*BIBLIOGRÁFICAS*

## 9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, K. The worldwide trend of using botanical dSHENugs and strategies for developing global drugs. v. 50, n. 3, p. 111–116, 2017.

AIHARA, E. et al. Trefoil Factor Peptides and Gastrointestinal Function. **Annual Review of Physiology**, v. 79, p. 357-380, 2017.

ALBURQUERQUE, A. A.; SORENSON, A. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **Journal Ethnopharmacol** 1995; 49: 41-49,

ALMASAUDI, S. B. et al. Manuka Honey Exerts Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities That Promote Healing of Acetic Acid-Induced Gastric Ulcer in Rats. v. 2017, p. 1–13, 2017.

ANDRADE, T. U.; BRASIL, G. A. ENDRINGER, D. C.; NÓBREGA, F. R.; SOUSA, D. P. Cardiovascular Activity of the Chemical Constituents of Essential Oils. **Molecules**, v. 22, p. 1539, 2017.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Versão 2**, p. 1–48, 2013.

ARUNACHALAM, K. et al. Chemical characterization, toxicology and mechanism of gastric antiulcer action of essential oil from *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms in the in vitro and in vivo experimental models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 292-306, 2017.

ASHFORD, M. Gastrointestinal tract–physiology and drug absorption. **Aulton's Pharmaceutics E-Book: The Design and Manufacture of Medicines**, p. 300, 2017.

ASSIS, D. B. Efeito antinociceptivo do fenilpropanoide 2-alilfenol. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba, 2016.

ATHAYDES, B. R. et al. NU. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. **Food Research International**, 2018.

AVMA. Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. 2013. Disponível em: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>>. Acesso em abril de 2018.

AWAAD, A. S. et al. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer, *Journal of Saudi Chemical Society*, Al-Kharj, v. 17, p. 101-124, 2013.

BAFNA, P. A.; BALARAMAN, R. Effect of activit, a herbomineral formulation, on experimentally-induced gastric lesions in rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** v. 1, n. 10, p. 134-139, 2011.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.446- 75, 2008.

BAMIAS, G.; ARSENEAU, K. O.; COMINELLI, F. Cytokines and mucosal immunity. p. 547–552, 2014.

BAMIAS, G.; COMINELLI, F. Cytokines and intestinal inflammation. p. 437–442, 2016.

BANSIL, R.; TURNER, B. S. Mucin structure , aggregation , physiological functions and biomedical applications. v. 11, p. 164–170, 2006.

BASTAKI, S. M. A. et al. Effect of Aspirin and ibuprofen either alone or in combination on gastric mucosa and bleeding time and on serum prostaglandin E2 and thromboxane A2 levels in the anaesthetized rats in vivo. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 438, n. 1-2, p. 25- 34, 2017.

BATISTA, L. M. et al. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.

BATISTA, L. M. et al. Gastroprotective effects (in rodents) of a flavonoid rich fraction obtained from *Syngonanthus macrolepis*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 66,n. 3, p. 445-452, 2015.

BATISTA, L. M. et al. Ulcer healing and mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of fractions obtained from *Syngonanthus arthrotrichus* and *Syngonanthus bisulcatus*, *Complementary and Alternative Medicine* v, 15, n. 391, p. 1-9, 2016.

BATISTA, L.M et al. Ulcer healing and mechanism(s) of action involved in the gastroprotective activity of fractions obtained from *Syngonanthus arthrotrichus* and *Syngonanthus bisulcatus*. *BMC Alternative and Complementary Medicine*, v. 15, n. 1,p.391-400, 2016.

BERNARDO, G. D. O.; BERNARDO, C. D. O. ARTIGO ORIGINAL DUODENAL ULCER IN TWO RENOWNED MEDICAL CENTERS IN THE FAR-SOUTH. v. 46, n. 3, p. 59–69, 2017.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. *Berne & Levy : Fisiologia*. Rio de Janeiro : Elsevier, 2009.

BERRIDGE, M. Cellular processes. *Cell Signalling Biology*, v. 2014 (1), p. 95- 101, 2014.

BHALA, N. et al., *Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials*. Oxford, 2013.

BHATIA, V.; TANDON, R. K. Stress and the gastrointestinal tract. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 20, 332–339, 2005.

BHATTACHARYYA, A. et al. OXIDATIVE STRESS : AN ESSENTIAL FACTOR IN THE PATHOGENESIS OF GASTROINTESTINAL MUCOSAL DISEASES. p. 329–354, 2014.

BIANCHI, D. H. A.; HAENEM, G. R. M. M. The paradoxical influence of the pKa on the reactivity of thiols and its biological relevance. **MaRBL**e **Research Papers**, v. 2, p. 222-231, 2016.

BINU, P., GIFTY, K., VINEETHA, R. C., ABHILASH, S., ARATHI, P., & NAIR, R. H. Eugenol, a plant-derived phenolic nutraceutical, protects thiol (SH) group in myocardium from ROS-mediated oxidation under chemotherapeutic stress induced

by arsenic trioxide – a in vivo model study. **Drug and Chemical Toxicology**, 41(3), 352–357, 2018.

BIRUKOVA, A. A. et al. Prostacyclin post-treatment improves LPS-induced acute lung injury and endothelial barrier recovery via Rap1. **BBA - Molecular Basis of Disease**, p. 1–14, 2014. KE, Y. et al. Effects of prostaglandin lipid mediators on agonist-induced lung endothelial permeability and inflammation. p. 710–721, 2017.

BIRUKOVA, A. A. et al. Prostacyclin post-treatment improves LPS-induced acute lung injury and endothelial barrier recovery via Rap1. **BBA - Molecular Basis of Disease**, p. 1–14, 2015.

BLUNDELL, S. et al. Chronic fatigue syndrome and circulating cytokines : a systematic review. 2015.

BOCKERSTETT, K. A.; DIPAOLO, R. J. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. 2017. OF, G. F. The cytokines: an overview. 2017.

BOECKXSTAENS, G. et al. Fundamentals of Neurogastroenterology : **Gastroenterology**, v. 150, n. 6, p. 1292–1304.e2, 2016.

BOEING, T. et al. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. *Journal of ethnopharmacology*, v. 184, p. 196–207, 2016.

BONFANTI, D. H. et al. ATP-dependent potassium channels and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry**, 2015.

BOUTEMINE, I. et al. Author ' s Accepted Manuscript. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.

BRAGA, M. P.; BONA, C. DE; INÊS, A. Inibidores da bomba de prótons : Revisão e análise farmacoeconômica Proton Pump Inhibitors : Review and Analysis *Pharmacoeconomic*. p. 19–32, 2011.

BRANNEN, K. C. et al. Alternative Models of Developmental and Reproductive Toxicity in Pharmaceutical Risk Assessment and the 3Rs. **ILAR journal**, v. 57, n. 2, p. 144-156, 2016.

- BREGONZIO, C. et al. Anti-inflammatory effects of angiotensin II AT 1 receptor antagonism prevent stress-induced gastric injury. v. 20892, p. 414–423, 2003
- BROOKES, S.J.; SPENCER, N.J.; COSTA M, et al. Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*;10:286–296 2013.
- BROWNLEE, I. The impact of dietary fibre intake on the physiology and health of the stomach and upper gastrointestinal tract. v. 4, p. 155–169, 2014.
- BRUNTON, L.L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. Goodman & Gilman: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- CALCABRINI, C. et al. Effect of extremely low-frequency electromagnetic fields on antioxidant activity in the human keratinocyte cell line NCTC 2544. Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino Carlo Bo, Urbino, Italy, 2016.
- CAMPBELL, I. Gut motility and its control. **MPAIC**, v. 16, n. 1, p. 40–42, 2015.
- CHEBOTAREVA, N. et al. Heat shock proteins and kidney disease: perspectives of HSP therapy. *Cell Stress and Chaperones*, v. 22, n. 3, p. 319-343, 2017.
- CHEN, X. et al. Effects of Genetically Modified Milk Containing Human Beta-Defensin-3 on Gastrointestinal Health of Mice. p. 1–18, 2016.
- CHOI, E. et al. Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats. v. 47, p. 134–139, 2009.
- CHOU, S. et al. CLIC4 regulates apical exocytosis and renal tube luminogenesis through retromer- and actin-mediated endocytic trafficking. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–14, 2016.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytother Res**; 11: 299-304, 1997.
- COINER, H. SCHRÖDER, G.; WEHINGER, E.; LIU, C. G.; NOEL, J. P.; SCHWAB, W.; SCHRÖDER, J. Methylation of sulfhydryl groups: a new function for a family of small molecule plant O-methyltransferases. **The Plant Journal**. 46, 193–205, 2006.

COLAVITA, I. et al. Membrane Protein 4F2 / CD98 Is a Cell Surface Receptor Involved in the Internalization and Trafficking of Human  $\alpha$ -Defensin 3 in Epithelial Cells Article Membrane Protein 4F2 / CD98 Is a Cell Surface Receptor Involved in the Internalization and Trafficking of Human  $\alpha$ -Defensin 3 in Epithelial Cells. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 2, p. 217–228, 2015.

CORFIELD, A. P. Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1850, n. 1, p. 236- 252, 2015.

COSENTINO, R. M.; NORTE, M. C.; LAZARINI, C. A.; Estragole-induced behavioural changes in rats. **Phytother Res**; 18: 921-924, 2004

CRICHTON, R. Chapter 9 - Sodium and Potassium: Channels and Pumps. **Biological Inorganic Chemistry** (Third Edition). p. 261-288, 2019.

CUPERUS, T.; DIJK A, A. V.; DWARS, R. M.; HAAGSMAN, H. P. Localization and developmental expression of two chicken host defense peptides: cathelicidin-2 and avian  $\alpha$ -defensin 9. **Elsevier**, 2016.

CURRÒ, D. The Modulation of Potassium Channels in the Smooth Muscle as a Therapeutic Strategy for Disorders of the Gastrointestinal Tract. v. 104,2016.

DA SILVA, D. M., MARTINS, J. L. R., DE OLIVEIRA, D. R., FLORENTINO, I. F., DA SILVA, D. P. B., DOS SANTOS, F. C. A., & COSTA, E. A. Effect of allantoin on experimentally induced gastric ulcers: Pathways of gastroprotection. *European Journal of Pharmacology*, 821, 68–78, 2018.

DA SILVA, F. V. et al. Beta-cyclodextrin enhanced gastroprotective effect of (-)-linalool, a monoterpene present in rosewood essential oil, in gastric lesion models. **Naunyn- Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 389, n. 11, p. 1245-1251, 2016.

DEDING, U. et al. Perceived stress as a risk factor for peptic ulcers : **a register-based cohort study**. p. 1–12, 2016.

DELLAMEA, B. S. et al. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. p. 1–6, 2014.

- DIECKOW, J. et al. CXCR4 and CXCR7 Mediate TFF3-Induced Cell Migration Independently From the ERK1/2 Signaling Pathway. **Investigative ophthalmology Visual Science**, v. 57, n. 1, p. 56-65, 2016.
- DIXON, B. R. E. A. et al. IL-17a and IL-22 Induce Expression of Antimicrobials in Gastrointestinal Epithelial Cells and May Contribute to Epithelial Cell Defense against *Helicobacter pylori*. p. 1–19, 2016.
- DOMICIANO, T.P.; DALALIO, M.M.O.; SILVA, E.L.; RITTER, A.M.V.; ESTEVÃO-SILVA, C.F.; RAMOS, F.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* v. 386, p. 331–338, 2013.
- DONG, M. H.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. p. 599–606, 2006.
- DOSTAL, C. R. et al. Glial and tissue-specific regulation of Kynurenine Pathway dioxygenases by acute stress of mice. *Neurobiology of Stress*, v. 7, p. 1-15, 2017.
- DRINI, M. Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Australian prescriber*. volume 40 : number 3 : june 2017.
- DRO, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. p. 47–95, 2018.
- SARANGARAJAN, R. et al. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1111–1116, 2017.
- DUTRA, R. C., CAMPOS, M. M., SANTOS, A. R. S., & CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, 112, 4–29, 2016.
- EAMLAMNAM, K. et al. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 13, p. 2034–2039, 2006.
- ELSAYED, A. M. et al. Effect of dates on blood elements, glucose and lipid in human population hail, KSA. **International Journal of Current Research**, v. 8, n. 4, p. 29845- 29849. 2016.

ELSHAMY, A. I. et al. Soft coral *Cespitularia stolonifera* : New cytotoxic ceramides and gastroprotective activity. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 2, p. 105–114, 2017.

ELSHAZLY, S. M. et al. Chemico-Biological Interactions Hesperidin protects against stress induced gastric ulcer through regulation of peroxisome proliferator activator receptor gamma in diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, n. May, p. 153–161, 2018.

ERNST, M. et al. and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice Find the latest version : STAT3 and STAT1 mediate IL-11 – dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice. v. 118, n. 5, p. 1727–1738, 2008.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 407-21, 1990.

ESWARAN, B.M.; SURENDRAN, S.; VIJAYAKUMAR, M.; OJHA, S. K.; RAWAT, A. K. S.; RAO, C. V. Gastroprotective activity of leaves on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 128(2), 537–540, 2010.

EVANGELISTA, S.; SPA, M. R. Gastrointestinal Overview ☆. n. March, p. 1–5, 2013.

FALLAH, S.; SÉNICOURT, B.; BEAULIEU, J. F. Proliferation in the Gastrointestinal Epithelium. Editor(s): Leonard R. Johnson, *Encyclopedia of Gastroenterology*, Elsevier, 2018.

FARRÉ, R.; TACK, J. Food and Symptom Generation in Functional Gastrointestinal Disorders: Physiological Aspects. *The American Journal of GASTROENTEROLOGY*. Bélgica, 2013.

FAURE, P.; LAFOND, J. L. Measurement of plasma sulphhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: FAVIER, A. E. et al. *Analysis of free radicals in biological systems*. Basel: Birkhäuser Verlag, 237-48 p, 1995.

FEHER, J. *The Stomach*. *Quantitative Human Physiology*, 785–795, 2017.

FEITOSA, M. L. Investigação dos mecanismos de ação da atividade gastroprotetora de 1,4-cineol em modelos de úlcera gástrica em camundongos. Dissertação de mestrado. UFC. 2012.

FERREIRA, S. H.; MONCADA, S. Inhibition of prostaglandin synthesis augments the effects of sympathetic nerve stimulation on the cat spleen. British Pharmacological Society, 15th-17th September, 1971.

FOSSMARK, R.; JOHNSEN, G.; JOHANESSEN, E; et al. Rebound acid hypersecretion after long-term inhibition of gastric acid secretion. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21: 149–54.

FREIRE, R. S. et al. Synthesis and antioxidant , anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. v. 13, p. 4353–4358, 2005.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot*; 65: 1545-1560, 2002.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 5, p. 286–294, 2012.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience*. v. 5. p.1-20, 1980.

GHOSH, R. et al. NSAIDs and cardiovascular diseases: role of reactive oxygen species. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-25, 2015.

GOMES, A. S. et al. LPS from *Escherichia coli* protects against indomethacin-induced gastropathy in rats - Role of ATP-sensitive potassium channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 547, p. 136–142, 2006.

GOUGH, D. R.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. **Cell Death Dis**; 2(10): e213, 2011.

GUDIS, K.; SAKAMOTO, C. The Role of Cyclooxygenase in Gastric Mucosal Protection. **Digestive diseases and sciences**, v. 50, n. October, p. 16–23, 2005.

- GULATI, K.; RAI, N.; RAY, A. **Nitric Oxide and Anxiety**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc. v. 103, 2017.
- GUO, Z. The modification of natural products for medical use. v. 7, n. 2, p. 119–136, 2017.
- HAIGH, C.R.;TTWOOD, S.E.; THOMPSON, D.G. et al. Gastrin induces proliferation in Barrett's metaplasia through activation of the CCK2 receptor. *Gastroenterology* 2003; 124:615–25.
- HAM, M. et al. **Gastroduodenal Mucosal Defense**. Elsevier Inc., 2012.
- HAMAGUCHI, M. et al. Mechanisms and Roles of Neutrophil Infiltration in Stress-Induced Gastric Injury in Rats. v. 46, n. 12, p. 2708–2715, 2001. MU, Z. et al. Effect of explosive noise on gastrointestinal transit and plasma levels of polypeptide hormones. v. 12, n. 114, p. 2284–2287, 2006.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. for drug discovery in the genomics era. v. 14, n. February, 2015.
- HATTRUP, C. L.; GENDLER, S. J. Structure and Function of the Cell Surface (Tethered) Mucins. *Annu. Rev. Physiol.* v. 70. p. 431–57, 2008.
- HAVENS, J. M. et al. SC. **The American Journal of Surgery**, 2018.
- HEEBA, G. H. et al. Gastroprotective effect of simvastatin against indomethacin-induced gastric ulcer in rats: role of nitric oxide and prostaglandins. *European Journal of Pharmacology*, v. 607, n. 1, p. 188-193, 2009.
- HITZLER, I. et al. Caspase-1 Has Both Proinflammatory and Regulatory Properties in Helicobacter Infections, Which Are Differentially Mediated by Its Substrates IL-1  $\beta$  and IL-18. 2018.
- HOLZER, P. Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract. V. Acid sensing in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 292: pag. G699–G705, 2006.
- HOOGERWERF, W. A.; PASRICHA, P. J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico.

Em: Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10 ed. New York:Mc Graw Hill, p. 757-768, 2005.

HOWELL, M. D.; Novack, V.; Grgurich, P.; Soulliard, D.; Novack, L; Pencina, M.; Talmor, D. Iatrogenic Gastric Acid Suppression and the Risk of Nosocomial Clostridium difficile Infection. American Medical Association, 2010.

HSU, P. L. Histamine-2 Receptor Antagonist Cannot Prevent Recurrent Peptic Ulcers in Patients With Atherosclerotic Diseases Who Receive Platelet ADP Receptor Antagonist Monotherapy: A Randomized-Controlled, Double-Blind, and Double-Dummy Trial. ORIGINAL CONTRIBUTIONS. 2016.

HUBER, P. C. Revisão. v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008. PARRA, T. et al. Gastroprotective activity of Ent-beyerene Derivatives in mice: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls. **BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS**, 2015.

HUI, S.; FANGYU, W. ScienceDirect Protective effects of bilobalide against ethanol-induced gastric ulcer in vivo / vitro. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, 2017.

HUSSEIN, S.A. et al. Curcumin ameliorates Ethanol induced Gastric Mucosal Erosion in Rats via alleviation of Oxidative Stress and Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines and NF-kappa B activation. **Natural Science**, v. 4, n. 4, p. 466-476, 2016.

IBRAHIM, M. Y. et al. Acute toxicity and gastroprotection studies of a new schiff base derived Manganese (II) complex against HCl/Ethanol-induced gastric ulcerations in rats. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

INEU, R. P. et al. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats : Involvement of oxidative stress. v. 46, p. 3023–3029, 2008.

IPAVEC, V. et al. K V 7 channels regulate muscle tone and nonadrenergic noncholinergic relaxation of the rat gastric fundus. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 4, p. 397–409, 2011.

IUNKLAUS, L. F. ; ALMEIDA, R. S.; COMAR, F.M.S.S. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos isômeros anetol e estragol no modelo de artrite induzida por

zymosan. Universidade Estadual de Maringá /Centro Ciências da Saúde / Maringá, PR. 2018.

IWAI, T., ICHIKAWA, T., GOSO, Y., IKEZAWA, T., SAEGUSA, Y., OKAYASU, I., ... ISHIHARA, K. Effects of indomethacin on the rat small intestinal mucosa: immunohistochemical and biochemical studies using anti-mucin monoclonal antibodies. **Journal of Gastroenterology**, 44(4), 277–284, 2009.

JAESCHKE, H. et al. Antioxidant Defense Mechanisms q. v. 9, n. January 2017, p. 319–337, 2018. EUGENIA, B. et al. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. p. 599–609, 2009.

JAESCHKE, H. et al. Antioxidant Defense Mechanisms. *Comprehensive Toxicology*, v. 9, n. January 2017, p. 319–337, 2018.

JAIN, K. S. et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Pune, v. 15, p. 1181-1205. 2007

JENKINSON, D. H. Potassium channels – multiplicity and challenges. p. 63–71, 2006. DÍAZ-TRISTE, N. E. et al. Pharmacological evidence for the participation of NO – c GMP – K ATP pathway in the gastric protective effect of curcumin against indomethacin-induced gastric injury in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 730, p. 102–106, 2014.

JOCHMANN, N.; BAUMANN, G.; STANGL, V. Green tea and cardiovascular disease : from molecular targets towards human health. 2008.

JOHN, SR; et al. The Nasal Valve Dilemma. The Narrow Straw vs the Weak Wall. 2012.

JOHNSON, W. M. et al. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative. 2013.

JONES, H. R. et al. The role of neutrophils in inflammation resolution. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 2, p. 137–145, 2016.

JUDD, L. M. et al. BASIC – ALIMENTARY TRACT. p. 1073–1085, 2006.

JUNG, J.; LEE, J.H.; BAE, K.H.; JEONG, C.S. Anti-gastric actions of eugenol and cinnamic acid isolated from *Cinnamoni ramulus*. *Yakugaku Zasshi*, 131, 1103–1110, 2011.

JÜRGENS, S.; MEYER, F.; SPECHLER, S. J.; SOUZA, R. The Role of Bile Acids in the Neoplastic Progression of Barrett's Esophagus – A Short Representative Overview. *Gastroenterol.* v. 50. p. 1028–1034, 2012.

KANG, P.; KIM, K.Y.; LEE, H.S.; MIN, S.S.; SEOL, G.H. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Life Sci.** v. 93, p. 955–961, 2013.

KANG, Y.H.; KANG, J.S.; SHIN, H.M. Vasodilatory effects of cinnamic acid via the nitric oxide–cGMP–PKG Pathway in rat thoracic aorta. **Phytother. Res.** 2013, 27, 205–2011.

KANGWAN, N. et al. Quality of healing of gastric ulcers : Natural products beyond acid suppression. v. 5, n. 1, p. 40–47, 2014.

KANTO, E. D.; REHM, C. D; HAAS, J.S, et al. Trends in prescription drug use among adults in the United States from 1999-2012. *JAMA* 314:1818–31, 2015.

KE, Y.; OSKOLKOVA, O. V.; SARICH, N.; TIAN, Y; SITIKOV, A.; TULAPURKAR, M. E.; SON, S.; BIRUKOVA, A. A.; BIRUKOV, K. G. Effects of prostaglandin lipid mediators on agonist-induced lung endothelial permeability and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 313, pag. L710–L721, 2017.

KEMMERLY, T.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal Mucosal Defense. *Curr Opin Gastroenterol*, vol. 30, n° 3, pag. 583–588, 2014.

KEMMERLY, T.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. v. 29, n. 6, p. 642–649, 2012.

KENDALL, A.C. et al. The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L). *Planta*, v.159, 505-511p, 1983.

KHAN, R. A. Natural products chemistry : The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 5, p. 739–753, 2018.

KHATTAB, R.; ESKIN, M.; ALIANI, M. Determination of Sinapic Acid Derivatives in Canola Extracts Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, p. 147–155, 2010

KIM, J. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Protective effect of carbenoxolone on ER stress-induced cell death in hypothalamic neurons. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 4, p. 793–799, 2015.

KIM, S. et al. Antimicrobial effects of black rice extract on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbil. **Journal of Cereal Science**, v. 85, n. October 2018, p. 1–5, 2019.

KIVRAK, E. G. et al. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, n. 2010, p. 167-176, 2017.

KOLAJ, I.; LIYANAGE, S.I.; WEAVER, D. F. Phenylpropanoids and Alzheimer's disease: A potential therapeutic platform. **Neurochemistry International**, 120, 99–111, 2018.

KONG, Y.H.; LEE, Y.C.; CHOI, S.Y. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of phenolic compounds in *Panax ginseng* CA Meyer. **J. Ginseng. Res.** v. 33, p. 111–114, 2009

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*, v. 87, n.6, p. 1344–50, 1984.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010;

LABONNE, B. E. F. et al. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25 (6), p. 599-609, 2009.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41- 60, 2008.

LANAS, A.; CHAN, F. K. L. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10094, p. 613–624, 2017.

LANAS, A.; PANÉS, J.; PIQUÉ, J. M. Clinical Implications of COX-1 and / or COX-2 Inhibition for the Distal Gastrointestinal Tract. p. 2253–2266, 2003.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Analysis of the cold-water restraint procedure in gastric ulceration and body temperature. **Physiology & Behavior** 82 (2004) 827–833, 2004.

LAZAAR, S. et al. Effect of acute cigarette smoking on gastric contents in regular smoker volunteers . A prospective randomized cross-over study. v. 115, n. August, p. 590–594, 2015.

LEBDA, M. A. et al. Protective Effects of Miswak ( *Salvadora persica* ) against Experimentally Induced Gastric Ulcers in Rats. v. 2018, 2018.

LEE, B. et al. Anti-ulcerogenic Effect and HPLC Analysis of the Caffeoylquinic Acid-Rich Extract from *Ligularia stenocephala*. **Biol. Pharm. Bull.** 33(3); 493-497, 2011.

LEE, D. H. et al. Interleukin-32  $\gamma$  attenuates ethanol-induced liver injury by the inhibition of cytochrome P450 2E1 expression and inflammatory responses. v. 706, p. 695–706, 2017.

LEITE, J. S. M. et al. L-glutamine and L-alanine supplementation increase glutamineglutathione axis and muscle HSP-27 in rats trained using a progressive high-intensity resistance exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, v. 41, n. 8, p. 842-849, 2016.

LEOW, A. H. et al. Alimentary Pharmacology and Therapeutics Time trends in upper gastrointestinal diseases and *Helicobacter pylori* infection in a multiracial Asian population – a 20-year experience over three time periods. n. January, 2016.

LEUNG, A. M.; REDLAK, M. J.; MILLER, T. A. ScienceDirect Role of heat shock proteins in oxygen radical e induced gastric apoptosis. **Journal of Surgical Research**, v. 193, n. 1, p. 135–144, 2014.

LEVINE, R. J. A method for rapid production of stress ulcers in rats. In: C. J. PFEIFFER. **Peptic Ulcer**. Munksgaard, Copenhagen. p. 92-97, 1971.

- LEVORATO, S., DOMINICI, L., FATIGONI, C., ZADRA, C., PAGIOTTI, R., MORETTI, M., & VILLARINI, M. In vitro toxicity evaluation of estragole-containing preparations derived from *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) on HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.111, p. 616–622, 2018.
- LEWIS, O. L.; KEENER, J. P.; FOGELSON, A. L. mucus layer. p. 599–612, 2018.
- LI, W. et al. Immunobiology Protective effect of  $\alpha$ -amyronone against ethanol-induced gastric ulcer in mice. v. 220, p. 798–806, 2015.
- LI, Y. et al. Intra-gastric administration of heparin enhances gastric ulcer healing through a nitric oxide-dependent mechanism in rats. 2017.
- LIMA FILHO, A. C. M.; SILVA, I. S.; SOUSA, F. B. M.; DE SOUZA, L. K. M.; GOMES, B. DA S.; GONÇALVES, R. L. G.; OLIVEIRA, F. A. Inhibition of neutrophil migration and reduction of oxidative stress by ethyl p-coumarate in acute and chronic inflammatory models . **Phytomedicine**. 2018.
- LIMA, I. O. Avaliação farmacológica do extrato metanólico bruto e da fase n-butanólica obtida da espécie *Herissantia crispa* (L.) Brizicky em modelos animais frente à atividade antiulcerogênica. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), JoãoPessoa, 2008.
- LIN, H.Y.; CHANG, T.C.; CHANG, S.T. A review of antioxidant and pharmacological properties of phenolic compounds in *Acacia confusa*. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. v. 8, p. 443-450, 2018.
- LINDÉN, S. K.; FLORIN, T. H. J.; MCGUCKIN, M. A.;. Mucin Dynamics in Intestinal Bacterial Infection. v. 3, n. 12, 2008.
- LOMBARDO, L. et al. Increased Incidence of Small Intestinal Bacterial Overgrowth During Proton Pump Inhibitor Therapy. **YJCGH**, v. 8, n. 6, p. 504–508, 2010.
- LOPETUSO, L. R.; CHOWDHRY, S.; PIZARRO, T. T. Opposing functions of classic and novel IL-1 family members in gut health and disease. v. 4, n. July, p. 1–21, 2013.
- LYLE, N. et al. Stress modulating antioxidant effect of *Nardostachys jatamansi*. v. 46, n. February, p. 93–98, 2009.

MA, L. I.; WALLACE, J. L. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. n. March 2014, 2000.

MAGIEROWSKI, M. et al. Gaseous Mediators Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in the Mechanism of Gastrointestinal Integrity, Protection and Ulcer **Healing**. **Molecules**, v. 20 (5), p. 9099-9123, 2015.

MAHADEVAN, V. Anatomy of the stomach. **Surgery**, p. 8–11, 2017.

MAJEED, R. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Bakuchiol derivatives as novel and potent cytotoxic agents : A report. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 55–67, 2012.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K. L; MCCOLL, K. E. L. Peptic ulcer disease. *Lancet*, v. 374, p. 1449-61, 2009.

MATEEN, S.; SHAHZAD, S.; AHMAD, S.; NAEEM, S.S.; KHALID, S.; AKHTAR, K.;RIZVI, W.; MOIN, S. Cinnamaldehyde and eugenol attenuates collagen induced arthritis via reduction of free radicals and pro-inflammatory cytokines. **Phytomedicine**. 2018.

MATSE, J. H. et al. Mucoepidermoid carcinoma-associated expression of MUC5AC, MUC5B and mucin-type carbohydrate antigen sialyl-Tn in the parotid gland. *Archives of Oral Biology*, v. 82, 2017.

MATSUDA, H. et al. Gastroprotective effects of phenylpropanoids from the rhizomes of *Alpinia galanga* in rats: structural requirements and mode of action. **European Journal of pharmacology**, v. 471, p. 59–67, 2003

MATSUDA, H.; LI, Y., YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by mormodinic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sciences*, v. 65 (2), p.27-32, 1999.

MATSUI, H. et al. The pathophysiology of non steroidal anti inflammatory drug ( NSAID ) induced mucosal injuries in stomach and small intestine. *Journal of Clinical Biochemistry and nutrition*, v. 48, n. 2, p. 107–111, 2011.

MAYER, B. mecanismos envolvidos nas ações antiúlcera e anti-secretora ácida dos extratos da Salvia. 2007.

MCDONALD, S. W.; MACFARLANE, N. G. The mouth , stomach and intestines. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, p. 1–5, 2018.

MEDEIROS, J. V. R. et al. Role of the NO / cGMP / K ATP pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. n. August 2007, p. 721–727, 2008.

MEJIA, A.; KRAFT, W. K. Acid peptic diseases: Pharmacological approach to treatment. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 2, n. 3, p. 295-314, 2009.

MEMIC, F.; Knoflach, V.; Morarach, K.; Sadler, R.; Laranjeira, C.; Hjerling-Leffler, J.; Sundström, E.; Pachnis, V.; Marklund, U. Transcription and Signaling Regulators in Developing Neuronal Subtypes of Mouse and Human Enteric Nervous System . SC. 2017.

MERCER, D.W, ROBINSON, EK. Stomach. In: Townsend CM, editor. **Sabiston textbook of surgery**. 18th edition. Philadelphia: Saunders; p. 1226–38. 2008.

MILLER, T. A. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. **American Physiological Society**, 1983.

MIN, J.; MIN, K. Cumulative exposure to nighttime environmental noise and the incidence of peptic ulcer. **Environment International**, n. August, p. 0–1, 2018.

MIRANDA, A.M., LEMOS, M., ALVES COWART, K., RODENBURG, D., D. MCCHESENEY, J., RADWAN, M. M., ... KENUPP BASTOS, J. Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell. *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 421–429, 2015.

MITTAL, M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling* , v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 2014.

MIZUKAWA, Y. et al. Cellular distribution of pargolin , a chloride intracellular channel-related protein , in various tissues. p. 786–795, 2002.

- MOJŽIŠ, J. et al. Effect of Stobadine on Gastric Mucosal Injury After Ischaemia / Reperfusion. p. 399–403, 1996.
- MORAIS, S. M.; JÚNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; LEAL-CARDOSO, J. H. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do Nordeste do Brasil. *Química Nova*, 29: 907-910, 2006.
- MORIMOTO, Y. et al. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *JPN J. Pharmacol.*, v. 57, p. 495-505, 1991.
- MORSY, M. A. et al. Protective effects of nebivolol against cold restraint stress-induced gastric ulcer in rats: Role of NO, HO-1, and COX-1, 2. *Nitric Oxide*, v. 27, n. 2, p. 117-122, 2012.
- MORSY, M.A.; FOUAD, A.A. Mechanisms of gastroprotective effect of eugenol in indomethacin-induced ulcer in rats. ***Phytother. Res.*** 22, 1361–1366, 2008.
- MULHOLLAND, M.W. Gastric anatomy and physiology. *Greenfield's surgery: scientific principles and practice*. 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; p. 712–20, 2006.
- MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. v. 13, p. 1–13, 2009.
- NAITO Y, KASHIWAGI K, TAKAGI T, et al. Intestinal dysbiosis secondary to protonpump inhibitor use. *Digestion*;97:195–204, 2018.
- NAJM, W. I. Peptic Ulcer Disease. ***Primary Care Clinics in Office Practice***, v. 38, n. 3, p. 383–394, 2011.
- NAUNTON, M.; PETERSON, G.M; DEEKS, L.S; et al. We have had a gutful: the need for deprescribing proton pump inhibitors. *J Clin Pharm Ther* 2018;43:65–72.
- NEIL, D. H. R. O. Gastric disorders : modifications of gastric content , antacids and drugs influencing gastric secretions and motility. p. 1–5, 2017.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. 2016.

- NIETO, Y. B. Úlcera péptica. *Medicine*, v. 11 (3), p. 137-141, 2012
- NISHIZAWA, T. et al. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Chloride Intracellular Channel-related Protein , Parchorin , Expressed in Water-secreting Cells \*. v. 275, n. 15, p. 11164–11173, 2000.
- NIU, W. et al. A Causal Role of Genetically Elevated Circulating. v. 95, n. 7, p. 1–10, 2016.
- NOBLE, M. J. The New Dangers of Electronic Cigarettes PT NU SC. **Clinical Pediatric Emergency Medicine**, 2017.
- NOTT, A. et al. developing neurons Nitric oxide-mediated epigenetic mechanisms in developing neurons ND ES OS ST. v. 4101, 2009.
- O'SHEA, J.; GADINA, M.; SIEGEL, M. R. Cytokines and Cytokine Receptors. Atheneu, 2019.
- OCHMANN, M. et al. Light-induced radical formation and isomerization of an aromatic thiol in solution followed by time-resolved X-ray absorption spectroscopy at the Sulfur K-edge Light-induced radical formation and isomerization of an aromatic thiol in solution followed by time-resolved X-ray absorption spectroscopy at the Sulfur. **K-edge**. 2017.
- OECD, Acute Oral Toxicity-Acute Toxic. **OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS**, 2001.
- OKAMOTO, C. T.; ASANO, S.; SAKAI, H. **The Cell Biology of Gastric Acid Secretion**. Sixth Edition, 2018.
- OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A proton-pump inhibitor expedition : the case histories of omeprazole and esomeprazole. v. 2, n. February, 2003.
- OLINDA, T. M. et al. Quebrachitol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide and K<sup>+</sup> ATP channels. **Phytomedicine**, v.15, n. 5, p.327-333, 2008.

- OLIVEIRA, A. F. de et al. Estimativa da prevalência e da mortalidade por complicações da úlcera péptica, Brasil, 2008: uma proposta metodológica. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24, n.1, p. 145-154, mar. 2015.
- OLIVEIRA, F., ANDRADE, L., DE SOUSA, É., & DE SOUSA, D. Anti-Ulcer Activity of Essential Oil Constituents. **Molecules**, 19(5), 5717–5747, 2014.
- OVERMIER, J. B.; MURISON, R. Anxiety and helplessness in the face of stress predisposes , precipitates , and sustains gastric ulceration. v. 110, p. 161–174, 2000.
- PALIWAL, P et al. Pharmacological application of barium containing bioactive glass in gastro-duodenal ulcers. *Materials Science & Engineering C*. 30 June 2018
- PARRA, T. et al., Gastroprotective activity of Ent-beyerene Derivatives in mice: effects on gastric secretion, endogenous prostaglandins and non-protein sulfhydryls. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015.
- PAUL. E.; STROMBERG, C. M. Coopersmith, Epithelium, Proliferation of, Editor(s): Leonard R. Johnson, *Encyclopedia of Gastroenterology*, Elsevier, p 725–730, 2004.
- PAWLIK, M. W. et al. The renin-angiotensin system and its vasoactive metabolite angiotensin- ( 1-7 ) in the mechanism of the healing of preexisting gastric ulcers . The involvement of mas receptors , nitric oxide , prostaglandins and proinflammatory cytokines. p. 75–91, 2016.
- PEEK JR, R. M.; CRABTREE, J. E. Helicobacter infection and gastric neoplasia. *Journal of Pathology J Pathol* 2006; 208: 233–248, 2006.
- PERO, R. et al.  $\beta$  -Defensins in the Fight against Helicobacter pylori. p. 1–17, 2017.
- PESKAR, B. M.; EHRLICH, K.; PESKAR, B. A. Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in Prostaglandin- Mediated Gastroprotection in the Rat. v. 301, n. 3, p. 969–974, 2002.
- PETRYSZYN, P. W.; WITCZAK, I. Costs in inflammatory bowel diseases. v. 11, n. 1, 2016.

POLAT, A. et al. The biochemical and histopathological effects of salusin alpha and salusin beta on cold restricted stress induced gastric injury. *Medicine*, v. 6, n. 2, p. 236-41, 2017.

PONTE, E. L.; SOUSA, P. L.; ROCHA, M. V.; SOARES, P. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. *Pharmacol Rep*; 64: 984-990, 2012.

PUSCAS, I. et al. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam induced gastroduodenal lesions. *Arzneimittelforschung*, v. 47, p. 568-572, 1997.

QIN, C. et al. Responses and afferent pathways of C 1 – C 2 spinal neurons to gastric distension in rats. v. 104, p. 128–136, 2003.

QUINTANA-HAYASHI, M. P.; PADRA, M.; LIND, S. K. Mucus-Pathogen Interactions in the Gastrointestinal Tract of Farmed Animals. p. 1–21, 2018.

R&D CHEMICALS, ESTRAGOLE. Disponível em:  
[http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol\\_id=7782](http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7782) Acesso em 12/08/2017.

RADOVANOVIC, T. B. et al. Glutathione-dependent enzyme activities and concentrations of glutathione, vitamin E and sulfhydryl groups in barbel (*Barbus barbus*) and its intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). Elsevier. 2015.

RAFATULLAH, S. et al. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 29, p 25-34, 1990.

RAMSAY, P.T. ; CARR, A. Gastric acid and digestive physiology. *Surg Clin North Am*, v.91, p. 977-982, 2011.

RANG, H. P. et al. Rang & Dale: Pharmacology. China: Elsevier, 2016, 8ª ed., cap 367 -379. 2016.

RENÉ, M. M. A.; CEES, T. B. M. D.; Ger, H. K. Proton Pump Inhibitors Reduce the Frequency of Phlebotomy in Patients With Hereditary Hemochromatosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**; v.14, p. 147–152, 2016

RENS, H et al., Sensitization of Rat Alveolar Macrophages to Enhanced TNF- $\alpha$  Release by in Vivo Treatment with Dexamethasone. *Cellular immunology* 14,249-257 1992.

RIBEIRO, A. R. S. Efeito gastroprotetor da baicaleína na Mucosa gástrica de camundongos. 66 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas - Universidade Federal de Sergipe, Sergipe. 2017.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol 31, pag. 986-1000, 2011.

ROBERT, A, et al. Cytoprotection by Prostaglandins in Rats. *Gastroenterology* 77:433-443,1979.

RODRIGUES, L. B. et al. Anti-inflammatory and antiedematogenic activity of the *Ocimum basilicum* essential oil and its main compound estragole: In vivo mouse models. *Chemico-Biological Interactions*, v 257. Pag 14-25, 2016.

RODRIGUES, P.A. et al. Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxybarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol- induced gastric lesiona in mice. *J. Ethnopharmacol.*, v. 127, p. 725-730, 2010.

ROZZA, A. L. et al. The gastroprotective effect of menthol: involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. 86686, 2014.

SÁ, R.C.S; ANDRADE, L. N.; OLIVEIRA, R.R.B.; SOUSA, D.P. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **Molecules** p. 1459-1480; 2014.

SAHOO, N. et al. Gastric Acid Secretion from Parietal Cells Is Mediated by a  $Ca^{2+}$  Efflux Channel in the Article Gastric Acid Secretion from Parietal Cells Is Mediated by

a Ca<sup>2+</sup> + Efflux Channel in the Tubulovesicle. **Developmental Cell**, v. 41, n. 3, p. 262–273.e6, 2017.

SANTIN, J. R. et al. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Volume 383, Issue 2, pp 149–158, February 2011

SANTIN, J. R., LEMOS, M., KLEIN-JÚNIOR, L. C., MACHADO, I. D., COSTA, P., DE OLIVEIRA, A. P., ANDRADE, S. F. Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 383(2), 149–158, 2010.

SANTOS, V. L. Avaliação da atividade antiulcerogênica, antidiarréica e antiespasmódica do extrato etanólico bruto e fase acetato de etila obtidos da entrecasca do caule de *Maytenus rigida* mart. ( Celastraceae) em modelos animais. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, 2008.

SARANGARAJAN, R. et al. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1111–1116, 2017.

SAX, N.I. *Dangerous Properties of Industrial Materials*, 11th ed.; Lewis, R.J., Sr., Ed.; **Wiley-Interscience**; Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA; p. 1735, 2004.

SAXENA, B.; SINGH, S. Comparison of three acute stress models for simulating the pathophysiology of stress-related mucosal disease. v. 11, n. 2, p. 98–103, 2017.

PIRES, G. et al. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. v. 55, p. 48–55, 2013.

SAXENA, B.; SINGH, S. Comparison of three acute stress models for simulating the pathophysiology of stress-related mucosal disease. v. 11, n. 2, p. 98–103, 2017

SCHEIMAN, J. M. NSAID-induced gastrointestinal injury: A focused update for clinicians. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 50, n. 1, p. 5-10, 2016

SCHUBERT, M. L. Functional anatomy and physiology of gastric secretion. p. 479–485, 2015.

SCHUBERT, M. L. Gastric acid secretion. v. 32, n. 6, p. 452–460, 2016.

SCHUBERT, M. L. Gastric exocrine and endocrine secretion. 2009. GYIRES, K.; NÉMETH, J.; ZÁDORI, Z. S. Gastric Mucosal Protection And Central Nervous System. p. 34–39, 2013.

SCHUBERT, M. L. Gastric exocrine and endocrine secretion. *Current Opinion in Gastroenterology*. 25:529–536, 2009,

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. v. 30, n. 6, p. 578–582, 2014.

SCHUBERT, M. L. regulation of gastric acid secretion. 2017.

SELDERS, G. S. et al. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regenerative Biomaterials**, v. 4, n. 1, p. 55–68, 2017.

SEPULVEDA, B. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Gastroprotective activity of synthetic coumarins: Role of endogenous prostaglandins , nitric oxide , non-protein sulfhydryls and vanilloid receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 23, p. 5732–5735, 2016.

SHAO, Y.; BAO, J. **8 - Rice phenolics and other natural products**. [s.l.] AACCI. Published by Elsevier Inc. in cooperation with AACC International, 2019.

SHAY, H. et al. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol.*, v. 5, p. 43-61, 1945.

SHEEHAN, J. K. et al. glycoprotein whether isolated from cell culture or in vivo from respiratory mucous secretions. v. 44, p. 37–44, 2000.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, [s.l.], v. 163, n. 6, p.1297-1300, Elsevier . dez. 2015.

SHEN, J.; XIAO, Z. Cathelicidin in Gastrointestinal Disorders. p. 61–76, 2018.

- SHINDLER, T. et al. Helicobacter pylori infection and prevalence of stroke. n. October, p. 1–7, 2018.
- SIDAHMED, H. M. A. et al., Anti-ulcerogenic activity of dentatin from Clausena excavata Burm.f.against ethanol-induced gastric ulcer in rats: possible role of mucus and anti-oxidant effect. Phytomedicine. 19 June 2018.
- SIKIRIC, P. et al. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on NG-nitro-L- arginine methylester and L-arginine effect on stomach mucosa integrity and blood pressure. Euro. J. Pharm., v. 332, p. 23-33, 1997.
- SILVA-ALVES, K. S. et al. Estragole blocks neuronal excitability by direct inhibition of Na<sup>+</sup> channels. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 46: 1056-1063, 2013.
- SILVERTHORN, D.U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 5<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- SINGH, P. K.; HOLLINGSWORTH, M. A. Cell surface-associated mucins in signal transduction. v. 16, n. 9, 2006.
- SINGH, P; BHIMJI, S. S. Antacids. StatPearls Publishing. 2018
- SINHA, M. et al. Current Perspectives in NSAID-Induced Gastropathy. Mediators of inflammation, v. 2013, 2013.
- SMITH, R. L. et al. Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances — methyl eugenol and estragole. v. 40, p. 851–870, 2002.
- SOARES, P. M.; LIMA, R. F.; DE FREITAS, P. A.; SOUZA, E. P.; ASSREUY, A. M.; CRIDDLE, D. N. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channels. Life Sci; 81: 1085-1093, 2007
- SOKMEN, M. et al. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from Geranium sanguineum L. v. 76, p. 2981–2993, 2005.
- SONNENBERG, A. Alimentary Pharmacology and Therapeutics Review article : historic changes of Helicobacter pylori -associated diseases. 2013.

SPECHLER, S. J. P r o t o n P u m p I n h i b i t o r s What the Internist Needs to Know. **Medical Clinics of NA**, p. 1–14, 2018.

STEWART, D. J.; ACKROYD, R. Peptic ulcers and their complications, Oesophagus and stomach, v. 29, n. 30, p. 568-574, 2011.

SUNDARAM, C. S.; RAO, U. S. M. *Invivo* gastric antiulcer activity of syringin (phenyl propanoid glucoside) studied in different ulcer induced experimental rat models. **Der Pharmacia Lettre**, 8 (1):121-128, 2016.

SURDEA-BLAGA, T. et al. Mucosal Protective Compounds in the Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease . A Position Paper Based on Evidence of the Romanian Society of Neurogastroenterology. v. 25, n. 4, p. 537–546, 2016.

SUZUKI, H. et al. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *Journal of Clinical Biochemistry and nutrition*, v. 50, n. 1, p. 35–39, 2012

TAKEUCHI, K.; AMAGASE, K. Roles of prostaglandin E and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract . v. 1, n. 2, 2017. REVIEW, E. Prostaglandins and epithelial response to injury. p. 107–110, 2017.

TANAKA, A. et al. Preconditioning Stress Prevents Cold Restraint Stress-Induced Gastric Lesions in Rats: Roles of COX-1 , COX-2 , and PLA 2. *Digestive Diseases and Sciences*. v. 52, n. 2, p. 478–487, 2007

TANYELI, A. et al. The biochemical and histopathological effects of salusin alpha and salusin beta on cold restricted stress induced gastric injury. v. 6, n. 2, p. 236–241, 2017.

TARNAWSKI, A. S., AHLUWALIA, A. Molecular mechanisms of epithelial regeneration and neovascularization during healing of gastric and esophageal ulcers. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 16-27, 2012.

TARNAWSKI, A. S.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. The Mechanisms of Gastric Mucosal Injury : Focus on Microvascular Endothelium as a Key Target. p. 4–15, 2012.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Gastric Cytoprotection Beyond Prostaglandins : Cellular and Molecular Mechanisms of Gastroprotective and Ulcer Healing Actions of Antacids. p. 126–132, 2013.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Gastric Cytoprotection Beyond Prostaglandins: Cellular and Molecular Mechanisms of Gastroprotective and Ulcer Healing Actions of Antacids. *Current pharmaceutical design*, v.19, p. 126–132, 2013

TOMISATO, W. et al. Membrane permeabilization by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 323, p. 1032–1039, 2004

TRAN, L. S.; MICHELLE, A.; CHONWERAWONG, A., FERRERO, R. L. Regulation and functions of inflammasome-mediated cytokines in *Helicobacter pylori* infection. Elsevier, 2017.

TRISTE, N. E.D. et al. Pharmacological evidence for the participation of NO–GMPc–KATP pathway in the gastric protective effect of curcumin against indomethacin-induced gastric injury in the rat. *European Journal of Pharmacology*, v. 730, p. 102-106, 2014.

TU, S. et al., Overexpression of Interleukin-1b Induces Gastric Inflammation and Cancer and Mobilizes Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice. *Cancer Cell Article*. 14, 408–419, November 4, 2008.

TUNG, Y.T.; CHUA, M.T.; WANG, S.Y.; CHANG, S.T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). **Bioresour. Technol.** 99, 3908–3912, 2008.

TYTGAT, G. N. J. Etiopathogenetic Principles and Peptic Ulcer Disease Classification. *Dig Dis*, v. 29, p. 454-458, 2011.

UTZERI, E; USAI, P. Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs on intestinal permeability and nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 22, p. 3954-3963, 2017.

VALLE, J. D. Doenças ulcerosa péptica e distúrbios relacionados. In LONGO, D. L. et al. *Gastrenenterologia e hepatologia de Harrison*. Porto Alegre: AMGH, 2 ed., cap.14, p. 99-121, 2015.

- VEERAPPAN, R. et al. Thesis submitted to the Bharathidasan University, Tiruchirappalli for the award of doctor of philosophy in biochemistry. 2017.
- VENDRAMINI-COSTA, D. B. et al. Chemico-Biological Interactions Gastroprotective effects of goniotalamin against ethanol and indomethacin-induced gastric lesions in rats : Role of prostaglandins , nitric oxide and sulfhydryl compounds. v. 224, p. 206–212, 2014.
- VILCEK, J. The cytokines: an overview. Department of Microbiology, New York University, 2003.
- WALLACE, J. L.; SHARKEY, K. A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman: Farmacoterapia da acidez gástrica, úlceras pépticas e doença do refluxo gastroesofágico Artmed, 12<sup>a</sup> edição, pág 1309, 2012.
- WALLACE, S. et al. Disrupted nitric oxide signaling due to GUCY1A3 mutations increases risk for moyamoya disease, achalasia and hypertension. **Clinical Genetics**, v. 90, n. 4, p. 351- 360, 2016.
- WANG, L. et al. Natural Products from Mammalian Gut Microbiota. **Trends in Biotechnology**, p. 1–13, 2017.
- WANG, L.; ZHANG, H. A theoretical study of the different radical-scavenging activities of catechin , quercetin , and a rationally designed planar catechin. v. 33, p. 108–115, 2005.
- WANG, X. et al. Gastroprotective activity of polysaccharide from *Hericium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer , and its antioxidant activities. v. 186, n. December 2017, p. 100–109, 2018.
- WATANABE, T.; ARAKAWA, T. Role of Neutrophils in a Rat Model of Gastric Ulcer Recurrence Caused by Interleukin-1f3. v. 150, n. 3, p. 971–979, 1997.
- WEI, Q. et al. Tissue and Cell Mitigation of stress from gastric mucosal injuries by mulberry extract may occur via nitric oxide synthase signaling in mice. **Tissue and Cell**, v. 54, n. May, p. 59–64, 2018.
- WEI, Q.; ZHANG, F.; SUN, F.; LUO, Q.; WANG, R.; HU, R.; HE, G. A wheat MYB transcriptional repressor TaMyb1D regulates phenylpropanoid metabolism and

enhances tolerance to drought and oxidative stresses in transgenic tobacco plants. **Plant Science**, 265, 112–123, 2017.

WHITMAN, Z.; O'NEIL, DANIEL H. R. Gastric disorders: modifications of gastric content, antacids and drugs influencing gastric secretions and motility. *Anaesthesia and intensive care medicine*. Elsevier, 2017.

WILSON, R. L.; STEVENSON, C. E. *Anatomy and Physiology of the Stomach*. Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set. Volume 1, p 634-646, 2019.

WOLFE, M.M ., SACHS, G . Acid suppression: optimizing therapy for gastroduodenal ulcer healing, gastroesophageal reflux disease, and stress-related erosive syndrome . *Gastroenterology* 118 : S9 – 31. 2000.

WOODS, Y. L.; CAREY, F. A. Pathology and histology of the oesophagus and stomach. **Surgery**, p. 1–7, 2017.

WU, J. et al. *Heat Shock Proteins and Cancer*. v. xx, p. 1–31, 2016.

XU, L. et al. Protective Effects of Taraxasterol against Ethanol-Induced Liver Injury by Regulating CYP2E1 / Nrf2 / HO-1 and NF- $\kappa$  B. Signaling Pathways in Mice. v. 2018, 2018.

XU, P. et al. *International Journal of Biological Macromolecules* Structure and preventive effects against ethanol-induced gastric ulcer of an expolysaccharide from *Lachnum* sp . v. 86, p. 10–17, 2016.

YANAGI, S. et al. Isolation of human  $\beta$ -defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. v. 9, p. 1–9, 2005.

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: Na Overview. *Curr Gastroenterol Rep*, v. 17, p. 24, 2015.

YE, B. et al. Absence of NF- $\kappa$ B subunit p50 ameliorates cold immobilization stress-induced gastric ulcers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 434, n. 3, p. 547-551, 2013.

YE, B. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Absence of NF- $\kappa$ B subunit p50 ameliorates cold immobilization stress-induced gastric ulcers. v. 434, p. 547–551, 2013.

YUN, S. et al. Gastroprotective effect of mature silkworm , *Bombyx mori* against ethanol- induced gastric mucosal injuries in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 39, n. October, p. 279–286, 2017.

ZAGHLOOL, S. S. et al. Assessment of protective effects of extracts of *Zingiber officinale* and *Althaea officinalis* on pyloric ligation-induced gastric ulcer in experimental animals. UK **Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, v. 3, n. 4, p. 8-23, 2015.

ZAKARIA, Z. A. et al. Mechanism ( s ) of action underlying the gastroprotective effect of ethyl acetate fraction obtained from the crude methanolic leaves extract of *Muntingia calabura*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–17, 2016.

ZHANG, L. et al. Critical Role of Antimicrobial Peptide Cathelicidin for Controlling *Helicobacter pylori* Survival and Infection. 2016.

ZHANG, L. et al. Curcuminoids enhance amyloid- $\beta$  uptake by macrophages of Alzheimer ' s disease patients. v. 10, p. 1–7, 2005.

ZHENG, Y. et al. Chemico-Biological Interactions Gastroprotective effect and mechanism of patchouli alcohol against ethanol , indomethacin and stress-induced ulcer in rats. **CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS**, v. 222, p. 27–36, 2014.

ZHOU, Q. et al. Neuronal nitric oxide synthase and a ff ective disorders. **IBRO Reports**, v. 5, n. December 2017, p. 116–132, 2018.

ZIMMERNAM, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, p. 109-110, 1983.

ZOLOTAREV, V. A. Dietary Free Amino Acids and the Gastric Phase of Digestion. p. 2731–2737, 2014.

ZULUAGA, A. M. et al. Nitric oxide and malondialdehyde in gastric contents and blood in na equine model of gastric ulcer induced by phenylbutazone. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 29, n. 1, p. 43-50, 2016.

*ANEXOS*

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
GABINETE DA VICE-REITORIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO ESTRAGOL" protocolo nº 134/2017 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Leônia Maria Batista** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 01/03/2018.

Vigência do Projeto	2017 - 2019
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss ( <i>Mus musculus</i> ) Rato Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> )
Número de animais	Camundongos Swiss – 162 animais Ratos Wistar – 320 animais
Idade/peso	Camundongos Swiss - 6-8 semanas/ 25-35 g Ratos Wistar - 7-8 semanas/ 180-250g
Sexo	Machos
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB

## ANEXO B

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos				
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	0 min	15 min	30 min	60 min	4 h
<b>1 – SNC</b>					
<b>a – Estimulante</b>					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
<b>b – Depressora</b>					
Hipnose					
Prose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>c – Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contrições abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
<b>2 - SN AUTÔNOMO</b>					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tensão muscular					
Força para agarrar					
<b>3 – MORTE</b>					
<b>Observações</b>					
complementares: _____					